



NOVA
NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY



NOVA MEDICAL
SCHOOL

itop nova

Inês Campos Freitas
Licenciada em Biologia

Deteção e caracterização de rickettsias e outros agentes zoonóticos em animais selvagens e nos seus ectoparasitas

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa



NOVA
NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY



NOVA MEDICAL
SCHOOL

itop nova

Inês Campos Freitas
Licenciada em Biologia

Deteção e caracterização de rickettsias e outros agentes zoonóticos em animais selvagens e nos seus ectoparasitas

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa





Deteção e caracterização de rickettsias e outros agentes zoonóticos em animais selvagens e nos seus ectoparasitas

Inês Campos Freitas

Licenciada em Biologia

Orientador: Rita de Sousa, Investigadora Auxiliar,
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo
Jorge

Coorientador: Maria Luísa Vieira, Professora Auxiliar,
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Rita Gonçalves Sobral de Almeida,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Margarida Nunes da Rosa Dias Duarte, Investigadora Auxiliar
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Orientador: Rita Marques de Sousa, Investigadora Auxiliar,
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
dezembro, 2021

Deteção e caracterização de rickettsias e outros agentes zoonóticos em animais selvagens e nos seus ectoparasitas

Copyright © Inês Campos Freitas, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de diversas instituições, que a título profissional e/ou pessoal apoiaram o presente estudo, nomeadamente:

Ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge/ Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac, pelas facilidades concedidas na realização desta tese de mestrado.

Ao Instituto de Conservação da Natureza e Florestas (ICNF) por ter colaborado, permitindo a realização deste trabalho, nomeadamente ao Dr. Carlos Carrapato e Dr. Nuno Neves.

À Associação de Criadores de Equinos da Raça Garrana (ACERG) pela autorização de recolha de amostras para o estudo, nomeadamente ao Dr. José Leite e ao Dr. João Paulo Ribeiro.

Ao Espaço de visitação de aves (EVOA), nomeadamente ao Dr. Pedro Henriques pela colaboração e que durante os trabalhos de anilhagem ajudou na colheita dos ectoparasitas.

À Associação Focinho's (Associação de Proteção de Animais de Alcácer) nomeadamente à Teresa Campos.

À FCT- NOVA por ter aceite a minha candidatura neste mestrado.

À Doutora Rita de Sousa, pelo incentivo no estudo das rickettsias e por todos os ensinamentos na área, sem ela este trabalho não era possível e sinto-me muito grata por a ter como orientadora.

À Doutora Sofia Núncio enquanto responsável do Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas, a sua autorização para realizar este trabalho no INSA/CEVDI.

À Professora Doutora Maria Luísa Vieira pela sua disponibilidade e pelo auxílio sempre que foi necessário.

À Teresa Luz e a todos os colegas do CEVDI por me receberem tão bem e por me prestarem auxílio sempre que necessitava.

Aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado pela paciência e apoio.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo, estudar a eco-epidemiologia de rickettsias e outros agentes zoonóticos em populações de animais selvagens e domésticos e nos seus ectoparasitas.

De 2018 a 2021 foram colhidas amostras de sangue de lince e ectoparasitas de três populações de animais selvagens: lince ibérico (*Lynx pardinus*), cavalos de raça Garrana (*Equus caballus celticus*) e aves. Paralelamente, em 2021 foram ainda estudadas amostras de sangue e ectoparasitas de gatos e cães recolhidos num canil. Todas as amostras foram colhidas em Portugal continental.

Foi realizada a caracterização morfológica e molecular dos ectoparasitas (ixodídeos, pulgas, moscas e piolhos), assim como a deteção e/ou isolamento e caracterização molecular de *Rickettsia*, *Bartonella* e protozoários do filo Apicomplexa, nestes vetores. Nas populações de lince e de animais domésticos, foi ainda realizada a pesquisa por PCR dos mesmos agentes zoonóticos no sangue dos animais e investigada a presença de anticorpos IgG anti-*Rickettsia* e anti-*Bartonella* pela técnica de Imunofluorescência indireta. Do total de ectoparasitas foram estudados 569 ixodídeos que incluíram, 253 colhidos em lince, 151 de Garranos, 95 de aves e 34 de animais domésticos.

Ixodes ventraloi e *Rhipicephalus pusillus* foram as espécies mais prevalentes a parasitar lince, *R. bursa* cavalos Garranos e fases imaturas de *Hyalomma marginatum* as aves. A pesquisa de agentes no total de ixodídeos analisados revelou a presença de *Rickettsia aeschlimannii*, *Candidatus R. barbarie*, *R. conorii*, *R. helvetica*, *R. sibirica mongolitimonae*, *R. massiliae*, *Hepatozoon felis*, *Theileria equi* e *Babesia cabalii*. Em pulgas *Ctenocephalides felis* foi detetado por PCR, *R. felis* e *R. asembonensis*. Da pesquisa por PCR realizada no sangue dos lince 61,5% foram positivos para *H. felis* e 33,3% para *Cytauxzoon* spp.. Foram realizadas tentativas de isolamento em 36 ixodídeos de cavalos e foram conseguidos dois isolados de *Candidatus R. barbarie*. Encontrámos nos lince uma prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* de 82,1% e de 41% para anticorpos anti-*Bartonella*.

Reportamos pela primeira vez, a presença da mosca *Ornithomya biloba* em Portugal. Este foi o primeiro estudo realizado em ectoparasitas colhidos em lince ibérico reintroduzidos em Portugal.

Palavras-chave: Garranos, Lince, Aves, Rickettsias, Ixodídeos, Piroplamídeos

Abstract

This work aimed to study the eco-epidemiology of rickettsiae and other zoonotic agents in wild and domestic animal populations and their ectoparasites.

From 2018 to 2021 blood samples were collected from lynx and ectoparasites from three wild animal populations: Iberian lynx (*Lynx pardinus*), Garrano horses (*Equus caballus celticus*) and birds. In parallel in 2021 blood samples and ectoparasites from cats and dogs collected from a kennel were also studied. All samples were collected in continental Portugal.

Morphological and molecular characterization of ectoparasites (ixodidae, fleas, flies and lice) was performed as well as the detection and/or isolation and molecular characterization of *Rickettsia*, *Bartonella* and protozoa of the phylum Apicomplexa in these vectors. In lynx and domestic animal populations, the same zoonotic agents were also investigated by PCR in the blood of animals and the presence of IgG anti-*Rickettsia* and anti-*Bartonella* antibodies was investigated by indirect immunofluorescence technique. Of the total ectoparasites 569 Ixodidae were studied which included, 253 collected from lynx, 151 from garrano horses, 95 from birds and 34 from domestic animals.

Ixodes ventraloi and *Rhipicephalus pusillus* were the most prevalent species parasitizing lynx, *R.bursa* horses Garranos and immature stages of *Hyalomma marginatum* birds. Agent investigation on these ixodids revealed the presence of *Rickettsia aeschlimannii*, *Candidatus R. barbarie*, *R. conorii*, *R. helvetica*, *R. sibirica mongolitimonae*, *R. massiliae*, *Hepatozoon felis*, *Theileria equi* and *Babesia cabalii*. In *Ctenocephalides felis* fleas, *R. felis* and *R. asembonensis* were detected by PCR. Of the total lynx 61.5% were positive by PCR for *H. felis* and 33.3% for *Cytauxzoon* spp.. Isolation attempts were performed on 36 horse ixodids and two isolates of *Candidatus R. barbarie* were obtained. We found in lynx prevalence of antibodies to *Rickettsia* of 82.1% and 41% for *Bartonella*.

We report for the first time the presence of the fly *Ornithomya biloba* in Portugal. This was the first study carried out on ectoparasites collected from Iberian lynx reintroduced in Portugal.

Keywords: Garranos, Lynx, Birds, Rickettsiae, Ixodidae, Pyroplamidae

Índice de Conteúdo

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Agradecimentos..... | ix |
| Resumo | xi |
| Abstract | xiii |
| Índice de conteúdo | xv |
| Índice de figuras | xvii |
| Índice de quadros | xix |
| Lista de abreviaturas | xxi |
| Introdução | 1 |
| Objetivos | 3 |
| Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica | |
| 1. Ixodídeos e outros artrópodes vetores..... | 5 |
| 1.1. Ixodídeos | 6 |
| 1.1.1. Taxonomia e classificação | 6 |
| 1.1.2. Morfologia | 6 |
| 1.1.3. Ciclos de vida e hospedeiros..... | 7 |
| 1.1.4. Ixodídeos como vetores de agentes patogénicos | 9 |
| 1.1.5. Principais espécies de ixodídeos em Portugal e a sua distribuição geográfica..... | 11 |
| 1.2. Pulgas..... | 15 |
| 1.3. Piolhos e moscas hipoboscídeos que parasitam animais..... | 15 |
| 1.4. Importância médica e veterinária dos ixodídeos e outros artrópodes vetores..... | 16 |
| 2. Rickettsias e outros agentes patogénicos associados a vetores..... | 18 |
| 2.1. <i>Rickettsia</i> | 18 |
| 2.1.1. Enquadramento histórico..... | 18 |
| 2.1.2. Taxonomia e classificação | 18 |
| 2.1.3. Morfologia e fisiologia | 19 |
| 2.1.4. Ecologia e epidemiologia..... | 20 |
| 2.1.5. Ciclos de transmissão na natureza e hospedeiros..... | 21 |
| 2.1.6. Rickettsioses..... | 23 |
| 2.1.7. Detecção de <i>Rickettsia</i> em Ixodídeos e hospedeiros | 25 |
| 2.2. <i>Bartonella</i> | 27 |
| 2.3. Apicomplexa..... | 28 |
| 2.3.1. <i>Babesia</i> | 28 |
| 2.3.2. <i>Theileria</i> | 29 |
| 2.3.3. <i>Cytauxzoon</i> | 29 |
| 2.3.4. <i>Hepatozoon</i> | 30 |

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Trabalho de campo | 31 |
| 1.1. Localização das áreas de estudo e populações animais | 31 |
| 1.2. Captura de animais (hospedeiros) e recolha dos seus ectoparasitas | 34 |
| 2. Atividade laboratorial..... | 36 |
| 2.1. Condições de Biossegurança e boas práticas laboratoriais | 36 |
| 2.2. Identificação morfológica de ixodídeos | 36 |
| 2.3. Extração de DNA..... | 41 |
| 2.4. Caracterização molecular dos ectoparasitas | 41 |
| 2.5. Detecção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos | 42 |
| 2.6. Análise de sequências e caracterização filogenética..... | 45 |
| 2.7. Tentativa de isolamento de rickettsias a partir de ixodídeos | 46 |
| 2.8. Estudos serológicos | 47 |

Capítulo 3 - Resultados

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. Linces ibéricos..... | 49 |
| 2. Cavalos da raça Garrana | 55 |
| 3. Aves selvagens | 58 |
| 4. Animais domésticos | 60 |

Capítulo 4 - Discussão

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 1. Linces ibéricos..... | 63 |
| 2. Cavalos da raça Garrana | 69 |
| 3. Aves selvagens | 71 |
| 4. Animais domésticos | 73 |
| Conclusão | 75 |
| Referências | 77 |
| Anexos..... | 91 |

Índice de Figuras

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1- Hipótese atual de relações filogenéticas entre grupos de artrópodes ancestrais e existentes | 5 |
| Figura 1.2- Morfologia geral de uma carraça da família Ixodidae | 7 |
| Figura 1.3- Capítulo representativo de carraça da família Ixodidae visualizado por microscopia eletrônica de varredura..... | 7 |
| Figura 1.4- Ciclo de vida de um ixodídeo com três hospedeiros (trifásico) | 8 |
| Figura 1.5- Árvore filogenética de espécies de <i>Rickettsia</i> , inferida da comparação de sequências concatenadas dos genes <i>gltA</i> e <i>sca 4</i> | 19 |
| Figura 1.6- <i>Rickettsia</i> spp. em células Vero visualizadas através da coloração de Giménez | 19 |
| Figura 1.7- Prevalência de infecção por <i>Rickettsia</i> spp. em ixodídeos colhidos no âmbito do REVIVE no período de 2011-2018 | 21 |
| Figura 1.8- Ciclo de transmissão de rickettsias, entre hospedeiros reservatórios (carraça e roedores) e hospedeiro acidental (Homem) | 22 |
| Figura 1.9- Sinais associados a rickettsioses..... | 23 |
| Figura 1.10- Esquematização do tipo de amostras e diagnóstico que pode ser feito no estudo de rickettsias..... | 25 |
| Figura 1.11- Gráfico representativo da utilidade dos métodos de diagnósticos no decorrer de uma infecção por <i>Rickettsia</i> | 27 |
| Figura 1.12- Distribuição geográfica das infecções por <i>Cytauxzoon</i> em gatos domésticos e felinos selvagens..... | 29 |
| Figura 2.1- Principais caracteres morfológicos utilizados na identificação da espécie de ixodídeos .. | 37 |
| Figura 2.2- Caracteres morfológicos que permitem distinguir as espécies de <i>Rhipicephalus</i> | 38 |
| Figura 2.3- Caracteres morfológicos distintos de <i>I. ventalloi</i> | 39 |
| Figura 2.4- Vista dorsal de fêmea (A) e macho (B) de <i>H. lusitanicum</i> | 39 |
| Figura 2.5- Caracteres morfológicos das espécies do género <i>Dermacentor</i> | 40 |
| Figura 2.6- Esquema que ilustra o processo realizado na tentativa de isolamento de rickettsias..... | 46 |
| Figura 3.1- Análise das espécies de ixodídeos colhidos nos lincs ibérico por ano/estação..... | 49 |
| Figura 3.2- Filogenia do género <i>Ixodes</i> baseado na análise de 456 bp do gene 16S rRNA | 50 |
| Figura 3.3- Filogenia do género <i>Rhipicephalus</i> baseado na análise de 460 bp do gene 16S rRNA... 51 | 51 |

Índice de Quadros

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1.1- Características biológicas mais importantes que tornam os ixodídeos bons vetores de agentes patogénicos | 10 |
| Quadro 1.2- Espécies de ixodídeos mais abundantes, a sua distribuição, período de maior atividade e hospedeiros preferenciais em Portugal continental, no âmbito do REVIVE 2011-2018..... | 11 |
| Quadro 1.3- Principais agentes patogénicos para o Homem transmitidos por vetores (ixodídeos e pulgas)..... | 17 |
| Quadro 1.4- Rickettsias patogénicas do grupo das febres exantemáticas identificadas na Europa ... | 24 |
| Quadro 2.1- <i>Primers</i> e condições de PCR utilizados para identificação molecular das espécies de ectoparasitas | 42 |
| Quadro 2.2- <i>Primers</i> e condições de PCR utilizados no estudo molecular para deteção e caracterização molecular de agentes patogénicos bactérias e protozoários nos ectoparasitas e nas amostras de sangue | 44 |
| Quadro 3.1- Resultados da pesquisa de agentes no sangue dos linceos e resultados da serologia nos soros dos mesmos | 53 |
| Quadro 3.2- Resultados da pesquisa de agentes patogénicos nos ectoparasitas colhidos de linceos ibéricos | 54 |
| Quadro 3.3- Resultados da pesquisa de agentes patogénicos nos ectoparasitas colhidos nos cavalos da raça Garrana | 57 |
| Quadro 3.4- Lista das espécies de aves selvagens e os respetivos ectoparasitas colhidos..... | 59 |
| Quadro 3.5- Resultados da pesquisa de agentes patogénicos nos ectoparasitas colhidos em aves selvagens..... | 59 |
| Quadro 3.6- Resultados da pesquisa de <i>Rickettsia</i> nos ectoparasitas colhidos dos animais domésticos (cães e gatos)..... | 61 |
| Quadro 3.7- Resultados da pesquisa de agentes patogénicos por PCR e serologia no sangue dos cães | 61 |

Lista de abreviaturas

| | |
|-------------|------------------------------------------------------------|
| ACERG | Associação de Criadores de Equinos da Raça Garrana |
| AG | Grupo ancestral |
| ATP | adenosina trifosfato |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BSL2 | Nível 2 de biossegurança |
| BSL3 | Nível 3 de biossegurança |
| CCHF | <i>Crimean-Congo haemorrhagic fever</i> |
| CEVDI | Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas |
| COI | citocrome c oxidase 1 |
| DEBOLA | <i>Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| EDTA | Ácido etileno-diamino-tetra-acético |
| EUA/USA | Estados Unidos da América |
| EVOA | Espaço de Visitação e Observação de Aves |
| GFE | Grupo das Febres Exantemáticas |
| <i>gltA</i> | <i>Citrate synthase gene</i> |
| GTR | Grupo transicional |
| ICNF | Instituto da Conservação da Natureza e Florestas |
| IFA | <i>Indirect Immunofluorescence Assay</i> |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| INSA | Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge |
| IUCN | União Internacional de Conservação da Natureza |
| LAR | <i>Linfangite- associated rickettsiosis</i> |

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| <i>OmpA</i> | <i>Outer membrane protein A gene</i> |
| <i>OmpB</i> | <i>Outer membrane protein B gene</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PNVG | Parque Nacional do Vale do Guadiana |
| REVIVE | Rede de Vigilância de Vetores |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| rrs | gene16S rRNA |
| sca | <i>Surface cell antigen</i> |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| TBE | <i>Tick-borne encephalitis</i> |
| TG | Grupo do Tifo |
| TIBOLA | <i>Tick-borne lymphadenopathy</i> |
| WHO | Organização Mundial de Saúde |

Introdução

As doenças infecciosas têm se revelado uma ameaça crescente para a saúde pública. Cerca de 60% das doenças infecciosas emergentes são zoonoses (Jones et al., 2008) e dessas, 17% são transmitidas por vetores (e.g. mosquitos, carraças, flebótomos, triatomídeos, moscas, pulgas e piolhos) (Jones et al., 2008).

O desenvolvimento de metodologias inovadoras no controlo de artrópodes vetores têm sido desafiante e muitas zoonoses associadas à transmissão por estes vetores persistem e até expandiram a sua presença para outras áreas geográficas do globo (e.g. vírus Zika) (Anderson et al., 2016; Rasmussen, 2020). Alguns dos fatores envolvidos na emergência destas zoonoses, são sem dúvida as alterações climáticas, a urbanização descontrolada, o crescimento económico e a globalização (Ogden & Lindsay, 2016; Swei et al., 2020).

A nível mundial, a malária associada à transmissão pelo mosquito *Anopheles*, é a doença com maior impacto na saúde das populações e estimam-se anualmente cerca de 241 milhões de casos e 627 000 mortes (WHO, 2021). Contudo, a seguir aos mosquitos e nomeadamente na Europa, as carraças são os vetores mais importantes na transmissão de agentes patogénicos ao Homem. As doenças associadas aos ixodídeos mais prevalentes na Europa são a borreliose de Lyme, a febre escaro-nodular (De Sousa et al., 2008) e a encefalite transmitida por carraça (TBE). Entre outras estão ainda descritas outras infeções de origem bacteriana, como a anaplasmose humana e a tularémia, e de origem viral como a febre hemorrágica Crimeia-Congo (CCHF) (Hubálek & Rudolf, 2012; Socolovschi et al., 2009b).

Em Portugal, as rickettsioses e a borreliose de Lyme são as doenças com maior impacto na saúde pública, sendo a febre escaro-nodular causada por *Rickettsia conorii* e transmitida ao homem pela carraça do cão *Rhipicephalus sanguineus*, a doença com maior número de casos e com maior preocupação não só pela existência de casos graves como de casos de morte (De Sousa et al., 2008).

Os microrganismos transmitidos por vetores são mantidos em ciclos naturais que envolvem não só os artrópodes vetores, mas também os hospedeiros animais selvagens e /ou animais domésticos onde os artrópodes fazem a sua alimentação sanguínea para completar o seu ciclo de vida. A transmissão de um agente patogénico ao Homem e aos animais dependem de interações únicas entre o agente, o hospedeiro e o vetor assim como de outras variáveis que influenciam o seu ciclo de vida e a sua atividade como fatores fisiológicos, ecológicos e ambientais (Gray et al., 2009; Parola & Raoult, 2001).

O conhecimento da eco-epidemiologia dos vetores, a sua monitorização e o conhecimento sobre as suas interações com os seus hospedeiros e agentes patogénicos, são essenciais na vigilância e na identificação de potenciais doenças associadas a vetores.

Mais recentemente a introdução do novo conceito de uma “só saúde”, ou seja, a integração entre a saúde humana, a saúde animal, e o ambiente, trouxe uma mais-valia no conhecimento das doenças que podem afetar paralelamente o homem e os animais. Este novo conceito permitiu também e tornou-

se imprescindível na melhoria da adoção de políticas públicas efetivas, para prevenção e controlo das doenças, quer a nível nacional e ou internacional (Dantas-Torres et al., 2012; Sinclair, 2019).

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal, estudar a eco-epidemiologia de rickettsias e outros agentes zoonóticos em populações de animais selvagens e domésticos, assim como nos seus ectoparasitas.

Para isso foram nossos objectivos específicos:

- 1- Colher, identificar e caracterizar as espécies de ectoparasitas associados a três populações de animais selvagens: o lince ibérico, os cavalos de raça Garrana e aves selvagens. Assim como, os ectoparasitas colhidos em gatos e cães.
- 2- Detetar e caracterizar a presença de agentes patogénicos para o Homem e animais, como rickettsias, *Bartonella* e alguns agentes do filo Apicomplexa presentes nos ectoparasitas colhidos nas populações de animais seleccionadas.
- 3- Detetar e caracterizar a presença de rickettsias, *Bartonella* e alguns agentes do filo Apicomplexa, em amostras de sangue dos lince ibéricos.
- 4- Caracterizar a exposição e estimar a prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* e anti-*Bartonella* presentes na população de lince e cães.

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

1. Ixodídeos e outros artrópodes vetores

Um vetor é um organismo vivo com capacidade para transmitir um agente patogénico ao Homem (de pessoa a pessoa) ou de animais ao Homem e entre animais (Wilson et al., 2017). Existem vários grupos de vetores com importância médica e veterinária, tais como os mosquitos, carraças, flebótomos, triatomídeos, moscas, pulgas e piolhos. Uma característica comum entre os artrópodes vetores de agentes patogénicos é a hemofagia, que representa uma estratégia evolutiva de sucesso, uma vez que o sangue é altamente nutritivo e acessível onde quer que os hospedeiros vertebrados se localizem (Swei et al., 2020) (Figura 1.1).

A nível mundial, os mosquitos são sem dúvida aqueles que mais se destacam, devido ao número de casos de doenças graves e por vezes letais que causam a nível mundial. Estes podem transmitir diferentes arbovírus (e.g. vírus da febre amarela), e parasitas (e.g. *Plasmodium*) (Marquardt & Kondratieff, 2005).

A seguir aos mosquitos, e na Europa os ixodídeos também vulgarmente designados por carraças são os vetores mais importantes na transmissão de uma grande variedade de agentes patogénicos ao Homem (Parola & Raoult, 2001).

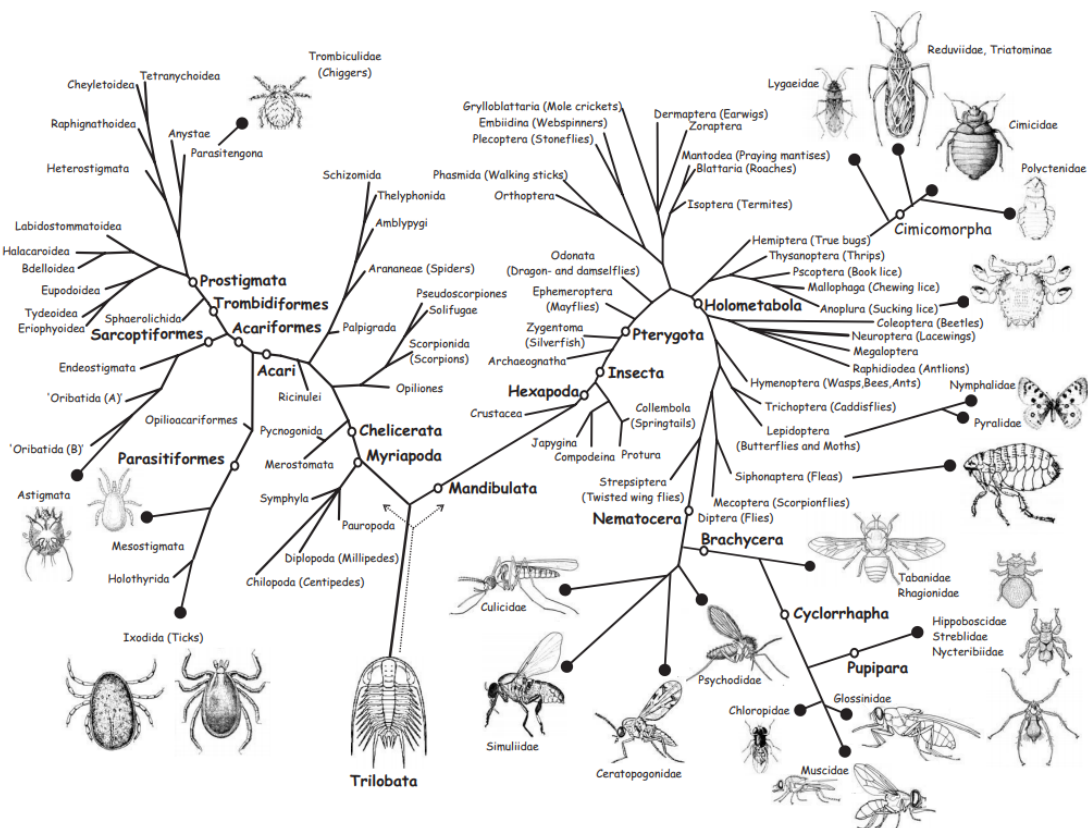


Figura 1.1- Hipótese atual de relações filogenéticas entre grupos de artrópodes ancestrais e existentes. Relação filogenética entre a ordem Hexapoda, Chelicerata e Acari. A evolução dos táxons de artrópodes hematófagos está indicada com círculos sólidos. (Retirado de Marquardt & Kondratieff, 2005).

1.1. Ixodídeos

As carrças são artrópodes hematófagos estritos, existentes em quase todas as regiões zoogeográficas e parasitam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, como mamíferos, aves, anfíbios, répteis e ocasionalmente o Homem. A sua importância médica e veterinária deve-se ao facto destes artrópodes quando infetados e a parasitar os animais ou o Homem podem transmitir agentes patogénicos que causam doença (Sonenshine & Roe, 2014).

1.1.1. Taxonomia e classificação

Conhecem-se mais de 800 espécies de carrças no mundo. Estes artrópodes pertencem à classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Parasitiformes e sub-ordem Ixodida (Sonenshine & Roe, 2014). Existem três famílias, a Nuttalliellidae, Argasidae (carrças de corpo mole) e Ixodidae (carrças de corpo duro) sendo esta última a que apresenta o maior número de espécies e a mais relevante no que diz respeito à transmissão de agentes infecciosos. A família Ixodidae com cerca de 650 espécies está ainda subdivida em dois grupos: Prostriata, compreendendo um único género, *Ixodes*, e Metastrinata, compreendendo os 11 restantes (Nava, 2009).

1.1.2. Morfologia

O corpo de um ixodídeo é dividido em duas regiões funcionais: o capítulo (gnatossoma), e o corpo (idiossoma) (abdóm e torác fundidos). O capítulo contém as peças bucais, consistindo num par de quelíceras que servem para cortar a pele no momento da picada, dois palpos que tem função sensorial e o hipóstoma que está coberto por denticulos e que permitem a fixação ao hospedeiro. Todas estas peças inserem-se numa placa (base do capítulo) (Figura 1.3) (Klompfen, 2005). A forma da base do capítulo, comprimento dos palpos, o número de denticulos e outras características das peças bucais, são utilizadas na caracterização morfológica das diferentes espécies (Stafford III, 2007).

Em posição ventral e na região anterior (podossoma), encontra-se o poro genital e na região posterior (opistossoma), encontram-se os espiráculos (estruturas por onde se realizam as trocas gasosas com o exterior) e a abertura anal. Os adultos apresentam quatro pares de patas e cada pata é constituída por seis segmentos que se articulam com o corpo através das coxas (Figura 1.2). Os extremos do primeiro par de patas contêm importantes órgãos sensoriais (órgão de Haller). Na extremidade das patas encontram-se ainda duas garras e um pulvilho que permitem a fixação do ixodídeo ao hospedeiro.

Os ixodídeos possuem um escudo esclerotizado sobre a superfície dorsal. Nos machos este escudo cobre toda a superfície dorsal, enquanto nas fêmeas cobre apenas a porção anterior do corpo (Figura 1.2), proporcionando-lhes aumentar de volume quando ingere grandes quantidades de sangue (ingurgitamento). Os olhos, que nem sempre estão presentes, localizam-se nas margens laterais do escudo (Sonenshine & Roe, 2014). A aparência e ornamentação do escudo difere entre os géneros e espécies de ixodídeos. Esta característica é usada na identificação dos géneros dos ixodídeos.



Figura 1.2- Morfologia geral de uma carraça da família Ixodidae. A) Vista dorsal e B) vista ventral de fêmea de *Ixodes ricinus*. (Adaptado de Estrada-Peña, 2015)

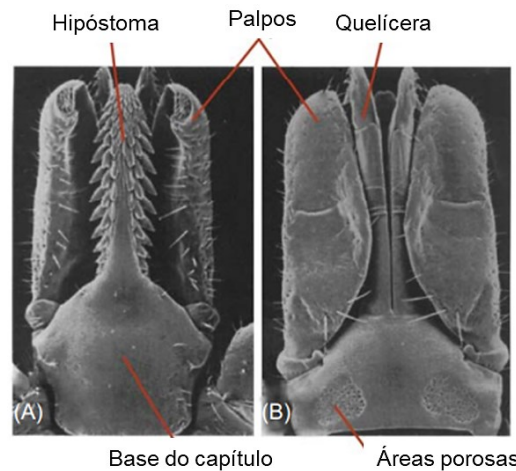


Figura 1.3- Capítulo representativo de carraça da família Ixodidae visualizado por microscopia eletrônica de varredura. A) Vista Ventral e B) vista dorsal. (Adaptado de Nicholson et al., 2019)

No que diz respeito à morfologia interna, os órgãos da carraça são envolvidos por hemolinfa, um fluido que contém hemócitos e numerosas proteínas em circulação. Os órgãos principais são: órgão do trato digestivo, as glândulas salivares e os órgãos reprodutores. No trato digestivo, o intestino médio é a região onde a carraça armazena o sangue que ingere. As glândulas salivares são responsáveis por segregar saliva com fatores anticoagulantes e anti-inflamatórios, enzimas digestivas e proteínas que facilitam a picada e dilatam os vasos sanguíneos da pele do hospedeiro. (Sonenshine & Roe, 2014).

Os ixodídeos possuem ainda vários órgãos sensoriais (e.g. órgão de Haller) que permitem detectar odores, vibrações, mudanças de temperatura, níveis de dióxido de carbono, amoníaco, hidrogénio, enxofre e outros sinais externos do hospedeiro. Estas características facilitam a localização do hospedeiro e contribuem para o sucesso da sua fixação e alimentação (Parola & Raoult, 2001; Sonenshine & Roe, 2014).

1.1.3. Ciclos de vida e hospedeiros

A maioria das espécies pertencentes à família Ixodidae são carraças não nidícolas (exófilos), que vivem em ambientes abertos, como florestas, arbustos, savanas, prados, etc, mas alguns tem uma ecologia nidícola (endófilos), permanecendo em tocas, ninhos e cavidades perto de locais de repouso ou reprodução dos seus hospedeiros (Sonenshine & Roe, 2014). As carraças apresentam diferentes padrões de sazonalidade na sua atividade de procura de hospedeiro. Fatores ambientais tais como temperatura, humidade relativa, intensidade da luz solar e fotoperíodo condicionam o seu ciclo de vida (Estrada-Peña, 2015). Por exemplo, diferentes espécies de carraças estão ativas em diferentes épocas do ano, o que vulgarmente se refere a carraças “de verão” e “de inverno”. Os ixodídeos podem sobreviver por longos períodos de tempo. Por exemplo, quando as condições não são ideais para manter a sua atividade as carraças podem entrar num período de dormência (e.g. diapausa).

O ciclo de vida de todas as espécies de ixodídeos é muito semelhante e a duração depende da espécie e dos fatores ambientais, podendo variar de vários dias a anos. O ciclo é composto por quatro fases evolutivas, uma inativa, o ovo, e três ativas, larva, ninfa e adulto (macho ou fêmea). Para que ocorra passagem de uma fase evolutiva para outra, é necessária uma refeição de sangue num hospedeiro vertebrado, que chamamos fase de vida parasitária. Quando os ixodídeos não estão fixos a um hospedeiro, podem estar por exemplo na vegetação à espera de hospedeiro, chamamos a esta fase de vida livre (Sonenshine & Roe, 2014).

a) Ciclo de vida com três hospedeiros (trifásico)

Este ciclo de vida é o mais comum. Inicia-se com a eclosão de cada ovo numa larva hexápode que, após efetuar uma refeição de sangue, num primeiro hospedeiro, abandona o mesmo e esconde-se no solo, onde atinge o estado de ninfa. Apresentam uma única fase ninfal em que já têm quatro pares de patas, mas ainda não é visível o poro genital. Esta ninfa vai alimentar-se num segundo hospedeiro e após abandoná-lo emerge como carraça adulta, onde já é possível identificar dimorfismo sexual (Figura 1.4) (Walker et al., 2003).

A gametogénese é iniciada durante a alimentação de sangue num terceiro hospedeiro e o acasalamento ocorre apenas durante a alimentação em um hospedeiro vertebrado, salvo exceções. Após a cópula o macho morre, por fim o ciclo termina com a postura dos ovos por parte de uma fêmea ingurgitada (aumentando o seu volume até 100 vezes), que se liberta do hospedeiro e efetua a postura diretamente no solo, em fendas, no interior das tocas ou dos ninhos dos animais que parasitam. A postura pode variar entre centenas a milhares de ovos, consoante a espécie. Quando a postura termina a fêmea morre (Estrada-Peña, 2015).

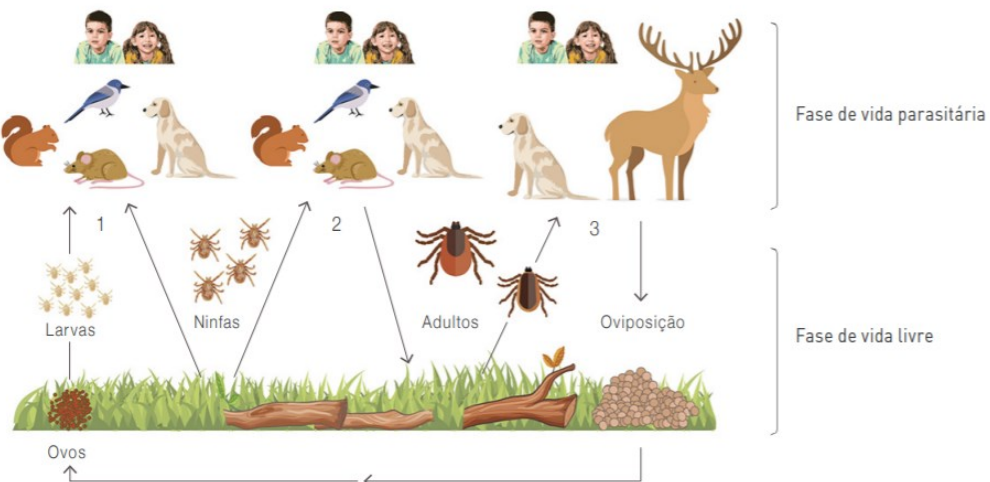


Figura 1.4- Ciclo de vida de um ixodídeo com três hospedeiros (trifásico). (Retirado de Santos Silva et al., 2016)

b) Ciclo de vida com um (monofásico) e dois hospedeiros (difásico)

Estes são ciclos de vida menos comuns. No ciclo de vida num único hospedeiro, as três fases ativas alimentam-se no mesmo hospedeiro, onde ocorrem as mudas. Assim, o ciclo de vida monofásico dá-se na íntegra num único hospedeiro. Este tipo de ciclo de vida é geralmente muito rápido, demorando cerca de três semanas. No caso do ciclo de vida com dois hospedeiros, as larvas e as ninfas alimentam-se no mesmo hospedeiro, mas o adulto procura um novo hospedeiro (Walker et al., 2003).

c) Hospedeiros

Os hospedeiros (animais domésticos e selvagens), tem um papel principal no ciclo de vida destes artrópodes, uma vez que deles dependem a refeição sanguínea para que possam sobreviver e dar continuidade ao ciclo. As diferentes fases evolutivas dos ixodídeos costumam ter diferentes preferências do hospedeiro e padrões de alimentação (Dennis & Piesman, 2005; Parola & Raoult, 2001). Algumas espécies de ixodídeos são específicas do hospedeiro (monotrópico), alimentando-se apenas num número limitado de animais. Outros têm hospedeiros diferentes para cada fase evolutiva e a especificidade do hospedeiro pode variar entre as diferentes fases na mesma espécie (politrópico).

Por exemplo, todas as fases de desenvolvimento de *Ixodes ventraloi* são comumente encontrados a parasitar o coelho-europeu (*Oryctolagus cuniculus*) (Sofia Santos & Margarida Santos-Silva, 2019).

No caso de *Ixodes ricinus*, as fases imaturas ficam perto do solo húmido, devido à sua baixa tolerância à dessecação e parasitam pequenos mamíferos, aves e lagartos, enquanto os adultos tem mais tolerância ao ambiente, alimentam-se em hospedeiros maiores, como ruminantes, cães e carnívoros selvagens (Dennis & Piesman, 2005; Estrada-Peña et al., 2004).

1.1.4. Ixodídeos como vetores de agentes patogénicos

Os ixodídeos estão associados à transmissão de uma grande variedade de microrganismos patogénicos, quer ao Homem quer aos animais, como por exemplo: vírus (e.g. TBE, CCHF), bactérias (e.g. *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp.) protozoários (e.g. *Babesia* spp., *Theleiria* spp. *Hepatozoon* spp.) e fungos (*Isaria farinosa*, *Lecanicillium lecanii*) (Sonenshine & Roe, 2014).

A infeção de um ixodídeo com um microrganismo patogénico pode ocorrer através de: alimentação num hospedeiro vertebrado infetado; transmissão transtadial, onde o microrganismo é passado pelas várias fases evolutivas, uma vez que o processo de muda não envolve a regeneração total dos órgãos do ixodídeo; transmissão transovárica, quando há invasão dos microrganismos no sistema reprodutor da fêmea, que por sua vez é passado para os ovos (Sonenshine & Roe, 2014) e ainda por *co-feeding*, é quando há transmissão de um agente durante alimentação conjunta de um ixodídeo infetado com um ixodídeo não infetado, no mesmo hospedeiro (Socolovschi et al., 2009a).

Estes microrganismos são mantidos na natureza através de ciclos naturais (silváticos/enzoóticos) que envolvem os ixodídeos e hospedeiros vertebrados suscetíveis (hospedeiros reservatórios), como por exemplo roedores e outros mamíferos silváticos. Em alguns casos, o ixodídeo não é apenas o vetor mas também o reservatório desses microrganismos, como é o caso das bactérias do género *Rickettsia*, onde conseguem manter a infeção por transmissão transovárica, passando a bactéria de geração em geração (Socolovschi et al., 2012).

A transmissão dos agentes patogénicos a um hospedeiro vertebrado, acontece na maior parte das vezes por inoculação de secreções salivares (picada da carraça infetada), porém depende da natureza desse agente, podendo ocorrer de outras formas, por exemplo, através de contacto com sangue infetado das peças bucais do ixodídeo, ou até mesmo com fezes ou fluídos corporais, se ocorrer esmagamento do ixodídeo e ainda por deglutição de um ixodídeo infetado (Silva et al., 2006).

Para avaliar a transmissão de um agente patogénico por um ixodídeo ou outro artrópode vetor, são considerados dois parâmetros principais: a capacidade vetorial e a competência vetorial. A capacidade vetorial é a capacidade que determinada espécie tem para transmitir o agente patogénico no tempo e no espaço. A competência vetorial é a capacidade intrínseca, que um determinado organismo tem para manter a infeção e transmitir biologicamente o agente durante a alimentação (Silva et al., 2006).

Para a maioria dos microrganismos, os ixodídeos funcionam como vetores biológicos, ou seja, estes agentes multiplicam-se dentro dos seus tecidos, uma vez que dependem deste para grande parte do seu ciclo de desenvolvimento. Contudo, para haver transmissão é necessário que haja um período entre a aquisição do agente patogénico pelo ixodídeo e a sua multiplicação nos órgãos, para posteriormente ser excretado através das glândulas salivares.

O sucesso dos ixodídeos como vetores de agentes patogénicos deve-se a várias características biológicas e comportamentais que estão sumarizadas no quadro 1.1.

Quadro 1.1- Características biológicas mais importantes, que tornam os ixodídeos bons vetores de agentes patogénicos. (Adaptado de Silva et al., 2006)

| Ixodídeos | Características biológicas |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Hematófagos obrigatórios |
| | Todas as fases evolutivas necessitam de ingerir grandes quantidades de sangue |
| | Transmissão transtadial e transovárica de microrganismos patogénicos |
| | Sistema sensorial extremamente desenvolvido que identificam odores do hospedeiro |
| | Forte fixação ao hospedeiro e por longos períodos de tempo, passando despercebidos uma vez que a picada é indolor |
| | Digestão gradual e intracelular, que ocorre sem a presença de enzimas no lúmen intestinal |
| | Diapausa |
| | Parasitam mais que um hospedeiro no seu ciclo de vida, aumentando assim a probabilidade de infeção e transmissão |
| | Distribuição geográfica mundial, e elevadas taxas de reprodução |

1.1.5.Principais espécies de ixodídeos em Portugal e a sua distribuição geográfica

Portugal apresenta condições climáticas, ecológicas e ambientais favoráveis ao ciclo de vida de várias espécies de ixodídeos (Silva et al., 2006). Estão identificados cinco géneros de ixodídeos: *Rhipicephalus* Koch, 1844; *Dermacentor* Koch, 1844; *Hyalomma* Koch, 1844; *Ixodes* Latreile, 1795 e *Haemaphysalis* Koch, 1844. Das 22 espécies de ixodídeos presentes em Portugal, as seis espécies mais prevalentes em Portugal são *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. marginatum*, *H. lusitanicum*, *R. sanguineus* e *Ixodes ricinus*. *R. sanguineus*, e *I. ricinus*, são as duas espécies mais frequentemente encontradas a picar o Homem (hospedeiro acidental) (Santos Silva M et al., 2016; Santos-Silva et al., 2011).

No quadro 1.2 são descritas as prevalências encontradas para cada espécie de ixodídeo, referentes a Portugal continental no âmbito do programa da Rede Nacional de Vigilância de Vetores (REVIVE). Neste quadro estão também referidas as áreas geográficas, período de maior atividade e hospedeiros preferenciais. De referir que todas estas espécies foram encontradas a picar o homem.

Quadro 1.2- Espécies de ixodídeos mais abundantes, a sua distribuição, período de maior atividade e hospedeiros preferenciais em Portugal continental, no âmbito do REVIVE 2011-2018. (Adaptado de Santos Silva M et al., 2016)

| Espécie de ixodídeo | Abundância relativa (%) | Distribuição geográfica | Período de maior atividade (Adultos/imaturos) | Hospedeiros preferenciais |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <i>D. marginatus</i> | 2,5 | Todo o país | Outubro a Março/Agosto | Mamíferos domésticos e silváticos (artiodáctilos) |
| <i>D. reticulatus</i> | 1,6 | Região Norte | Outubro e Março/ Agosto | Ungulados selvagens |
| <i>H. lusitanicum</i> | 1,4 | Região Sul | Abril e Agosto/ Agosto, Setembro | Animais domésticos de produção, leporídeos, insectívoros e carnívoros selvagens |
| <i>H. marginatum</i> | 4,1 | Todo o país | Março a Agosto/ Agosto, Setembro | Ungulados selvagens/ domésticos e aves terrestres |
| <i>I. ricinus</i> | 2,6 | Todo o país | Outubro a Abril/ Fevereiro e Junho/Julho | Mamíferos domésticos e silváticos |
| <i>R. sanguineus</i> | 78,3 | Todo o país | Maio a Setembro/ Junho a Setembro | Animais silváticos e todas as espécies de animais domésticos (cão) |

Género *Rhipicephalus*

Neste género encontra-se uma das espécies de maior importância no nosso País, a espécie *R. sanguineus* que é a mais abundante em Portugal e a mais comum encontrada em cães nas áreas urbanas de todo o mundo. O cão é o seu hospedeiro principal, mas pode também ser encontrado em outros mamíferos domésticos e selvagens (carnívoros, ungulados, insectívoros, lagomorfos). Do ponto de vista biológico, tem um ciclo trifásico e ditrópico, ou seja, as formas adultas são exofílicas e as imaturas endofílicas, habitando os locais onde os hospedeiros se abrigam. É uma espécie adaptada a temperaturas mais elevadas e não é exigente quanto à humidade relativa, sobrevivendo em climas secos, sendo assim encontrada em maior número nos meses do verão. Esta espécie está implicada na transmissão de vários microrganismos patogénicos como por exemplo *Babesia vogali*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia conorii* entre outras (Dantas-Torres & D. Ortranto, 2017).

Para além desta espécie, em Portugal existem mais três espécies neste género, onde destacamos *R. bursa*, que se distribui por toda a região mediterrânica e tem um ciclo de vida de apenas dois hospedeiros. É frequentemente encontrado a parasitar ovelhas, cabras, gado bovino, cavalos, burros e ungulados selvagens. *R. bursa* tem um padrão de atividade sazonal muito acentuado, uma vez que os adultos são ativos no meio do verão e os imaturos no outono/inverno. *R. bursa* está associado a casos de infeção por *Babesia* spp. em pequenos ruminantes (Esmailnejad et al., 2014). Algumas espécies de *Rickettsia*, como por exemplo *R. massiliae* (Pereira et al., 2018) e vírus (Vatansever, 2017) foram reportadas nesta espécie. *R. bursa* é vetor da espécie de *Rickettsia* designada PoTiRb169 descrita pela primeira vez em Portugal e posteriormente designada *Candidatus R. barbarie* pertencendo ao complexo da *R. sibirica* (De Sousa et al., 2006).

A terceira espécie é *R. pusillus*, uma espécie encontrada na região Paleártica, mais especificamente nas áreas de clima Mediterrânico. Esta carraça apresenta um ciclo trifásico, onde as fases imaturas alimentam-se particularmente em lagomorfos (*Oryctolagus cuniculus*) e as fases adultas são mais comuns em vários mamíferos, tanto domésticos (e.g. gatos) como selvagens (carnívoros, lagomorfos ungulados, insetívoros) (Santos-Silva, 2017b). Em Portugal, *R. pusillus* foi encontrado a alimentar-se em humanos, o que pode estar relacionado com a introdução desta espécie no ambiente doméstico devido às atividades dos caçadores e os seus cães (Santos-Silva et al., 2011). Esta espécie é conhecida por ser vetor de *R. sibirica mongolitimona* associada a doença no Homem (De Sousa et al. 2006).

Género *Dermacentor*

Em Portugal são detetadas duas espécies desde género, onde *D. marginatus* é a espécie mais frequente e com uma grande variedade de hospedeiros. Esta espécie está presente na Europa, Norte de África e Ásia e de Norte a Sul de Portugal. Do ponto de vista biológico, é uma espécie de ciclo trifásico e ditrópico onde as fases imaturas são endofílicas e alimentam-se em roedores, insetívoros e principalmente artiodáctilos (e.g. javali). As fases adultas são exofílicas e são mais encontradas a

parasitar carnívoros e ungulados. Normalmente a densidade populacional das fases adultas é mais elevada nos meses de inverno, enquanto que as fases imaturas são mais frequentes no verão (S. Hornok, 2017). Os adultos também se alimentam em humanos, principalmente na região do couro cabeludo (De Sousa et al., 2013). Esta espécie está associada à transmissão de *R. slovaca* (Bacellar et al., 1995) e *Borrelia lusitaniae* (Baptista et al., 2004).

D. reticulatus é a segunda espécie mais frequente em Portugal, estando presente na Europa e Ásia. Em Portugal ocorre na região Norte do país, tem um ciclo trifásico e parasita essencialmente ungulados selvagens. Tal como o *D. marginatus*, as fases adultas estão ativas em particular no outono-inverno e as imaturas nos meses de verão. *D. reticulatus* é um vetor competente de várias espécies de microrganismos importantes em termos de saúde pública, como por exemplo *Francisella tularensis* e *R. raoultii* (Hornok, 2017).

Género *Hyalomma*

Em Portugal são encontradas apenas duas espécies deste género, *Hyalomma marginatum* que apresenta uma larga distribuição geográfica, nomeadamente Europa, Norte de África e algumas partes da Ásia. Do ponto de vista biológico, é uma espécie exofílica com um ciclo de vida de dois hospedeiros (Valcárcel et al., 2020). As fases adultas parasitam uma grande variedade de mamíferos, principalmente ungulados selvagens e domésticos. As fases imaturas alimentam-se em pequenos mamíferos, aves terrestres (Santos-Silva et al., 2006) e acidentalmente em humanos (CEVDI, 2021). Em Portugal está distribuído em todo o país com prevalência mais elevada na região Sul. Esta espécie é vetor de vários microrganismos de importância em saúde pública, como bactérias do género *Rickettsia*, como por exemplo *R. aeschlimannii* (Santos-Silva et al., 2006), sendo também vetor do vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo (Estrada-Peña, 2012).

A segunda espécie encontrada em Portugal é o *Hyalomma lusitanicum* que tem distribuição restrita ao Sul da Europa e Norte de África. Biologicamente, é uma espécie de ciclo trifásico, exofílica. Todas as fases desta espécie estão ativas no período primavera-verão e parasitam principalmente animais de produção e vários animais silváticos (carnívoros selvagens, roedores, lagomorfos). Esta espécie demonstra antropofagia relativamente ao Homem ao contrário do que é muitas vezes descrito na bibliografia (Santos-Silva, 2017a).

Género *Ixodes*

No género *Ixodes*, *I. ricinus* é a espécie de maior importância médica, em expansão mundial em termos de latitude e altitude, como consequência das alterações climáticas. Deste facto resultaram novas áreas de habitat e colonização, assim como uma mudança na dinâmica sazonal do ixodídeo (Gray et al., 2009). Em Portugal, está presente em todos os distritos. Em termos ecológicos é uma espécie que

depende muito da temperatura e humidade do ar e por isso usa mecanismos de defesa como a diapausa. É uma espécie com um ciclo de vida de três hospedeiros, exofílica e politrópica, com uma grande capacidade de adaptação a vários hospedeiros. Parasita mamíferos silváticos/domésticos, aves e alguns lacertídeos e é também detetada a picar o Homem com alguma frequência. Normalmente tem atividade todo o ano, porém com alguma sazonalidade (Santos-Silva et al., 2011). No nosso país, *I. ricinus* é vetor de *Borrelia* spp., *R. helvetica*, *R. monacensis* e *Anaplasma phagocytophilum* (De Carvalho et al., 2008; De Sousa et al., 2012; Milhano et al., 2010; Nunes et al., 2015).

Para além desta, existem mais dez espécies de *Ixodes* em Portugal, onde se inclui *Ixodes ventalloi* que é uma espécie paleártica encontrada na península ibérica, no Norte da África e Sul de França. Esta espécie é comumente encontrada no coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*), o seu hospedeiro principal. No entanto pode ser encontrado noutros lagamorfs, em roedores, carnívoros e raramente em aves. Tem um ciclo de vida de três hospedeiros e é considerada uma carraça endofílica por viver nos ninhos do seu hospedeiro principal (Sofia Santos & Margarida Santos-Silva, 2019). Foram detetados até ao momento vários microrganismos patogénicos, tais como *A. phagocytophilum* (Santos et al., 2004), *R. helvetica* (Santos-Silva et al., 2006) entre outros, nesta espécie.

Género *Haemaphysalis*

Em Portugal existem três espécies deste género, sendo *Haemaphysalis punctata* a espécie que se destaca. Esta espécie já foi observada numa variada gama de animais domésticos, silváticos e em aves. No entanto, até ao momento, não há registos da sua presença no Homem. *H. punctata* encontra-se em zonas frias e húmidas, ocorrendo em biótopos idênticos aos preferidos por *I. ricinus* (Silva et al., 2006).

1.2. Pulgas

As pulgas são insetos hematófagos, sem asas, que têm a capacidade de parasitar uma ampla variedade de hospedeiros. Estes pequenos parasitas externos pertencem à Classe Insecta, Ordem Siphonaptera e podem ser encontrados numa gama de habitats e hospedeiros, como por exemplo mamíferos ou até mesmo aves. O seu ciclo de vida apresenta três fases (ovo, larva e pupa) que são afetados pela temperatura e humidade relativa do habitat (Service, 2012).

As pulgas apresentam uma dispersão mundial, com mais de duas mil espécies conhecidas, porém a maioria das espécies não constitui perigo para a saúde pública, uma vez que só uma minoria são espécies sinantrópicas. Estes insetos podem ser vetores de alguns microrganismos patogénicos e, como parasitas, podem causar graves dermatites alérgicas nos seus hospedeiros onde se alimentam (Bitam et al., 2010).

Os microrganismos transmitidos por pulgas apresentam uma distribuição mundial em focos de doenças endémicas. Importantes mudanças ou distúrbios na ecologia vetor-hospedeiro, devido por exemplo a mudanças ambientais e/ou de comportamento humano, pode levar a um ressurgimento de várias doenças transmitidas por pulgas de forma epidémica (Bitam et al., 2010). Por exemplo, em 1996 ações de exterminação de ratos na Ilha de Porto Santo no Arquipélago da Madeira, levaram a um surto de tifo endémico, uma vez que, o extermínio dos ratos levou ao desequilíbrio entre o hospedeiro (rato) e vetor (pulga *Xenopsylla cheopis*), fazendo com que as pulgas começassem a alimentar-se no Homem (Bacellar et al., 1998).

1.3. Piolhos e moscas hipoboscídeos que parasitam animais

Os piolhos são artrópodes que pertencem à classe Insecta, e são classificados em dois grupos: subordem Anoplura (hematófagos estritos) e subordem Mallophaga (piolhos mastigadores). São conhecidos por parasitar principalmente mamíferos, aves e em alguns casos o Homem (Marquardt & Kondratieff, 2005).

As moscas hipoboscídeos pertencem à família Hippoboscidae (Ordem: Diptera), que inclui espécies de ectoparasitas com distribuição mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (Reeves & Lloyd, 2019). Os hipoboscídeos, são hematófagos obrigatórios, alimentam-se geralmente em mamíferos e aves. São conhecidos como mosca piolho e são potenciais vetores de alguns microrganismos patogénicos. Os hipoboscídeos normalmente não picam o Homem, mas pode acontecer ocasionalmente no manuseamento de animais. Só mais recentemente têm sido feitos estudos mais aprofundados sobre estes insetos, no que respeita à pesquisa de agentes patogénicos para o Homem. Foram detetados alguns agentes de importância médica e veterinária (Bezerra-Santos & Otranto, 2020; Hornok et al., 2011). Por exemplo, *Bartonella* spp. têm sido relatada em várias espécies de hipoboscídeos (Bezerra-Santos & Otranto, 2020; Chomel & Kasten, 2010; De Bruin et al.,

2015), também DNA de *R. raoultii* e *R. slovaca* foi identificado em *Melophagus ovinus* (Liu, D, et al. 2016). Dado as descobertas de agentes patogénicos nestes artrópodes, é importante investigar sobre o potencial zootico dos patogénicos no ciclo de vida destes insetos e qual sua capacidade vetorial.

1.4. Importância médica e veterinária dos ixodídeos e outros artrópodes vetores

Os ectoparasitas hematófagos são importantes vetores na transmissão de microrganismos ao Homem e a outros animais. Contudo, só por si, a própria picada do artrópode vetor e a sua alimentação (mesmo quando este não está infetado), pode provocar inflamação na pele e prurido, assim como reações alérgicas. Um desses exemplos é a paralisia por carraça, causada por uma reação do nosso organismo a substâncias neurotóxicas e alérgicas existentes na saliva da carraça. Por outro lado, a elevada parasitação por estes ectoparasitas em animais, nomeadamente ixodídeos e o elevado consumo de sangue, pode levar à ocorrência de anemia e à degradação do estado de saúde do animal (González-Acuña & Guglielmo, 2005).

Embora os ixodídeos sejam zoofíticos, ou seja, tenham preferência por parasitar animais selvagens e domésticos, ocasionalmente, algumas espécies de ixodídeos são encontrados a parasitar o Homem. Este parasitismo acontece quando o Homem frequenta ambientes onde existem ixodídeos, nomeadamente quando este, por exemplo, pratica atividades como pastorícia, agricultura, etc., ou em momentos de lazer (campismo, caça, etc.). Por outro lado, o contacto com diversos mamíferos domésticos (e.g. cão) também pode favorecer esse contacto, uma vez que esses animais podem transportar os ectoparasitas para perto de si, como por exemplo para o interior de casa (Silva et al., 2006).

No quadro 1.2 estão referidos os principais agentes patogénicos associados a ixodídeos e a pulgas, que já foram encontrados a causar doença no Homem. No que se refere aos animais, existem vários agentes associados a ixodídeos que causam doença nos animais, como *Theileria*, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Bartonella* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., entre outros (Álvarez-Fernández et al., 2018; Baneth, 2011; Otranto et al., 2015; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Quadro 1.3- Principais agentes patogênicos para o Homem transmitidos por vetores (ixodídeos e pulgas). (Adaptado de CEVDI, 2021)

| | Agente infeccioso | Doença | Espécie do vetor |
|------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ixodídeos | <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | Anaplasmosse humana | <i>Ixodes ricinus, I. ventraloi</i> |
| | <i>Babesia divergens</i> | Babesiose | <i>Ixodes</i> spp. |
| | <i>Borrelia aligera</i> | - | <i>I. ricinus</i> |
| | <i>B. afzelii</i> | Borreliose de Lyme | <i>I. ricinus</i> |
| | <i>B. burgdorferi</i> s.s | Borreliose de Lyme | <i>I. ricinus</i> |
| | <i>B. bissettii</i> | Borreliose de Lyme | <i>Ixodes</i> spp. |
| | <i>B. garinii</i> | Borreliose de Lyme | <i>Ixodes</i> spp. |
| | <i>B. lusitaniae</i> | Borreliose de Lyme | <i>I. ricinus</i> |
| | <i>B. miyamotoi</i> | Sem denominação | <i>I. ricinus</i> |
| | <i>B. spielmanii</i> | Borreliose de Lyme | <i>Ixodes</i> spp. |
| | <i>B. turdi</i> | - | <i>I. ricinus, I. frontalis</i> |
| | <i>B. valaisiana</i> | Borreliose de Lyme | <i>I. ricinus</i> |
| | <i>Coxiella burnetii</i> | Febre Q | <i>Ixodes</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp., <i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i> |
| | <i>Francisella tularensis</i> | Tularémia | <i>I. ricinus, D. reticulatus</i> |
| | <i>Rickettsia aeschlimannii</i> | Sem denominação | <i>H. marginatum</i> |
| | <i>R. conorii</i> | Febre escaro-nodular | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> |
| | <i>R. helvetica</i> | Sem denominação | <i>Ixodes</i> spp. |
| | <i>R. massiliae</i> | Sem denominação | <i>R. sanguineus</i> |
| | <i>R. monacensis</i> | Sem denominação | <i>I. ricinus</i> |
| | <i>R. raoultii</i> | Sem denominação | <i>Dermacentor</i> spp. |
| <i>R. sibirica mongolitimona</i> | LAR* | <i>Hyalomma</i> spp., <i>R. pusillus</i> | |
| <i>R. slovacica</i> | TIBOLA† | <i>D. marginatus, D. reticulatus</i> | |
| Vírus da Febre Hemorrágica Crimeia-Congo | Febre hemorrágica | <i>Hyalomma</i> spp. | |
| Vírus Eyach | Sem denominação | <i>I. ricinus, I. ventraloi</i> | |
| Vírus TBE | Encefalite | <i>I. ricinus, H. punctata</i> | |
| Pulgas | <i>R. felis</i> | Sem denominação | <i>Ctenocephalides felis</i> |
| | <i>R. typhi</i> | Tifo murino ou endêmico | <i>Xenopsylla cheopis, C. felis, Leptopsylla segnis</i> |
| | <i>R. asemboensis</i> | Sem denominação | <i>C. felis</i> |
| | <i>Bartonella henselae</i> | Bartonelose | <i>C. felis</i> |

* LAR - *Lymphangitis-associated rickettsiosis*; † TIBOLA - *Tick-borne lymphadenopathy*

2. Rickettsias e outros agentes patogénicos associados a vetores

2.1. *Rickettsia*

2.1.1. Enquadramento histórico

Em 1909, o investigador americano Howard Taylor Ricketts identifica pela primeira vez o agente etiológico responsável pela febre das Montanhas Rochosas e estabelece o papel da carraça na transmissão do agente ao Homem (Ricketts, 1909). Só mais tarde, em 1916, o termo *Rickettsia* é utilizado pelo microbiologista Rocha Lima em homenagem aos investigadores que morreram de outra rickettsiose, o tifo epidémico (*Rickettsia prowazekii*) durante as suas pesquisas, o americano Ricketts e o austríaco Von Prowazek.

Foi só um século depois da descrição das duas *Rickettsias* mais patogénicas, *R. rickettsii* (1906) do grupo das febres exantemáticas (GFE) e *R. prowazekii* do grupo do tifo (GT), que a maior parte das 20 espécies de *Rickettsia* (a maioria do GFE) foram descritas (Parola, 2005). Foi a partir da década de 80, com o desenvolvimento da biologia molecular, que a maior parte das rickettsias foram caracterizadas e novas espécies foram descritas. Hoje em dia conhecem-se mais de 20 espécies a causar doença no Homem (De Sousa R., 2007; Piotrowski & Rymaszewska, 2020).

2.1.2. Taxonomia e classificação

As rickettsias são α – proteobactérias da ordem Rickettsiales. Esta ordem engloba três famílias Rickettsiaceae, Anaplasmataceae e Holosporaceae (Yu & Walker, 2005). Dentro da família Rickettsiaceae encontramos o género *Orientia*, com apenas um agente etiológico encontrado em ácaros (*O. tsutsugamushi*) e o género *Rickettsia* (Tamura et al., 1995), que engloba mais de 20 espécies consideradas patogénicas para o Homem (Piotrowski & Rymaszewska, 2020).

Classicamente existem dois grandes grupos: o grupo do tifo (TG) e das febres exantemáticas (GFE). O GFE abrange a maioria das espécies de rickettsias patogénicas (e.g. *R. conorii*) e outras que ainda não foram associadas a doença no Homem. A maior parte são transmitidas por ixodídeos, à exceção de *R. akari* e de *R. felis* transmitidas por ácaro e pulga, respetivamente. O GT é composto apenas por duas espécies patogénicas para o Homem, *R. prowazekii* transmitida por o piolho do corpo e *R. typhi* transmitida pela pulga do rato (Yu & Walker, 2005). Atualmente, com os avanços na biologia molecular e com a análise do genoma completo, alguns autores têm sugerido a divisão em quatro grupos dentro do género *Rickettsia*. Um grupo ancestral (GA) que inclui *R. bellii* e *R. canadensis* e um grupo transicional (GTR), que inclui *R. akari*, *R. australis* e *R. felis* (Fuxelius et al., 2007; Gillespie et al., 2007)(Figura 1.5). Contudo, esta classificação não é consensual entre os rickettsiologistas (Shpynov et al., 2018).

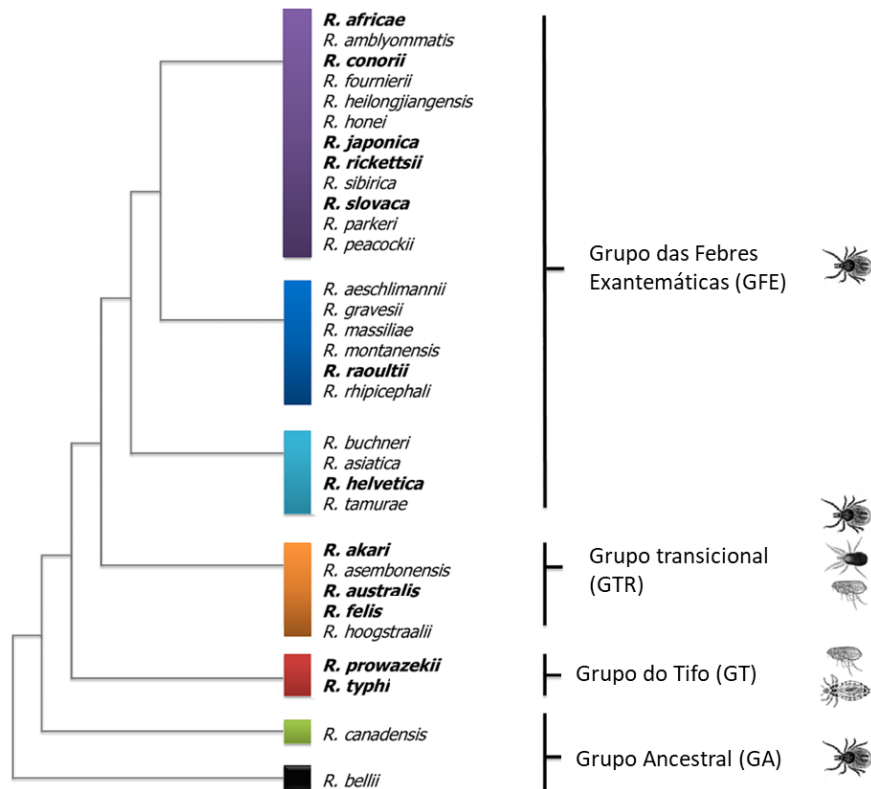


Figura 1.5 - Árvore filogenética de espécies de *Rickettsia*, inferida da comparação de sequências concatenadas dos genes *gltA* e *sca 4*. (Adaptado de Sekeyová et al., 2019).

2.1.3. Morfologia e fisiologia

As rickettsias são pequenos cocobacilos Gram-negativos, intracelulares obrigatórios, que se multiplicam por divisão binária, livremente no citoplasma e ocasionalmente no núcleo de células eucarióticas (Figura 1.6) (Yu & Walker, 2005). Este estilo de vida deu origem a adaptações únicas, como por exemplo, a redução do metabolismo bacteriano e a exploração de metabólitos do hospedeiro, ou seja, esta vai atuar como “parasita”, aproveitando-se do ATP, aminoácidos e açúcares fosforilados através de transporte ativo (Perlman et al., 2006). Como consequência da sua evolução para um nicho intracelular, a *Rickettsia* tem um genoma pequeno de cerca de 1,2MB e muitas das vias biossintéticas *de novo*, características de bactérias de vida livre, já não estão presentes nas rickettsias (Sachman-Ruiz & Quiroz-Castañeda, 2018).

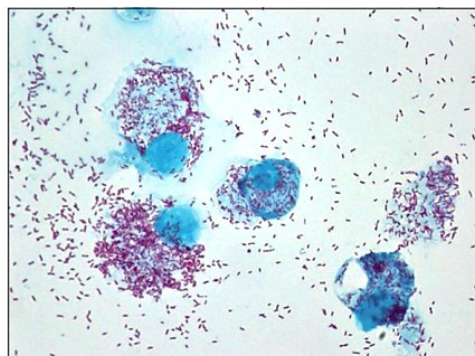


Figura 1.6- *Rickettsia* spp. em células Vero visualizadas através da coloração de Giménez. (Retirado de Oteo et al., 2014)

2.1.4. Ecologia e epidemiologia

O género *Rickettsia* está distribuído em todo o mundo e a sua distribuição está relacionada com os seus vetores específicos (Parola et al., 2013). Estas bactérias são mantidas na natureza através de artrópodes vetores, como carraças, pulgas, piolhos, ácaros e dos seus hospedeiros. Porém, a maior parte das espécies de *Rickettsia* está associada à transmissão por ixodídeos, considerados vetores e reservatórios do agente (Merhej et al., 2014; Socolovschi et al., 2009a).

As rickettsias são ingeridas pelos ixodídeos durante a sua refeição sanguínea num hospedeiro rickettsiémico. Depois de ingeridas e de passarem para o intestino médio e os seus divertículos, a digestão envolve vários processos, como por exemplo a lise dos eritrócitos no intestino e a digestão intracelular de proteínas e lípidos. As rickettsias multiplicam-se nas células epiteliais do intestino do ixodídeo e pensa-se que, de forma similar ao que acontece no homem, as rickettsias interagem com recetores de superfície para escapar à “resposta imunitária” da própria carraça. O papel do intestino médio na replicação destes agentes é crucial para uma disseminação com sucesso das rickettsias, através da saliva ou das fezes. Quando se escapam das células epiteliais do intestino, as rickettsias invadem a hemolinfa e os hemócitos (presentes na hemolinfa), disseminando-se a todos os órgãos, invadindo as células das glândulas salivares, multiplicando-se nos ácinos e ductos das células. As glândulas salivares têm por isso, um papel importante na multiplicação das rickettsias e não apenas como órgão de armazenamento. Paralelamente as rickettsias invadem também os ovários. O desenvolvimento das rickettsias nas células intersticiais dos ovários, proporciona que ocorra a transmissão transovárica das rickettsias durante a postura de uma fêmea infetada (Socolovschi et al., 2009a).

As rickettsias podem ser transmitidas a outros ixodídeos, tanto horizontalmente (transestadial), entre fases do ciclo de vida larva-fêmea ou verticalmente (transovárica), fêmea infetada-ovos-larvas infetadas (Socolovschi et al., 2009a, 2012).

A prevalência de infeção de diferentes espécies de *Rickettsia* em populações de ixodídeos é variável e depende de vários fatores, como por exemplo da patogenicidade da espécie. Um exemplo disso é a espécie *R. conorii*, uma das rickettsias mais patogénicas para o Homem, que apresenta um efeito deletério também nas células do seu vetor (Levin et al., 2009; Santos et al., 2002; Socolovschi et al., 2012), o que pode explicar o facto desta espécie ser encontrada com menos frequência, comparativamente com outras espécies menos patogénicas, o que é o caso de *R. massiliae*, não obstante o vetor seja o mesmo, neste caso o ixodídeo da espécie *R. sanguineus*.

Na figura 1.7 apresentam-se as prevalências de infeção por espécie de *Rickettsia* e diferentes espécies de ixodídeos, encontradas no âmbito da Rede Nacional de Vigilância de Vetores (REVIVE), durante o período de 2011 a 2018.

Existe também uma especificidade relativa entre determinadas espécies de ixodídeos e das espécies de rickettsias que estes transmitem. No caso das rickettsias, temos vários exemplos: *R. aeschlimannii*

está associada à espécie *H.marginatum*, enquanto *R. slovacica* é encontrada em *D.marginatum* e *D. reticulatus*. Este aspeto, porém, é transversal a outros vetores e agentes.

O género *Rickettsia* tem uma distribuição global, mas a maioria das espécies deste género está condicionada pela distribuição geográfica das espécies de vetores e hospedeiros, assim como das condições climáticas de cada região (Parola e Raoult 2001).

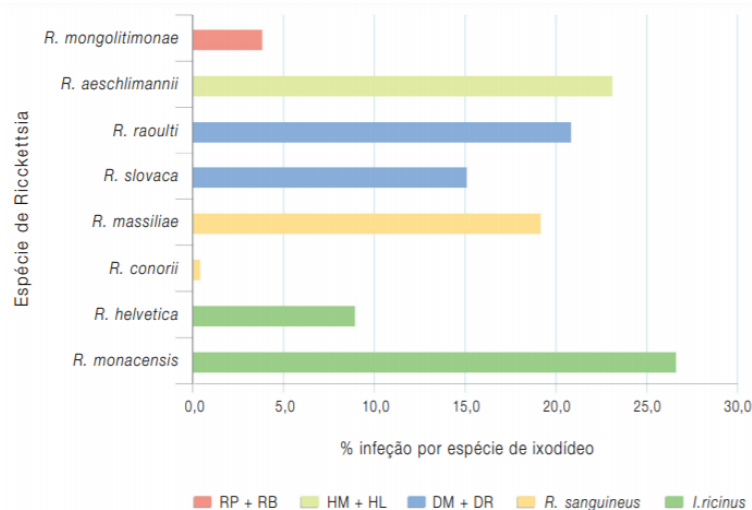


Figura 1.7 - Prevalência de infecção por *Rickettsia* spp. em ixodídeos colhidos no âmbito do REVIVE no período de 2011-2018. (Retirado de De Sousa, 2019). (RP: *R. pusillus*; RB: *R. bursa*; HM: *H. marginatum*; HL: *H. lusitanicum*; DM: *D. marginatum*; DR: *D. reticulatus*).

As rickettsias são transmitidas ao homem através de picada de uma carraça infetada, ou através de contaminação das mucosas com macerados de ixodídeos infetados (Brissos et al., 2015), mas para a transmissão ocorrer, são precisas entre 6-20 horas de parasitação pelo artrópode vetor. Os humanos não desempenham qualquer papel no ciclo de vida deste agente, sendo considerado um hospedeiro acidental, não contribuindo para a manutenção deste microrganismo na natureza (De Sousa, 2019).

Nem todas as espécies de *Rickettsia* são patogénicas para o Homem, sendo algumas delas consideradas endossimbiontes. Por outro lado, algumas destas espécies de *Rickettsia* só foram consideradas patogénicas passado algum tempo após serem descritas, quando encontradas a causar doença no Homem (Perlman et al., 2006). As relações de simbiose próximas entre vetores e microrganismos podem ser uma fonte relevante de novos agentes patogénicos emergentes (Swei et al., 2020).

2.1.5. Ciclos de transmissão na natureza e hospedeiros

As rickettsias são mantidas em ciclos naturais através dos seus vetores/reservatórios e hospedeiros vertebrados. Normalmente um reservatório vertebrado suscetível, permite que o agente sobreviva e se multiplique com uma duração suficiente para permitir a infeção do vetor durante o processo de alimentação, quando esses vetores parasitam o animal. No caso das rickettsias, à exceção de

pequenos mamíferos como roedores, os ixodídeos são os principais reservatórios de *Rickettsia*, perpetuando a sua infecção através da transmissão transovárica (Figura 1.8) (Martello et al., 2013; Schex et al., 2011). Alguns hospedeiros, como por exemplo o cão, apresentam uma rickettsiemia de pouca duração ou transitória, uma vez que geram uma imunidade ao hospedeiro que limita o seu período de infecciosidade. Para manter eficazmente os ciclos de transmissão, os hospedeiros vertebrados geralmente devem ser abundantes e ser suscetíveis (Dennis & Piesman, 2005).

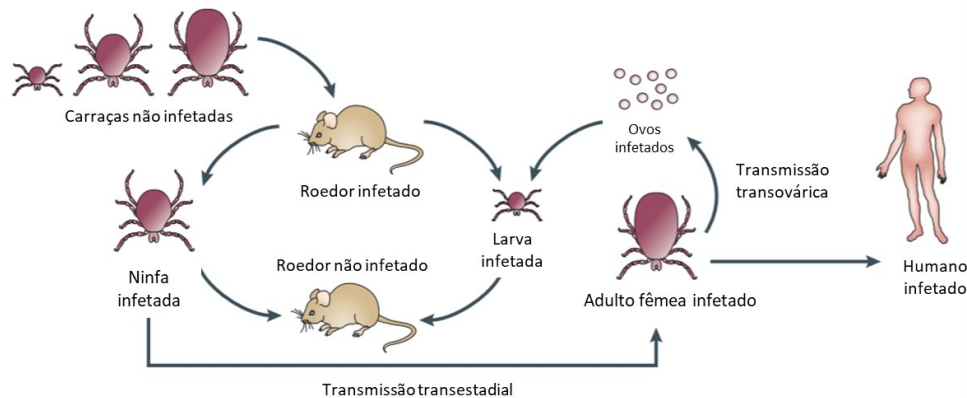


Figura 1.8- Ciclo de transmissão de rickettsias, entre hospedeiros reservatórios (carraca e roedores) e hospedeiro acidental (Homem). (Retirado de Walker & Ismail, 2008)

Várias espécies sinantrópicas, como roedores, pássaros, morcegos e algumas outras espécies de mamíferos como raposas e ouriços, são encontrados dentro do habitat humano e comumente agem como hospedeiros para zoonoses, sendo portadores de vários tipos de ectoparasitas e consequentemente de agentes patogênicos (Hassell et al., 2017; Szekeres et al., 2019) com interesse em saúde pública e veterinária. Por exemplo, no ouriço europeu (*Erinaceus europaeus* e *E. roumanicus*), tem sido relatado a presença nos seus ectoparasitas (pulgas e carracas) de potenciais rickettsias patogênicos para o Homem, nomeadamente *R. asembonensis* e *R. massiliae* (Barradas et al., 2021; Szekeres et al., 2019).

Os animais domésticos como os cães, são o hospedeiro preferencial de *R. sanguineus*, o vetor e reservatório de *R. conorii*. Os cães podem servir de sentinelas, uma vez que eles próprios podem desenvolver doença quando infectados com espécies mais patogênicas (Alexandre et al., 2011). Quando infectados com espécies não patogênicas, na maioria são assintomáticos e desenvolvem uma resposta imune cruzada para infecção com espécies do GFE (Alexandre et al., 2011).

Os gatos, ao contrário dos cães são menos frequentemente parasitados por ixodídeos, por esse motivo o seu papel na eco-epidemiologia das rickettsias é menos estudado. Contudo, encontramos os gatos muitas vezes parasitados por pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* que é o vetor principal da *R. felis*, que pode infectar o Homem e causar doença (Pérez-Osorio et al., 2008). Os gatos podem também ser infectados por outras rickettsias do GFE (Segura et al. 2014).

É de extrema importância lembrar que a vigilância de potenciais microrganismos presentes em animais (selvagens e domésticos) e nos seus ectoparasitas, é crucial na identificação de doenças emergentes.

2.1.6. Rickettsioses

As rickettsias são transmitidas ao Homem através da picada de um ixodídeo infetado, enquanto este efetua a sua refeição sanguínea. A infeção pode também ocorrer ocasionalmente através da contaminação das mucosas pelo conteúdo da carraça infetada (e.g. rebentamento de uma carraça e exposição da mucosa do olho ao conteúdo da carraça infetada). As rickettsias disseminam-se por via hematogénica ou linfática, invadindo em particular as células endoteliais (Figura 1.9B) e causando uma vasculite.

O período de incubação das rickettsioses varia geralmente entre 3-5 dias e caracterizam-se normalmente pela tríade clínica: escara de inoculação (Figura 1.9C), “rash” ou exantema (Figura 1.9A) e febre alta (De Sousa et al., 2008; Parola et al., 2013).

O quadro clínico inicia-se em geral de uma forma brusca ou rapidamente progressiva, e condições como diabetes, alcoolismo crónico, idade avançada, entre outros, são importantes fatores de risco para o prognóstico destas zoonoses (De Sousa et al., 2008).

O atraso no diagnóstico e, conseqüentemente, o atraso na administração de terapêutica específica, está associado a um mau prognóstico da doença. O tratamento de eleição para as rickettsioses é a administração de doxiciclina, um antibiótico de largo espectro da classe das tetraciclina (De Sousa et al., 2008).

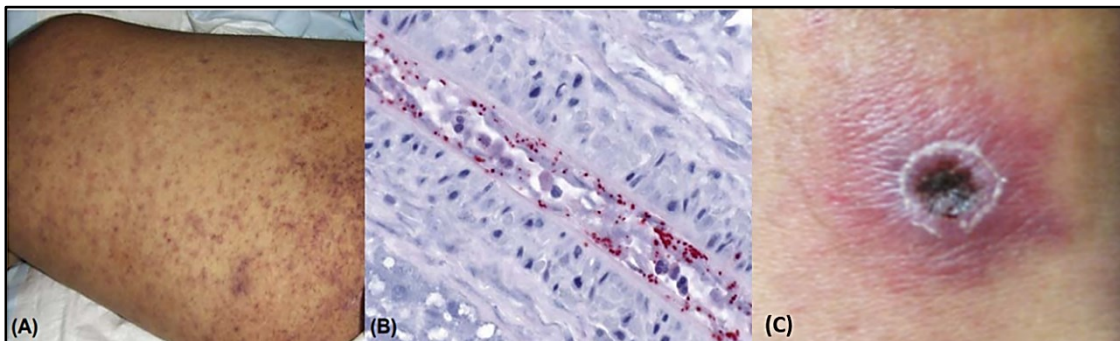


Figura 1.9- Sinais associados a rickettsioses. A) Exantema em paciente com rickettsiose. B) Imagem histológica de *Rickettsia* spp. a vermelho, nas células endoteliais de vaso sanguíneo. C) Escara de inoculação de um doente com rickettsiose. (Retirado de *Center for Disease Control and Prevention*: <https://www.cdc.gov/rmsf/index.html>).

Rickettsioses associadas a ixodídeos

A maior parte das rickettsioses descritas na Europa estão associadas aos ixodídeos. Contudo, é importante referir também a existência de infeções por *R. typhi* transmitida por pulga do rato e a *R. akari* transmitida por ácaros gamasídeos. No quadro 1.4 estão descritas as rickettsioses associadas a ixodídeos descritas na Europa até aos dias de hoje.

Quadro 1.4- Rickettsias patogénicas do grupo das febres exantemáticas identificadas na Europa. (Retirado de De Sousa, 2019).

| Agente etiológico | Doença | Principal artrópode vetor |
|-------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>R. conorii</i> Malish | Febre botonosa | <i>R. sanguineus</i> . |
| <i>Astrakhan fever rickettsia</i> | Febre de Astrakan | <i>R. pumilio</i> |
| <i>Israeli tick typhus</i> | Febre botonosa de Israel | <i>R. sanguineus</i> |
| <i>R. monacensis</i> | Não denominada | <i>I. ricinus</i> |
| <i>R. raoulti</i> , <i>R. rioja</i> | Não denominada | <i>Dermacentor</i> spp. |
| <i>R. sibirica mongolitimoniae</i> | Linfagitis associated rickettsiosis (LAR) | <i>Hyalomma</i> spp., <i>R. pusillus</i> |
| <i>R. slovaca</i> | "TIBOLA", DEBONEL | <i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i> |
| <i>R. helvetica</i> | Perimiocardite crónica | <i>I. ricinus</i> |
| <i>R. massiliae</i> | Não denominada | <i>Rhipicephalus</i> spp. |
| <i>R. aeschlimannii</i> | Não denominada | <i>Hyalomma</i> spp. |

A febre escaro-nodular ou febre botonosa, vulgarmente chamada febre da carraça, é a doença associada a vetores com maior impacto na saúde pública em Portugal. O seu agente etiológico é a espécie *R. conorii*, transmitida ao Homem pela carraça do cão *R. sanguineus*. É uma doença endémica no nosso país e está também descrita em países da bacia do Mediterrâneo, África, Médio Oriente, Índia e Paquistão (De Sousa R., 2019).

É uma doença que apresenta padrões de sazonalidade estival, uma vez que os casos são reportados no final da primavera e no verão, quando as fases imaturas de *R. sanguineus* prevalecem. Contudo, o estreito contacto do Homem com o cão, a sua presença dentro de casa e a alteração dos fatores ambientais, proporcionam que em Portugal o vetor se mantenha ativo praticamente todo o ano, não excluindo por isso a possibilidade da doença noutra altura do ano (De Sousa R., 2019).

Estão descritas outras rickettsioses em doentes Portugueses, tais como a *Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA)* ou *Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy (DEBONEL)* causada pela *R. slovaca* e transmitida pelo *Dermacentor* spp. e a *Linfangite- associated Rickettsiosis (LAR)* causada por *R. sibirica mongolitimoniae* (De Sousa R., 2019).

Rickettsioses associadas a pulgas

Das rickettsioses associadas a pulgas, temos o tifo endêmico ou tifo murino de distribuição mundial causado pela *R.typhi* e transmitida ao Homem através da pulga do rato (*Xenopsylla cheopis*); e a *R. felis* frequentemente encontrada no seu vetor biológico principal, a pulga do gato (*Ctenocephalides felis*). Apesar de serem na maior parte transmitidas pelas espécies vetoras referidas, ambas as espécies de rickettsias já foram detetadas noutras espécies de pulgas. No caso da transmissão por pulgas, a infeção ocorre quando há introdução de fezes de pulgas infetadas, através de lesões da pele causadas pela abrasão da ferida onde a pulga picou (De Sousa R., 2019).

2.1.7. Detecção de *Rickettsia* em ixodídeos e hospedeiros

O estudo das rickettsias e das rickettsioses no Homem, foram favorecidos por avanços extraordinários de novas metodologias. Os métodos moleculares baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction) permitiram o desenvolvimento de ferramentas sensíveis, específicas e rápidas para deteção e identificação das espécies de *Rickettsia* em amostras humanas e de animais, incluindo ixodídeos e outros artrópodes vetores. As rickettsias são organismos de crescimento fastidioso, cuja cultura pode demorar cerca de 14 dias e que neste caso, pode não permitir uma resposta ao clínico em tempo útil. Por outro lado, a cultura de algumas espécies de rickettsias requer condições laboratoriais especiais, não acessíveis em todos os laboratórios, nomeadamente, um laboratório de nível de segurança 3 (BSL-3).

Para além dos métodos diretos que incluem a cultura, a deteção molecular por PCR, coloração por Giménez ou imunohistoquímica em amostras humanas e nos vetores, os métodos indiretos como a deteção de anticorpos, são também metodologias importantes para confirmar o diagnóstico clínico, ou para realizar estudos serológicos na população humana e nas populações animais. Na figura 1.10 são referidas as técnicas utilizadas no estudo de rickettsias e no diagnóstico de rickettsioses.

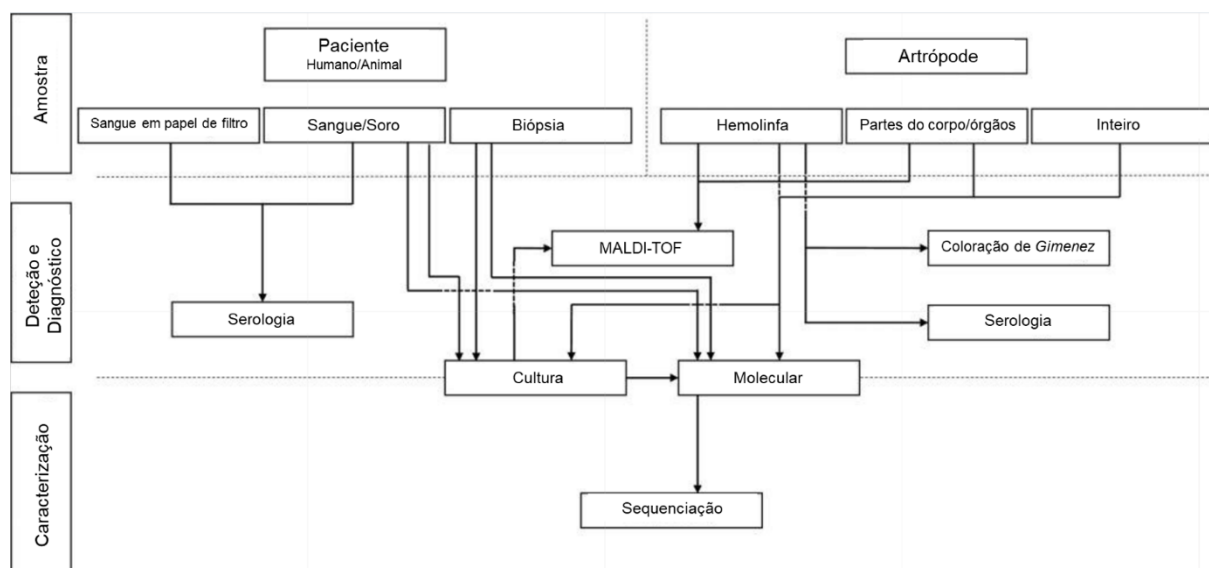


Figura 1.10 - Esquematização do tipo de amostras e diagnóstico que pode ser feito no estudo de rickettsias (Adaptado de Abdad et al., 2018).

Métodos diretos

A cultura *in vitro* normalmente não é usada como técnica de diagnóstico de rotina, uma vez não permite dar um resultado rápido ao clínico. O isolamento de rickettsias é feito através da técnica de centrifugação *shell vial*, usando amostras de sangue heparinizado, sangue em EDTA, biópsia de pele ou amostras de vetores. A cultura por *shell-vial* é uma técnica adaptada da cultura de vírus (Marrero & Raoult, 1989). Diferentes tipos de células podem ser usadas para o isolamento de *Rickettsia* spp. a partir de amostras humanas ou de vetores. As mais comuns são as células Vero E6 (células epiteliais de rim de macaco verde Africano). Contudo, as rickettsias podem também ser isoladas em linhas celulares de artrópodes como células de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36), de carraça ou de sapo *Xenopus laevis* (XTC) (Eremeeva et al., 2006; Horta et al., 2006; Labruna et al., 2007). Para além do diagnóstico, o isolamento de rickettsias é importante para descrever uma nova espécie de *Rickettsia* spp. e contribui também para o estudo de aspetos fisiológicos, genéticos, suscetibilidade a antibióticos e para testar novas ferramentas de diagnóstico (Parola et al., 2013). O crescimento de *Rickettsia* nas culturas pode ser detetado ao fim de seis dias, mas o seu estabelecimento em cultura pode demorar 2-3 semanas. O crescimento bacteriano dentro das células, pode ser detetado através do efeito citopatogénico e posterior coloração pela técnica de Giménez (Giménez, 1964), ou por imunofluorescência indireta. A caracterização e a identificação da espécie de *Rickettsia*, é depois realizada através da deteção molecular do DNA extraído da cultura, por PCR, sequenciação e análise filogenética (Portillo et al., 2017).

Para além da atual metodologia de sequenciação do genoma completo (WGS), que já é utilizado para caracterizar genomas de algumas espécies de rickettsias, a amplificação de fragmentos de regiões que codificam algumas proteínas das rickettsias, continua largamente a ser utilizados não só em PCR convencional, como em PCR em tempo real. Os genes mais utilizados para a caracterização das rickettsias são os genes que codificam a enzima citrato sintase (*gltA*), e os genes de proteínas de superfície da membrana, a *outer membrane protein A* (*ompA*) e *outer membrane protein B* (*ompB*) (Parola et al., 2005; Portillo et al., 2017). Apesar do uso mais comum destes genes, alguns autores sugerem que a caracterização seja alargada a mais genes quando é feita a descrição de uma nova espécie, devendo ser considerados cinco genes: *rrs*, *gltA*, *OmpA*, *OmpB* e gene D (Fournier et al., 2003).

Métodos indiretos

A imunofluorescência indireta (IFA) é a técnica *gold standard* para a deteção de anticorpos anti-rickettsia e a mais utilizada na confirmação do diagnóstico serológico humano. Contudo, é uma técnica pouco informativa na fase aguda da doença, uma vez que os anticorpos (imunoglobulinas IgM e IgG) só aparecem ao fim de 7-10 dias pós infeção (Figura 1.11). A IFA baseia-se na deteção de anticorpos anti-*Rickettsia* existentes no soro de um indivíduo ou de um animal. Os antígenos expressos em células ou tecidos, são fixados numa superfície/lâmina de Teflon (fase sólida). É posteriormente usado um conjugado específico anti-espécie do hospedeiro (Homem ou outro animal) a testar, marcado com um

fluorocromo (e.g. fluoresceína). Os limiares de positividade (*cut-off*) utilizados variam de acordo com a população a estudar e a endemicidade da doença.

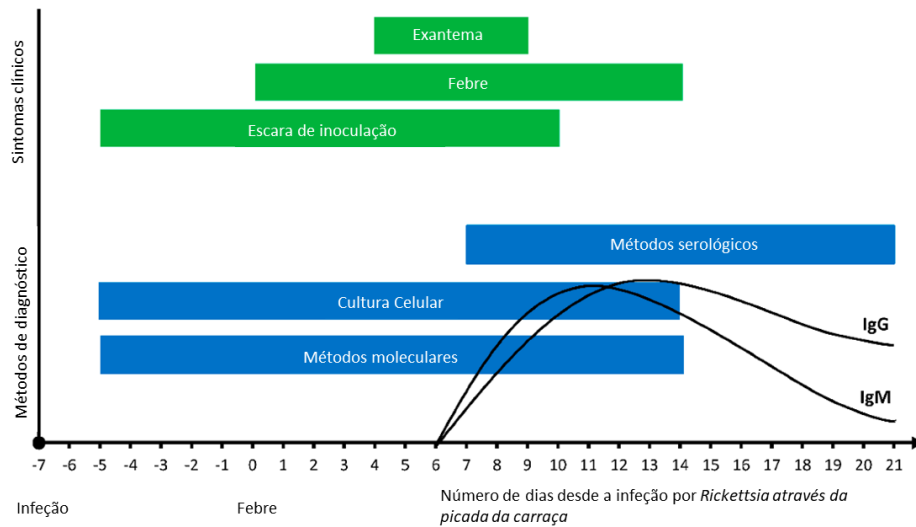


Figura 1.11 - Gráfico representativo da utilidade dos métodos de diagnósticos no decorrer de uma infecção por *Rickettsia*. (Adaptado de Piotrowski & Rymaszewska, 2020)

2.2. *Bartonella*

O género *Bartonella* pertence ao grupo das α – proteobactérias, ordem Rhizobiales, família Bartonellaceae. São bactérias Gram-negativas, intracelulares facultativas de crescimento fastidioso. Os pequenos bacilos pleomórficos multiplicam-se em eritrócitos e células endoteliais (Álvarez-Fernández et al., 2018).

Bartonella spp. tem uma distribuição mundial, é altamente adaptada a um amplo espectro de hospedeiros reservatórios mamíferos e está associadas a artrópodes vetores como pulgas, ixodídeos, moscas (e.g. *Hippoboscidae*), entre outros (Breitschwerdt, 2017). As bartoneloses, são doenças zoonóticas que afetam em particular o Homem e alguns mamíferos, incluindo os animais domésticos, nomeadamente cães (Tsai et al., 2011).

Os hospedeiros reservatórios primários de *Bartonella spp.* normalmente desenvolvem bacteriémia de longa duração, onde as bactérias intra-eritrocíticas na corrente sanguínea são ingeridas por artrópodes vetores hematófagos e são transmitidos a hospedeiros acidentais (animais domésticos, Homem). Os principais modos de transmissão são: por inoculação de fezes de artrópodes contaminadas; por arranhões ou mordidas de animais; ou até mesmo por abrasão na pele quando há picada do artrópode e que induz a contaminação de feridas com fezes contaminadas (Mosbacher et al., 2011).

Não sendo, contudo, o único, o gato (*Felis catus*) é o reservatório primário de *B. henselae*, o agente etiológico da doença da arranhadura do gato. O Homem é infetado maioritariamente pela inoculação de fezes de pulga, ou através de arranhadelas do gato. Os gatos domésticos quando infetados, também são hospedeiros reservatórios principais para *B. clarridgeiae* e *B. koehlerae*. Acredita-se que os gatos

infetados raramente desenvolvam sinais clínicos, mesmo mantendo uma bacteriemia prolongada, por isso devem ser tratados para evitar a infecção, por exemplo de vários membros do agregado familiar (Álvarez-Fernández et al., 2018). Os cães domésticos são geralmente hospedeiros acidentais de *B. henselae*, mas podem desenvolver doença por infecção com outras espécies de *Bartonella* (Regier et al., 2016).

O espectro de manifestações da doença associada a infecções por *Bartonella* spp., permanecem pouco caracterizadas e de forma incompleta em muitos animais domésticos e selvagens. As técnicas de epidemiologia molecular, revelaram uma grande variedade de espécies de *Bartonella* spp. especializadas para vários hospedeiros mamíferos e transferidos por vetores artrópodes específicos, que foram identificados ao longo dos anos (Álvarez-Fernández et al., 2018; Regier et al., 2016).

2.3. Apicomplexa

2.3.1. Babesia

Os organismos do género *Babesia* pertencem ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida. Os piroplamídeos são em geral parasitas intra-eritrócitarios, caracterizados por um ciclo de vida que compreende três fases, nomeadamente merogonia, gametogonia e esporogonia, que envolvem um vetor artrópode (ixodídeo) e um hospedeiro vertebrado. *Babesia sensu stricto* apresenta transmissão transovárica nos ixodídeos, sendo uma vantagem evolutiva de maior sucesso entre os membros da Apicomplexa (Jalovecka et al., 2019).

As babesias são transmitidas durante a refeição sanguínea de um ixodídeo, principalmente do género *Ixodes*. São mantidas em circulação através dos seus hospedeiros reservatórios vertebrados, onde induzem tolerância do hospedeiro que permite longa duração de infecciosidade, ao contrário do que acontece por exemplo com as rickettsias (Dennis & Piesman, 2005). Existem ainda outros modos de transmissão destes protozoários que ocorrem mais raramente, nomeadamente transplacentária, perinatal e através de transfusão de hemoderivados contaminados (Hildebrandt et al., 2013; Leiby, 2011).

Atualmente, estão descritas mais de 100 espécies de *Babesia* a infetar animais. A babesiose é uma doença que apresenta distribuição mundial, e afeta maioritariamente animais de pecuária e animais domésticos em particular o cão. A maioria das espécies de *Babesia* são específicas do hospedeiro (e.g. *B. canis*), mas a infecção humana foi associada apenas a algumas espécies. Na Europa, muitas espécies de ixodídeos podem transmitir *Babesia* aos seus hospedeiros naturais, no entanto, *I. ricinus* é o ixodídeo associado à babesiose humana, capaz de transmitir espécies patogénicas para o Homem (e.g. *B. divergens*) (Gray et al., 2010). Na Europa, em contraste com os EUA, os casos de babesiose humano são relativamente baixos (Hildebrandt et al., 2013).

2.3.2. Theileria

As espécies de *Theileria* infetam uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, e são transmitidas por ixodídeos dos géneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*. A maioria destas espécies é conhecida pelas grandes perdas económicas que causam à indústria agrícola, devido a surtos de doenças, mortalidade e baixa produção em animais de pecuária (Bishop et al., 2004).

2.3.3. Cytauxzoon

Cytauxzoon é um piroplasma intra-eritrócítico pertencente à família *Theileiriidae*, que é conhecido por causar a citauxzoonose felina. Esta doença é endémica no Sul e Sudeste dos Estados Unidos, mas tem-se verificado em vários felinos noutras partes do mundo (Figura 1.12). É transmitido através de ixodídeos, que são o seu hospedeiro definitivo, uma vez que não há evidências de transmissão transovárica. Atualmente há dois vetores de transmissão competentes comprovados, o *A. americanum* e o *D. variabilis*, que não existem na Europa (Wang et al., 2017).

Este protozoário é mantido na natureza através dos seus hospedeiros intermediários, os felinos selvagens e domésticos, não tendo sido registado até ao momento em outros mamíferos. Os mais comuns são os gatos domésticos (*Felis catus*) e os lincês (*Lynx rufus*, etc) (Wang et al., 2017).

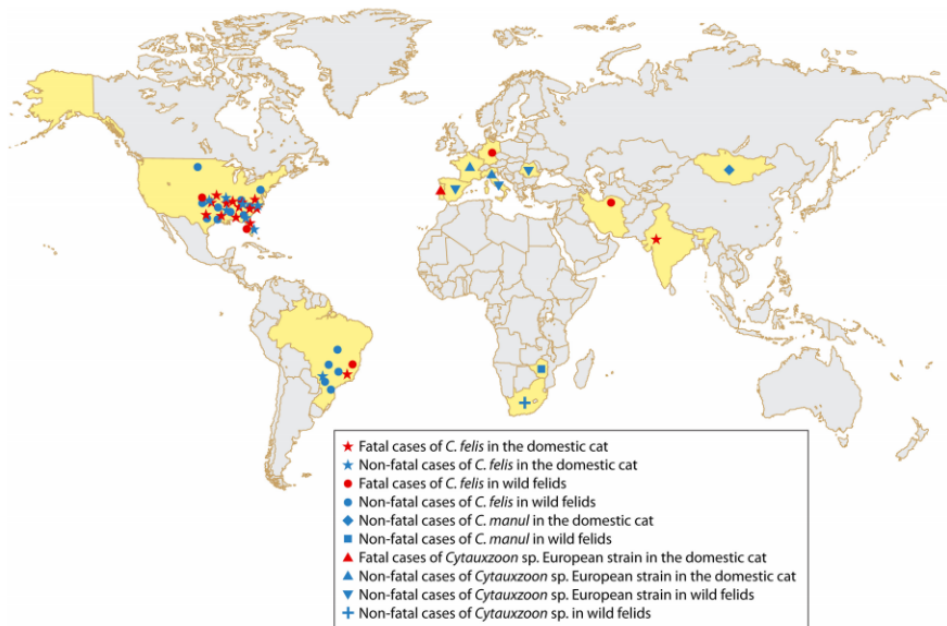


Figura 1.12 - Distribuição geográfica das infeções por *Cytauxzoon* em gatos domésticos e felinos selvagens. Os países onde os casos de cytauxzoonose foi reportada encontram-se a amarelo. (Retirado de Wang et al., 2017)

2.3.4. Hepatozoon

Hepatozoon é um protozoário pertencente à subordem *Adelorina* e à família *Hepatozoidae*. É um gênero com mais de trezentas espécies descritas, que infeta uma vasta gama de vertebrados animais. É um parasita com um ciclo de vida que tem como hospedeiro definitivo um artrópode vetor hematófago (carrapa, mosquito, mosca, pulgas, etc). Ao contrário dos microrganismos aqui já abordados, o hepatozoon é transmitido através da ingestão do vetor por um hospedeiro intermediário vertebrado ou até mesmo por predação (*H. americanum*) ou por transmissão intrauterina (*H. canis*). (Baneth, 2011).

São conhecidas três espécies que causam doença em cães e gatos (*Hepatozoon canis*, *H. americanum* e *H. felis*) (Baneth, 2011; Baneth et al., 2013). A espécie mais conhecida é *Hepatozoon canis*, responsável por infectar cães domésticos e carnívoros selvagens (Baneth, 2011) e que tem como vetor principal o *Rhipicephalus sanguineus*. Normalmente causa infecção subclínica, caso não se verifique um nível de parasitemia muito elevado, ou não haja coinfeção com outros microrganismos patogênicos. Presume-se que a imunossupressão e coinfeções com outros agentes patogênicos, contribuam para a gravidade da hepatozoonose tanto canina como felina. Ao contrário da infecção por *H. canis* em cães, que tem como alvo principal os órgãos hemolinfáticos, a hepatozoonose felina parece estar frequentemente associada à infecção de tecidos musculares (Kubo et al., 2006). Até ao momento ainda não foi demonstrada a presença de oócitos de *H. felis* num artrópode vetor, apenas tendo sido detetada a presença de DNA em alguns ixodídeos (Maia et al., 2014).

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

1. Trabalho de campo

1.1. Localização das áreas de estudo e populações animais

As áreas de estudo foram estabelecidas no âmbito de protocolos já existentes, entre o Centro de Estudo de Vetores e Doenças Infecciosas (CEVDI) em Águas de Moura, o Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF), a Associação de Criadores de Equinos da Raça Garrana (ACERG) e o Espaço de Visitação e Observação de Aves (EVOA). Foi também elaborado um protocolo para a recolha de ectoparasitas de animais domésticos com a Associação de Proteção dos Animais de Alcácer (Focinho's). De acordo com estes protocolos já existentes, foram colhidos ectoparasitas e amostras de sangue de animais selvagens e domésticos de quatro áreas geográficas.

a) Parque Nacional do Vale do Guadiana (PNVG)

O Parque Natural do Vale do Guadiana, situa-se a Sul de Portugal (37 ° 41 '54 "N / 7 ° 38' 51" W), pertence à Rede Nacional de Áreas Protegidas do ICNF, este parque é um local de elevado interesse paisagístico, histórico e acima de tudo, abriga uma elevada biodiversidade de espécies de fauna e flora, como por exemplo uma espécie bastante rara e ameaçada, o peneireiro-das-torres (*Falco naumanni*). É constituído por uma vegetação densa, com zonas de matagal mediterrânico e é fortemente marcado pela bacia hidrográfica do rio Guadiana, local de conservação de importantes espécies fauna piscícola (Natural.pt, 2021).

Em 2015 a área do Vale do Guadiana, concelho de Mértola, foi escolhida para a reintrodução do lince ibérico (*Lynx pardinus*). O lince ibérico é um carnívoro estrito de médio tamanho, que se alimenta quase exclusivamente de coelho bravo, podendo também se alimentar de ungulados, pequenos roedores e aves. O lince ibérico é considerado o felino mais ameaçado do mundo, devido à sua restrita e fragmentada distribuição. Foi reclassificado da categoria de “criticamente em perigo” para “em perigo de extinção” na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) (IUCN, 2015). Este feito foi conseguido através de projetos de conservação do lince ibérico em Espanha e em Portugal, com a restauração de populações de coelho bravo, programas de reintrodução, entre outros. Esta espécie habita duas regiões do sudoeste de Espanha (Donãna e Serra Morena) e o sudeste de Portugal (Serra da Malcata, Vale do Guadiana e Moura-Barrancos), onde alberga a pequena população reintroduzida de 40-50 lince ibéricos.

b) Província do Minho, concelho de Vieira do Minho

Nas regiões montanhosas da província do Minho encontram-se a serra da Serradela (41°39'12.834"N 8°2'49.186"W) e da Cabreira (41°39'11.315"N 8°3'4.291"W), que é um dos habitats de uma das três raças autóctones de equinos de Portugal, o Garrano. O Garrano (*Equus caballus celticus* L. 1758) é um pequeno equino, considerado dos mais antigos de Portugal, que estava associado a um antigo modo de vida da população humana. Estes animais tem características zoomórficas e comportamentais muito características, sendo muito bem-adaptados ao ecossistema de montanha.

Os Garranos vivem em estado semi-selvagem, onde se distribuem em manadas de vários indivíduos, com apenas um macho adulto e um número variável de fêmeas (6 a 12), apresentam uma mobilidade sazonal pelas encostas das serras e alimentam-se em áreas de pastagens naturais de montanha, incluindo espaços arbustivos e prados húmidos (Leite, 2012).

Em 1994, é iniciado o registo zootécnico desta raça, sendo nesse mesmo ano considerada uma raça ameaçada pela União Europeia. Atualmente a raça encontra-se morfologicamente bem caracterizada e padronizada, graças ao crucial papel desempenhado pela Associação de Criadores de Equinos de Raça Garrana (ACERG) (Leite, 2012).

A produtividade destes animais é influenciada por vários fatores, um dos mais graves é a predação dos poldros por o lobo ibérico e também os fatores climáticos que tem levado a invernos rigorosos e a secas prolongadas, sendo o aumento das temperaturas uma consequência para a raça, que levou a uma multiplicação do número de ectoparasitas provocando a morte de animais mais debilitados (Leite, 2012).

c) Espaço de Visitação e Observação de Aves (EVOA)

O EVOA está localizado no coração da Reserva Natural do Estuário do Tejo, no concelho de Vila Franca de Xira (38° 50' 58" N / 8° 58' 26" W). É um espaço de conservação, lazer e aprendizagem que visa a criação e recuperação de habitats aquáticos para aves. O EVOA integra três zonas húmidas de água doce num total de 70 hectares, onde se junta um elevado número de espécies de avifauna, não só invernantes, mas também nidificantes (anatídeos, ardeídeos, limícolas, passeriformes), sendo considerado um espaço protegido de elevada importância em termos de conservação (EVOA, 2021).

Uma das espécies presentes no EVOA é a marrequinha comum (*Anas crecca*), que é uma espécie de pato eurasiática de pequeno tamanho, que nidifica em toda a região Paleártica, mas migra para Sul. O seu habitat preferencial são pântanos e sapais abrigados com densa vegetação, ou até mesmo pequenos lagos. Em Portugal é uma espécie invernante e está presente principalmente entre setembro a março, embora possam ser avistados alguns indivíduos durante os meses mais quentes.

Outra espécie que pode ser encontrada no EVOA é o rouxinol-pequeno-dos-caniços (*Acrocephalus scirpaceus*) que é um passeriforme migratório. Nos meses de maio a julho distribui-se pela Europa Central e Ocidental, migrando para África subsariana nos meses de inverno. Em Portugal, está presente de Norte a Sul do País e o seu habitat preferencial são caniçais de média ou de grande extensão de zonas ribeirinhas e sapais.

d) Focinhos´s- Associação de Proteção dos Animais de Alcácer

A Associação de Proteção dos Animais de Alcácer (Focinho´s) é uma associação sem fins lucrativos, que tem como fim proteger em sentido amplo os animais abandonados e mal tratados, assim como os que tenham dono, mas necessitem de ajuda, controlar os animais errantes que procriam no domínio público e também sensibilizar a opinião pública para o não-abandono animal. Atualmente abriga dezenas de animais domésticos abandonados (cães e gatos), no seu espaço de gatil e canil, situado em Alcácer do Sal, distrito de Setúbal.

Os animais domésticos são muitas vezes negligenciados e abandonados, ficando sujeitos a todo o tipo de perigos quando se encontram nas ruas, como por exemplo infestação por ectoparasitas, subnutrição, morte por atropelamento, entre outros. Cães e gatos são importantes hospedeiros de uma variada gama de ectoparasitas e são frequentemente encontrados com ixodídeos, pulgas e até piolhos, que por sua vez os tornam importantes elos de ligação entre alguns artrópodes vetores e o contacto com o Homem, elevando a probabilidade de transmissão de zoonoses.

1.2. Captura de animais (hospedeiros) e recolha dos seus ectoparasitas

a) Linces ibéricos (*Lynx pardinus*)

As capturas dos linces no PNVG foram realizadas pelos técnicos do ICNF nos três anos consecutivos de 2018-2020 durante os meses de outubro a dezembro, no âmbito dos Projeto LIFE (*Proyecto Life + IBERLINCE: “Recuperación de la distribución histórica del lince ibérico en España y Portugal” (LIFE10NA-ES / 570)*). Os animais foram capturados em armadilhas, usando uma presa viva (coelho europeu) como isco, são anestesiados e avaliados por meio de protocolos previamente estabelecidos e conduzidos de acordo com a legislação vigente sobre bem-estar animal. As capturas foram realizadas para avaliar o estado de saúde da população de linces e para colocar, retirar / substituir colares, por dispositivos emissores de sinais em indivíduos específicos. Durante a avaliação do estado de saúde dos linces pelos veterinários, a maioria dos seus ectoparasitas foram colhidos aleatoriamente usando uma pinça e posteriormente armazenados em etanol a 70% e guardados à temperatura ambiente até processamento posterior. Cada tubo foi identificado com o nome do animal e data de amostragem.

Foram também recolhidos pontualmente alguns ectoparasitas em linces encontrados mortos, por atropelamento ou outras causas, noutras alturas do ano.

Dos linces capturados na época normal de captura, foram também recolhidas amostras de sangue em EDTA (2 ml), que depois de devidamente separadas e alíquotadas (amostras de sangue total e de plasma) foram enviadas ao CEVDI onde foram mantidas a -80 °C.

b) Cavalos da raça Garrana

Os criadores da ACERG capturam anualmente os seus animais em locais determinados e com as condições apropriadas para realizar a identificação de novos poldros, provas morfofuncionais dos adultos e realização de controlo higiénico-sanitário. Durante esses eventos, para além de diversas tarefas realizadas pelos veterinários, são também recolhidos alguns ectoparasitas (ixodídeos) por investigadores do CEVDI. A colheita destes ectoparasitas faz parte de um protocolo de colaboração existente desde 2019, e, em geral, essas colheitas são realizadas no mês de julho. Os ectoparasitas são recolhidos quando os animais entram na manga e porque são animais selvagens, a colheita requer sempre muita cautela pelo operador, dada a dificuldade de manter estes animais tranquilos. Por este facto, as colheitas dos ectoparasitas são realizadas de forma aleatória. Foram realizadas colheitas em duas áreas geográficas, nos anos de 2019 e 2020. A colheita foi realizada na Serra da Serradela e os ectoparasitas foram colocados em tubos com etanol a 70% e guardados à temperatura ambiente. Em 2021, os ixodídeos foram colhidos na Serra da Cabreira e colocados em tubo seco, transportados em gelo seco e congelados a - 80°C, para posterior tentativa de isolamento de *Rickettsia*.

c) Aves selvagens

O EVOA monitoriza semanalmente as aves presentes nas lagoas através da sua anilhagem. A anilhagem de aves é uma técnica que consiste na colocação de anilhas metálicas na pata de cada ave, individualmente. Este procedimento tem como propósito aumentar o conhecimento sobre a fenologia das espécies e monitorizar a dinâmica de populações ao longo do tempo. Esta técnica de identificação de animias contribui para uma melhor adaptação das medidas de gestão de conservação destas aves.

Para este processo, as aves são capturadas em redes próprias, identificadas, e é realizada uma avaliação de vários parâmetros morfológicos. No caso de haver ectoparasitas presentes, são removidos e colocados num tubo com etanol a 70%, identificados com o número da anilha e data de colheita e armazenados à temperatura ambiente até entrega no CEVDI. As capturas foram realizadas no outono de 2020 e no verão de 2021, no qual participámos através de visita de trabalho de campo ao EVOA.

d) Animais domésticos (cães e gatos)

Todos os animais que são entregues à Associação Focinho's, são submetidos a uma inspeção do seu estado de saúde e analisados para a presença de ectoparasitas. Durante essa consulta é realizada a colheita de alguns desses ectoparasitas (ixodídeos e pulgas), que são colocados em tubos secos identificado com data e nome do animal. Os ixodídeos vivos são identificados, lavados em álcool a 70% e são cortados em duas partes iguais (paralelamente), e uma delas é mantida a -80°C em tudo seco para posterior tentativa de isolamento de *Rickettsia* spp. e a outra é mantida em álcool a 70% para posterior análise molecular de agentes patogénicos.

Foram também colhidas pontualmente, pela veterinária do canil, amostras de sangue em EDTA (2 ml) dos cães. Parte do sangue é separado por centrifugação 10 minutos a 120 g para a obtenção de plasma, que é guardado a -80°C juntamente com a amostra de sangue total.

2. Atividade laboratorial

2.1. Condições de Biossegurança e boas práticas laboratoriais

Todas as técnicas laboratoriais foram realizadas no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Dr. Francisco Cambournac (CEVDI), localizado em Águas de Moura, que está integrado no Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

Este centro é um laboratório de referência de diagnóstico, vigilância e investigação científica na área dos agentes infecciosos transmitidos por vetores ao Homem. De acordo com as regras das boas práticas laboratoriais, nomeadamente no que respeita a laboratórios que realizam diagnóstico clínico, as infraestruturas do laboratório têm uma divisão por salas dedicadas exclusivamente a procedimentos específicos, como por exemplo: a sala de entomologia, salas de extração de ácidos nucleicos, salas de amplificação, salas de adição de DNA e RNA e salas limpas onde se faz a manutenção das linhas celulares e as misturas para reações. A entrada nestas salas está também condicionada ao uso exclusivo de batas, luvas etc., da própria sala. Todos estes laboratórios são laboratórios de biossegurança de nível 2 (BSL2). Todas estas regras estão implementadas no CEVDI e são essenciais para que não exista qualquer tipo de contaminação que possa influenciar os resultados das análises efetuadas. Todas as instruções de segurança, e boas práticas, estão disponíveis num manual de segurança da própria instituição.

O CEVDI dispõe também de laboratórios BSL3, onde se trabalha com microrganismos patogénicos de grupo de segurança 3 (Manual de segurança WHO) e nomeadamente quando o processamento das amostras envolve técnicas como o isolamento e cultura de rickettsias em células de linha.

2.2. Identificação morfológica de ixodídeos

Para identificação taxonómica, os ixodídeos foram observados num estereomicroscópio binocular recorrendo a chaves taxonómicas (Estrada-Peña et al. 2004). Os ixodídeos foram caracterizados segundo a sua espécie, fase de desenvolvimento, sexo e estado de ingurgitamento. Posteriormente foram colocados em tubos *ependorf* de 1,5 ml, identificados (número, origem e data) e conservados a -20°C até à extração de DNA ou a -80°C no caso de serem posteriormente utilizados para isolamento. De acordo com as chaves dicotómicas, algumas das características morfológicas mais utilizadas na diferenciação das principais espécies são descritas em seguida na figura 2.1.

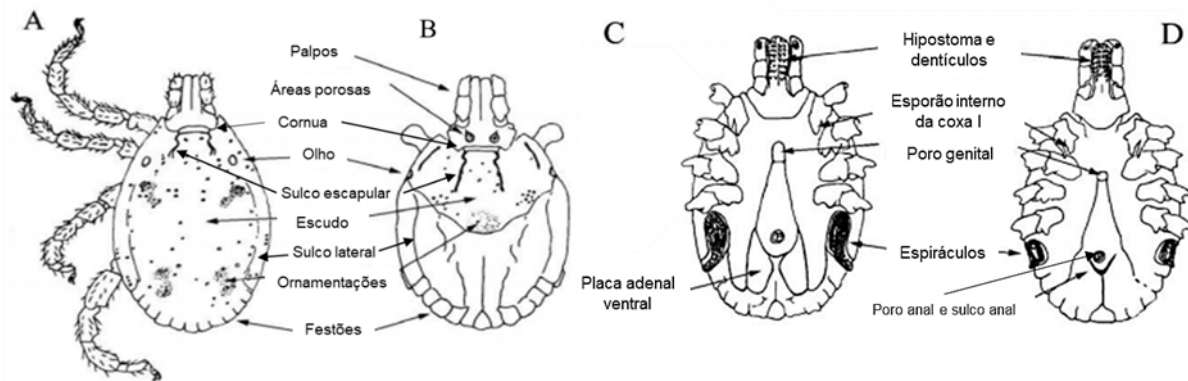


Figura 2.1- Principais caracteres morfológicos utilizados na identificação da espécie de ixodídeos. Vista dorsal de macho (A) e fêmea (B). Vista ventral de macho (C) e fêmea (D). (Adaptado de Stafford III, 2007).

2.2.1. Gênero *Rhipicephalus*

Distinguem-se morfológicamente por apresentarem a base do capítulo hexagonal, o rostró curto com hipóstoma e palpos curtos, possuem olhos planos e festões no escudo dorsal. As patas têm coloração uniforme e o escudo não é ornamentado (Figura 2.2 A). Os machos normalmente apresentam placas adanais e acessórios.

R. sanguineus: é uma espécie de tamanho moderado, entre 2 e 4 mm de comprimento. Tanto as fêmeas como os machos apresentam um escudo dorsal com poucas pontuações, majoritariamente de pequenas dimensões. Nas fêmeas as áreas porosas são de tamanho médio e amplamente separadas e o poro genital tem forma de “U”. Nos machos, os ângulos póstero-interno dos escudos adanais são arredondados, os espiráculos são relativamente compridos, estreitando um pouco gradualmente.

R. bursa: apresenta o escudo dorsal rugoso, de coloração escura, onde evidencia muitas pontuações intersticiais de tamanho médio-grande. Nos machos, os escudos adanais são relativamente largos posteriormente (Figura 2.2 C), os espiráculos são compridos e apresentam um estreitamento acentuado, como se fosse uma cauda (Figura 2.2 B). As fêmeas apresentam áreas porosas ovais e próximas e o poro genital tem forma de “V”.

R. pusillus: espécie de pequeno tamanho, raramente ultrapassa os 2 mm de comprimento. A característica mais visível é a projeção anterior das coxas I que são visíveis dorsalmente (Figura 2.2 E). As pontuações intersticiais são de grande tamanho. Os olhos são achatados, ovais e relativamente grandes. Nas fêmeas as áreas porosas são circulares e de pequeno tamanho e o poro genital tem forma de “V”. Nos machos, os escudos adanais são relativamente estreitos, com um comprimento do dobro da largura (Figura 2.2 D).

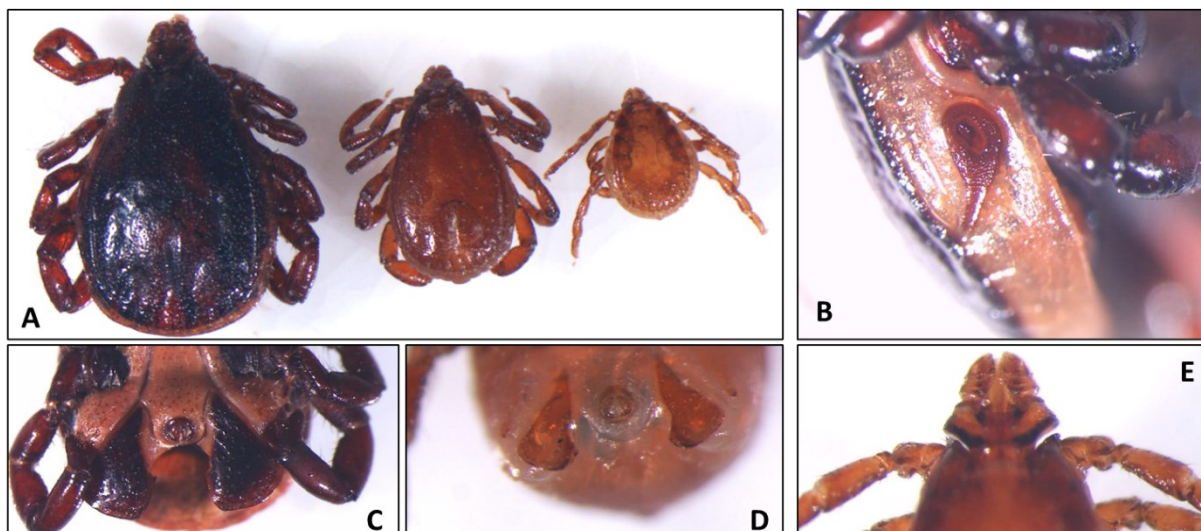


Figura 2.2- Caracteres morfológicos que permitem distinguir as espécies de *Rhipicephalus*. A) Vista dorsal de *R. bursa*, *R. sanguineus* e *R. pusillus*. B) Espiráculo de *R. bursa*. C) Placas adanais de *R. bursa*. D) Placas adanais de *R. pusillus*. E) Vista dorsal de *R. pusillus* onde se visualiza a projeção anterior das coxas 1. Fotos de Inês Freitas

2.2.2. Gênero *Ixodes*

Ao contrário de todos os outros gêneros, duas das características determinantes desde gênero são a posição do sulco anal, que contorna o ânus anteriormente e os espiráculos circulares (Figura 2.3 C). Normalmente têm um tamanho pequeno e apresentam um rostro comprido com hipóstoma e palpos longos, não têm olhos nem festões no escudo, nem apresentam um escudo ornamentado.

I. ricinus: apresenta um escudo oval alongado, com sulcos escapulares presentes e ventralmente tem presente um esporão interno das coxas I encurvado e agudo. Ao contrário do *I. ventalloi*, não apresenta esporão ventral nos artículos I dos palpos e tem uma cornua pouco destacada. Nas fêmeas os sulcos escapulares são bem visíveis e as pontuações intersticiais são distintas. Ventralmente tem aurículas distintas tanto nos machos como nas fêmeas. Os machos apresentam palpos pequenos e o poro genital posiciona-se entre as coxas III, ao contrário das fêmeas em que o poro genital posiciona-se entre as coxas IV, tal como no *I. ventalloi*.

I. ventalloi: apresenta um escudo estreito, mais comprido que largo, com sulcos escapulares presentes. Ventralmente as coxas I apresentam um esporão interno encurvado, comprido e agudo (Figura 2.3 B) e das coxas II à IV o esporão externo é indistinto. As cornuas são salientes (Figura 2.3 A) e os aurículos I dos palpos apresentam um pequeno esporão ventral (Figura 2.3 B). O macho é bastante pequeno (2 mm), tem uns palpos largos e curtos e as aurículas são pouco destacadas (figura 2.3 C), ao contrário das fêmeas que apresentam aurículas recurvadas e agudas (Figura 2.3 B) e um hipostoma pontiagudo que se pode confundir com o *I. acuminatus*.

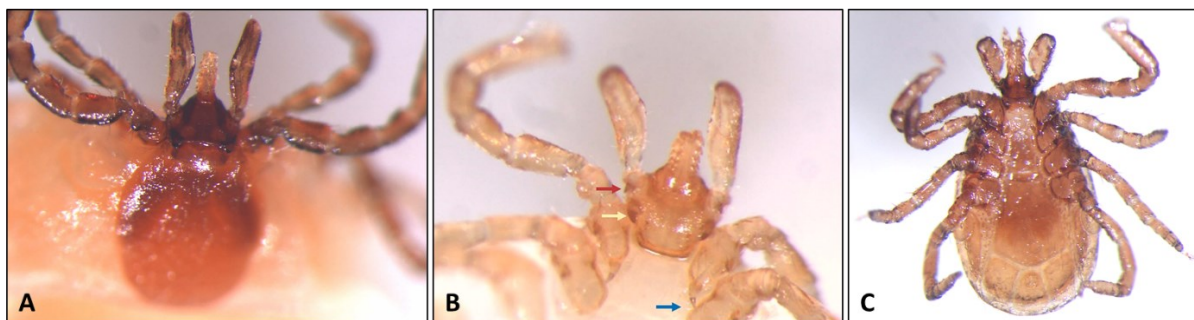


Figura 2.3- Caracteres morfológicos distintos de *I. ventalloi*. A) Capítulo e escudo de fêmea de *I. ventalloi*. B) Vista dorsal do capítulo de fêmea de *I. ventalloi*. Seta vermelha: Esporão no artigo 1 dos palpos; Seta amarela: aurículas; seta azul: esporão interno da coxa 1. C) Vista ventral de macho de *I. ventalloi*. Fotos de Inês Freitas

2.2.3. Gênero *Hyalomma*

Normalmente são carraças de tamanho grande, com o rostro comprido com palpos e hipóstoma longos. Apresentam coloração não uniforme nas patas, por vezes em anéis e no escudo é bem visível os olhos hemisféricos e bastante salientes (Figura 2.4 A).

H. marginatum: apresenta um escudo de coloração escura, com escassas pontuações, normalmente de pequeno tamanho, localizadas nas regiões escapulares, essencialmente perto dos sulcos laterais que são bem destacados. Nas patas estão presentes anéis bem definidos de cor clara. Nas fêmeas as áreas porosas são grandes e os sulcos escapulares são bem definidos.

H. lusitanicum: apresenta um escudo de coloração escura, com sulcos escapulares íngremes e com pontuações de tamanho grande agrupadas nas regiões marginais e depressão caudal. As patas têm coloração irregular com padrão marmorizado, com anéis de cor clara pouco definidos (Figura 2.4 B). Sulcos laterais por vezes ausentes, porém, quando presentes, bastante curtos. Nos machos os escudos adonais tem uma extremidade quadrada.

H. lusitanicum e *H. marginatum* têm morfologia semelhante e são difíceis de identificar devido à sua estreita relação taxonómica

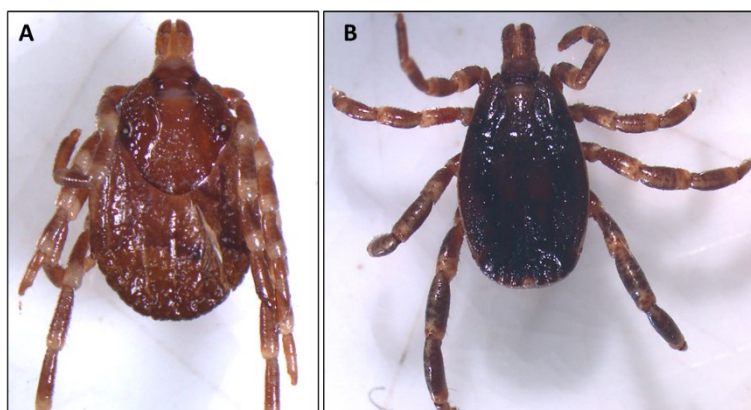


Figura 2.4- Vista dorsal de fêmea (A) e macho (B) de *H. lusitanicum*. Fotos de Inês Freitas

2.2.4. Gênero *Dermacentor*

Normalmente são carraças de médias dimensões e a sua principal característica é o seu escudo ornamentado onde apresentam olhos e festões (Figura 2.5 C). Apresentam um rostro curto com hipóstoma e palpos pequenos e normalmente os machos apresentam escudos adanais, com as coxas IV notoriamente maior que as restantes. A base do capítulo tem margens laterais retas, tendo forma retangular, mais larga que longa.

D. reticulatus: apresenta um esporão retrógrado e agudo no artigo II dos palpos, (Figura 2.5 D) ao contrário do *D. marginatus*. Ventralmente, o esporão das coxas I é separado por uma fenda que ultrapassa metade do comprimento dos mesmos. Nas fêmeas, o mais proeminente é a forma das áreas porosas, que são amplas e ovais (Figura 2.5 D) e a abertura genital tem forma de “U” (Figura 2.5 E).

D. marginatus: não apresenta um esporão agudo no artigo II dos palpos. Ao contrário do *D. reticulatus* a fenda entre os esporões da coxa I tem um comprimento inferior à metade dos esporões, fazendo com que o esporão externo seja mais pequeno que o interno. Nas fêmeas as áreas porosas são estreitas e ovais (Figura 2.5 A) e a abertura genital tem forma de “V” (Figura 2.5 B).

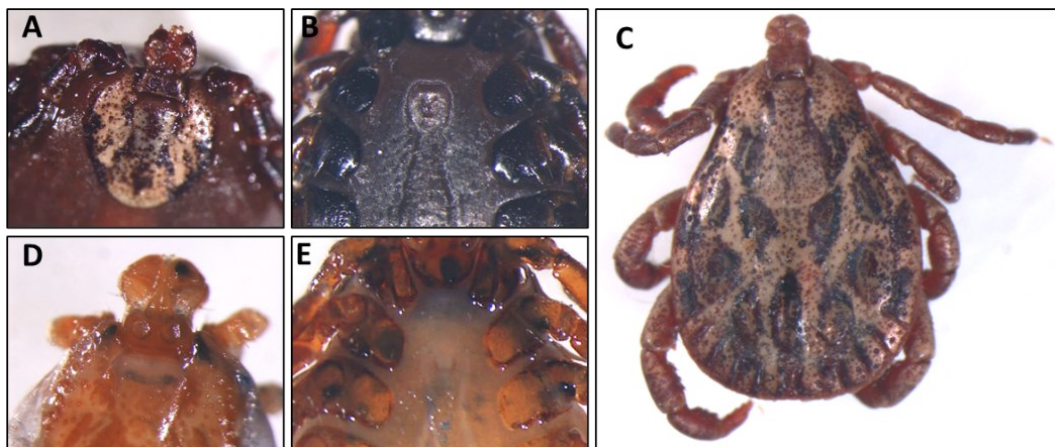


Figura 2.5 - Caracteres morfológicos das espécies do Género *Dermacentor*. A) Vista dorsal e B) poro genital de *D. marginatum*. C) Vista dorsal de macho *D. marginatum*. D) Capítulo e E) poro genital de fêmea de *D. reticulatus*. Fotos de Inês Freitas

2.2.5. Gênero *Haemaphysalis*

As espécies deste género são de dimensão média a pequena, apresentam o rostro curto, não possuem ornamentações no escudo dorsal, mas apresentam festões e não têm olhos. Os machos apresentam placas adanais, subadanais e acessórias.

2.3. Extração de DNA

Foram realizados diferentes procedimentos para extração de DNA a partir de ectoparasitas e de amostras de sangue dos hospedeiros vertebrados.

a) Extração com Kit comercial

A extração de DNA de alguns ectoparasitas foi realizada utilizando o Kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de extração por coluna, de acordo com as instruções do fabricante. Muito resumidamente, numa primeira fase os ectoparasitas foram colocados em 200 µl de tampão de lise com 20 µl de proteinase K, e incubados a 56 °C durante a noite (12-24h). Posteriormente, o ixodídeo foi removido e o sobrenadante foi tratado de acordo com protocolo descrito pelo fabricante.

No que respeita ao sangue dos animais, foi utilizado um protocolo semelhante, incubando uma hora a 56°C 200 µl de sangue total e 20 µl de proteinase K antes de se iniciar o protocolo de extração por coluna.

b) Método “in-house” de extração por hidróxido de amónia

Foi também realizada a extração de DNA de ectoparasitas através de um método “in-house” por fervura com hidróxido de amónia (Schouls et. al, 1999). Os ectoparasitas foram lavados em álcool iodado (70% v/v) 10 minutos e secos em papel de filtro. Em seguida foram colocados individualmente em tubos *ependorf* estéreis, previamente numerados, contendo 100 µl de solução de hidróxido de amónia a 1,25%. Os tubos foram submetidos a um aquecimento a 100°C durante 20 minutos ao qual se seguiu um arrefecimento rápido em gelo e centrifugação a 9000 g durante 45 segundos. Os tubos foram em seguida abertos e sujeitos a novo aquecimento a 90°C durante 20 minutos, de forma a evaporar a amónia e o eluído foi depois armazenado a -20°C até posterior utilização.

2.4. Caracterização molecular dos ectoparasitas

A seleção dos exemplares de ectoparasitas para confirmação da espécie através de métodos moleculares foi estabelecida de forma aleatória e incluiu todos os casos em que havia dúvidas na identificação morfológica, como por exemplo, quando o exemplar se encontrava em más condições, sem alguma parte do corpo ou quando este se encontrava numa fase evolutiva (larvar ou de ninfa) em que algumas características morfológicas ainda não eram visíveis ou ainda quando o espécime se encontrava muito ingurgitado.

Para confirmar a identificação das espécies das carraças, e identificar as espécies de pulgas, piolhos e moscas usámos marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial nomeadamente o citocromo oxidase c subunidade 1 (COI), e o 16S ribossomal RNA (16S rRNA) que têm uma variabilidade intra-

específica baixa, mas uma variabilidade inter-específica suficientemente grande para permitir a distinção das diferentes espécies. No quadro 2.1 estão descritos os diferentes conjuntos de *primers* e condições de amplificação utilizados para os diferentes artrópodes. Todos os ectoparasitas selecionados foram testados individualmente e as reações foram realizadas num termociclador convencional (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) utilizando o kit comercial FastStart PCR Master (Roche Diagnostics) de acordo com as instruções do fabricante para um volume total de 25 µl de reação e 5 µl de DNA. Os primers e as condições de PCR utilizadas na identificação molecular das espécies de ectoparasitas estão referidas no quadro 2.1.

Quadro 2.1- *Primers* e condições de PCR utilizados para identificação molecular das espécies de ectoparasitas.

| | Gene Alvo | Primers | Fragmento amplificado (bp) | Condições do PCR | Referência |
|-----------|-----------|------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Ixodídeos | 16S rRNA | 16S_F / 16S_R | 460 bp | 95°C, 3 min; 35 ciclos [94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 45s]; 72°C, 7 min | (Mangold et al., 1998) |
| | 16S rRNA | 16S + 1 / 16S-1 | 456 bp | 95°C, 5 min; 35 ciclos [94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 45s]; 72°C, 7 min | (Black & Piesman, 1994) |
| Pulgas | COI | C. felis Cff-F / Cff-R | 550 bp | 95°C, 5 min; 40 ciclos [95°C 40s, 52°C 60s, 72°C 60s]; 72°C, 7 min | (Lawrence et al., 2014) |
| Piolhos | COI | L6625 / H7005 | 379 bp | 4 ciclos [95°C 60s, 45°C 60s, 72°C 60s]; 30 ciclos [93°C 60s, 60°C 60s, 72°C 60s]; 72°C, 7 min | (Hafner et al., 1994) |
| Moscas | COI | HCO2198 / LCO1490 | 710 bp | 95°C, 3 min; 30 ciclos [94°C 60s, 48°C 60s, 72°C 60s]; 72°C, 7 min | (Folmer et al., 1994) |

2.5. Detecção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos

A deteção molecular dos agentes patogénicos nos ectoparasitas foi realizada individualmente para cada exemplar. Foi utilizado PCR convencional e/ou PCR em tempo real, para a deteção dos seguintes agentes: *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Cytauxzoon* spp. e *Hepatozoon*

spp., de acordo com os protocolos descritos (Quadro 2.2). No caso das rickettsias as detecções positivas foram confirmadas com amplificação de outros genes, nomeadamente os genes *OmpA* e/ou *OmpB*.

Para a pesquisa de *Rickettsia* em amostras de sangue total, foi utilizado um *nested-PCR* tendo como alvo um fragmento do gene que codifica a *OmpB*, de acordo com o descrito por Choi e colaboradores (Quadro 2.2). O *nested-PCR* foi utilizado para aumentar a sensibilidade da técnica quando existe pouca quantidade de rickettsias na amostra, como é o caso do sangue (Portillo et al., 2017).

Para a pesquisa de *Babesia* spp., *Theileria* spp. e *Hepatozoon* spp. em sangue de lincos, foi utilizado o mesmo protocolo de PCR convencional utilizado para detetar estes agentes nos ectoparasitas, tal como descrito por outros autores (Quadro 2.2).

Os resultados da amplificação do DNA foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA). Na preparação do gel adiciona-se GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X (Biotium) e aos produtos de amplificação um marcador de migração (azul de bromofenol). A eletroforese processa-se a 100V e a 400 mA, durante 20 minutos num aparelho de eletroforese horizontal, após a qual o gel é observado num aparelho transiluminador. As amostras positivas apresentam bandas de amplificação, visíveis por luminescência ao nível do controlo positivo.

O rastreio de *Bartonella* spp. e *Cytauxzoon* spp. no sangue total, foi realizado por PCR em tempo real já implementado no CEVDI. Para um total de reação de 25µl, foram utilizados 20µl de uma master mix comercial LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics, Germany), sondas de hidrólise (com marcação FAM) específicas para o género *Bartonella* e *Cytauxzoon* e 5µl de DNA da amostra alvo, de acordo com os protocolos previamente estabelecidos (Oteo, J. A et al. 2017; Nentwig, A. et al. 2018).

As reações foram realizadas num termociclador LightCycler® 480 (Roche). Para a análise dos resultados foram observados os resultados gráficos da variação da emissão de fluorescência com o tempo (perfil de amplificação), nos canais de leitura a 510nm. Um resultado positivo, correspondeu à detecção de DNA, traduzido por um perfil de amplificação correspondente a uma curva sigmoideal de variação positiva da fluorescência acima do *threshold*, ao qual é atribuído um valor de Ct calculado pelo software e que foi validado se $Ct < 40$. Os controlos positivos tinham uma curva positiva (acima do *threshold*) e com $Ct < 33$. Um resultado negativo, correspondeu à não detecção de DNA, traduzida por um perfil de amplificação sem variação positiva da fluorescência (ou próxima de zero) e consequente ausência de Ct.

Em todas as reações de PCR, quer convencional quer em tempo-real, foram utilizados controlos positivos (permitindo verificar se ocorreu reação) e negativos (permitindo excluir contaminações). Os *primers* utilizados para a detecção na pesquisa dos diferentes agentes patogénicos presentes nos ectoparasitas e nas amostras de sangue estão descritos no quadro 2.2.

Quadro 2.2- Primers e condições de PCR utilizados no estudo molecular para detecção e caracterização molecular de agentes patogênicos bacterianos e protozoários nos ectoparasitas e nas amostras de sangue.

| Microorganismo | Método de PCR | Gene Alvo | Primers e sonda | Fragmento amplificado (bp) | Condições do PCR | Referência |
|------------------------|------------------|-------------|--------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Rickettsia</i> spp. | PCR convencional | gItA | RpCS.877p/RpCS.1258n | 381 bp | 95°C, 3 min; 35 ciclos [94°C 30s, 54°C 30s, 72°C 90s]; 72°C, 7 min | Regnery et al. (1991) |
| | Nested PCR | OmpB | rompB-OF / rompB-OR | 511bp | 95°C, 3 min; 35 ciclos [94°C 30s, 54°C 30s, 72°C 45s]; 72°C, 7 min | Choi et al. (2005) |
| bactéria | PCR convencional | OmpA | Rt.190.70bp/Rt.190.602p | 532bp | 95°C, 3 min; 35 ciclos [94°C 30s, 54°C 30s, 72°C 90s]; 72°C, 7 min | Regnery et al. (1991) |
| | Real Time PCR | 16S-23S ITS | 325s/538s | Depende da espécie | 50°C, 2 min; 95°C, 10 min; 45 ciclos [95°C 10s, 66°C 20s, 72°C 1s]; 40°C, 1s | Oteo, J. A et al. (2017) |
| <i>Bartonella</i> spp. | PCR convencional | gItA | Bhcs.781p/Bhcs.1137n | 370 bp | 95°C, 3 min; 35 ciclos [94°C 30s, 54°C 30s, 72°C 45s]; 72°C, 7 min | Birtles and Raoult (1996) |
| | PCR convencional | 18S rRNA | PIRO-A/PIRO-B | 400 bp | 95°C, 5 min; 35 ciclos [94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 90s]; 72°C, 7 min | Olmeda, A. S. et al. (1997) |
| Protozoários | PCR convencional | 18S rRNA | Cytfelis.203f/Cytfelis.423r | 221 bp | 95°C, 5 min; 40 ciclos [94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 60s]; 72°C, 7 min | Mel, M. L. et al. (2009) |
| | Real Time PCR | 18S rRNA | Cytsp. 1525f/ Cytsp. 1593r probe Cytsp. 1549p | 69 bp | 50°C, 2 min; 95°C, 15 min; 45 ciclos [95°C 10s, 60°C 60s, 72°C 1s]; 40°C, 30s | Nentwig, A. et al. (2018) |
| <i>Hepatozoon</i> spp. | PCR convencional | 18S rRNA | HEP-F / HEP-R | 626-666 bp | 95°C, 5 min; 35 ciclos [94°C 20s, 55°C 30s, 72°C 90s]; 72°C, 5 min | Inokuma, H. et al. (2002) |

Purificação e sequenciação do DNA

As amostras positivas do PCR convencional foram purificadas com um Kit comercial Exo-SAP-IT PCR (ThermoFisher). De acordo com o protocolo foram utilizados 5 µl de DNA amplificado, com 2µl do reagente, de acordo com instruções do fabricante.

Cada amostra positiva é sequenciada em ambas as cadeias (*forward* e *reverse*) pelo método de Sanger. Antes do envio das amostras para a unidade de sequenciação, é realizada uma reação de PCR utilizando um kit para a sequenciação, o Big-Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos desta reação são enviados para a Unidade de Tecnologia e Inovação (INSA), onde são sequenciadas. Posteriormente, os cromatogramas resultantes da eletroforese capilar, são enviados para cada unidade requisitante para serem então analisados.

2.6. Análise de seqüências e caracterização filogenética

As seqüências de nucleótidos foram corrigidas manualmente, alinhadas e editadas usando o software BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.1.9. Foram realizadas comparações das nossas seqüências com as seqüências depositadas no GenBank, através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). As seqüências obtidas neste trabalho foram comparadas com outras seqüências da base de dados do GenBank e foram também submetidas ao GenBank através da plataforma BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>). Para análise das relações filogenéticas das várias seqüências obtidas, foram construídas árvores filogenéticas recorrendo ao programa MEGA7 version 7.0.26 (Kumar et al., 2016).

2.7. Tentativa de isolamento de rickettsias a partir de ixodídeos

Para a tentativa de isolamento de rickettsias, foi utilizada a técnica de *shell-vial* usando a linha celular Vero E6. Todas as técnicas de isolamento foram realizadas no laboratório BSL3, dentro de uma câmara de segurança biológica de classe II. Os ixodídeos foram retirados do ultracongelador a -80° , colocados num banho de álcool iodado a 70% durante cinco minutos e passados por banho de hipoclorito de sódio a 4% mais cinco minutos, e em seguida foram secos com papel de filtro. Estas lavagens servem para limpar a superfície dos ixodídeos de modo a que não haja contaminações com microrganismos indesejados. Uma vez secos, foram macerados e cortados com bisturi e colocados numa monocamada de células Vero E6 (ATCC 1008) nos *shell-vial*, em meio de cultura MEM (*minimal essencial médium supplemented*) com 4% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de L-glutamina, sem suplementação por antibióticos. Os *shell vial* foram centrifugados a 700 g durante 45 minutos, permitindo assim a entrada das bactérias dentro das células. Depois da centrifugação o meio MEM foi descartado, adicionado meio de cultura fresco e colocados na estufa para incubação a duas temperaturas diferentes $28-32^{\circ}\text{C}$.

Ao fim de sete dias foi feita uma subcultura onde se retirou o meio do *shell-vial* e através de esferas de vidro levantam-se as células e pipeta-se 1 ml para um frasco de cultura 25 cm^2 , e perfaz-se o resto com meio fresco. Passado mais sete dias é feita uma raspagem com uma ansa na camada do frasco de células e coloca-se num poço de lâmina de microscópio revestidas com Teflon, identificando e deixando secar para fazer a coloração de *Gimenez* e/ou imunofluorescência. Para confirmar o isolamento é sempre necessário fazer deteção molecular por PCR e sequenciação, uma vez que as características fenotípicas para a identificação da *Rickettsia* e da espécie em questão são insuficientes.

Para a coloração de *Giménez*, depois da lâmina seca, fixamos a lâmina à chama e coramos com uma solução de fuscina básica e tampão fosfato durante 3-5 minutos. Em seguida é lavada e é colocado o verde de malaquite durante 30 segundos (2 vezes), por fim deixa-se secar e pode ser vista através de microscópio ótico. Caso haja rickettsias presentes vão ser visualizadas a cor-de-rosa, uma vez que estas retêm a fuscina. Para a realização da imunofluorescência indireta, deixamos a lâmina secar, fixamos a lâmina em acetona durante 10 minutos e realizamos a técnica.

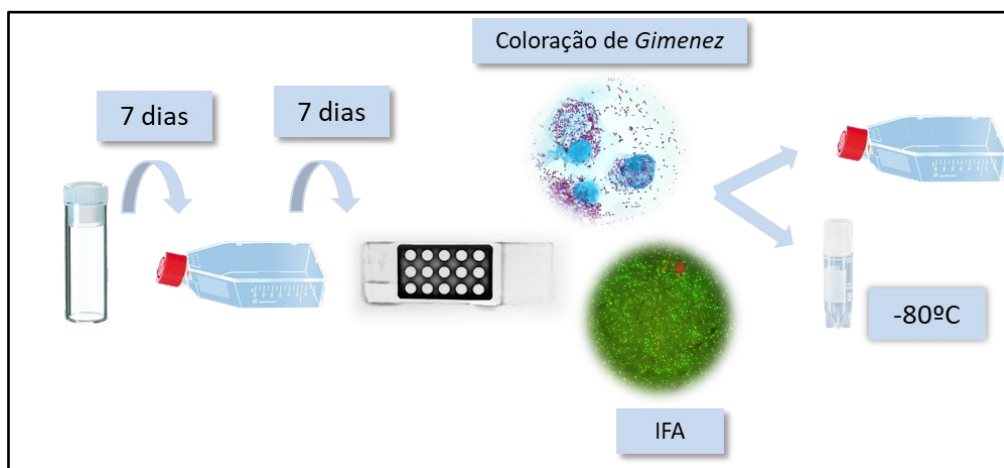


Figura 2.6 - Esquema que ilustra o processo realizado na tentativa de isolamento de rickettsias.

2.8. Estudos serológicos

Os testes serológicos para detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* GFE, foram realizados através da técnica de imunofluorescência indireta (IFA), usando lâminas *in-house* previamente preparadas de acordo com o protocolo do Instituto Nacional de Saúde, previamente descrito (Bacellar et al., 2002). Foram utilizadas lâminas de teflon para imunofluorescência, com antigénio de *R. conorii* crescidas em células Vero E6, existentes no CEVDI.

As lâminas *in-house* são descongeladas, fixadas em acetona durante 10 minutos e secas. Depois de descongelar os soros dos animais, são realizadas as diluições seriadas em PBS (Tampão de fosfato salino) (diluição 1/32; 1/64; 1/128; 1/256; 1/512). Cada diluição de plasma é colocada no respetivo poço. Estes poços nas lâminas com teflon evitam a contaminação dos outros poços adjacentes. As lâminas são em seguida incubadas a 37°C em câmara húmida durante 30 minutos. O excesso de plasma é retirado através de duas lavagens de 5 minutos em PBS, com agitação magnética. Depois de secas ao ar é colocado o conjugado respetivo. No caso dos linceis foi utilizado um conjugado IgG anti-gato marcado com isotiocianato de fluoresceína comercial, desenvolvido em cabra (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA). No caso dos cães, foi usado um conjugado IgG anti-cão marcado com isotiocianato de fluoresceína comercial, desenvolvido em coelho (SIGMA, Saint Louis, Missouri, EUA). Ambos foram diluídos em PBS a 1:40. Os conjugados são previamente preparados segundo as normas do fabricante (10µl conjugado+ 40µl Azul Evans + 350µl PBS). Em seguida as lâminas são novamente incubadas em câmara húmida a 37°C durante 30 minutos. São depois novamente lavadas em PBS e secas ao ar. Por fim é colocada uma gota de glicerina tamponada e a lamela é observada ao microscópio de fluorescência. Caso a amostra seja positiva, são visualizados pequenos cocobacilos com fluorescência verde no interior das células.

Os valores de positividade (*cut-off* ≥ 1:128) para *Rickettsia* considerados neste trabalho foram baseados em estudos prévios em outros felídeos e canídeos em Portugal (Alexandre et al., 2011; Alves et al., 2009).

O teste serológico para detecção de anticorpos anti-*Bartonella* processou-se do mesmo modo que o anterior, mas usando lâminas comerciais IFA (MegaFLUO® *Bartonella henselae*, MEGACOR Diagnostik GmbH, Hörbranz, Áustria) para detecção de anticorpos IgG contra *Bartonella henselae*. Neste trabalho, os valores de positividade para *Bartonella* considerados foram, títulos ≥ 64 (Alves et al., 2009).

Capítulo 3 - Resultados

1. Linces ibéricos (*Lynx pardinus*)

1.1. Caracterização dos ectoparasitas

De 2018 a 2020 durante os meses de outubro a dezembro, foram efetuadas 39 capturas e uma recaptura de linces (17F; 22M). Foram também contabilizados na nossa amostra três linces recolhidos nos meses de abril a março, já sem vida devido a atropelamentos. Do total de linces, 85% (36/42) estavam parasitados tendo sido recolhidos um total de 297 ectoparasitas, dos quais 253 (85,2%) ixodídeos, 42 (14,1%) moscas hipoboscídeos e duas (0,7%) pulgas. Foram identificadas morfologicamente quatro espécies diferentes de ixodídeos, pertencentes a três géneros: *I.ventalloi* (66,4%), *R. pusillus* (30,0%), *H. lusitanicum* (2,4%) *R. sanguineus* (1,2%). Todos os ixodídeos eram adultos, e foram identificados 147 fêmeas (58,1%) e 106 machos (41,9%) (Quadro 3.2). Cinqenta e cinco por cento dos ixodídeos tinham-se alimentado e estavam ingurgitados.

Da análise feita por ano e espécie de ixodídeo, verificámos que o maior número de ixodídeos foi recolhido em 2020. Verificámos ainda, que *I. ventalloi* foi a espécie mais predominante no outono e *R. pusillus* a espécie mais predominante na primavera (Figura 3.1). Apesar do número de ixodídeos ter sido superior em 2020, a proporção de *I. ventalloi* e *R. pusillus* foi idêntica a 2019.

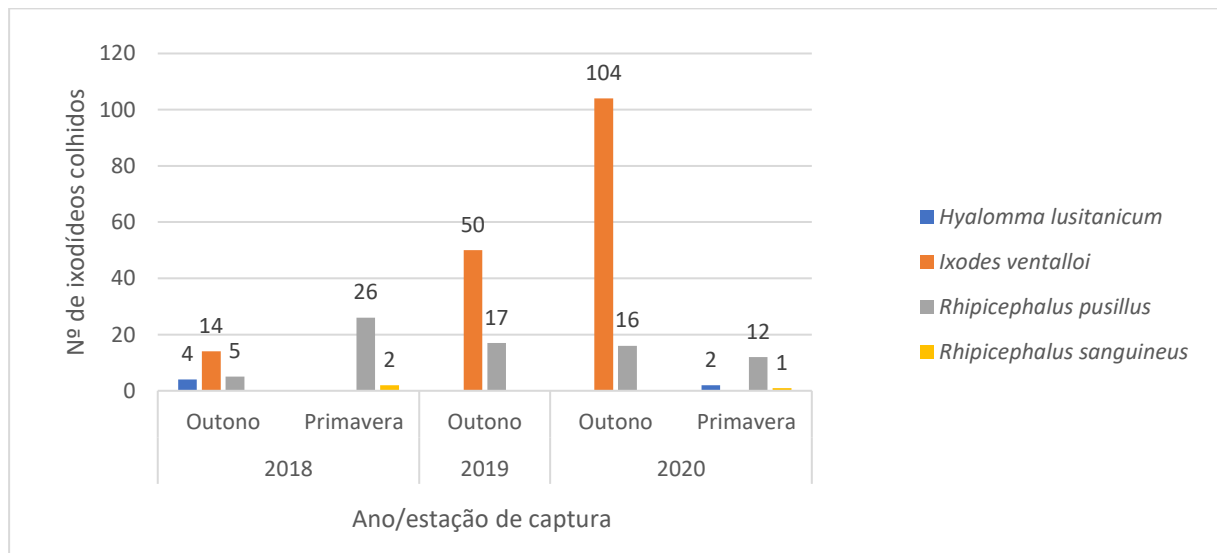


Figura 3.1- Análise das espécies de ixodídeos colhidos nos linces ibérico por ano/estação.

Do total dos 253 ixodídeos identificados, foi realizada a confirmação molecular em 26,2% (44/168) de *I. ventalloi*, 22,4% (17/76) de *R. pusillus* e 50% (3/6) de *H. lusitanicum*.

Da análise das sequências nucleotídicas, *I. ventalloi* foi a espécie em que encontramos maior variabilidade intraespecífica. Foram observados 16 (26,1%) polimorfismos, e cada sequência protótipo

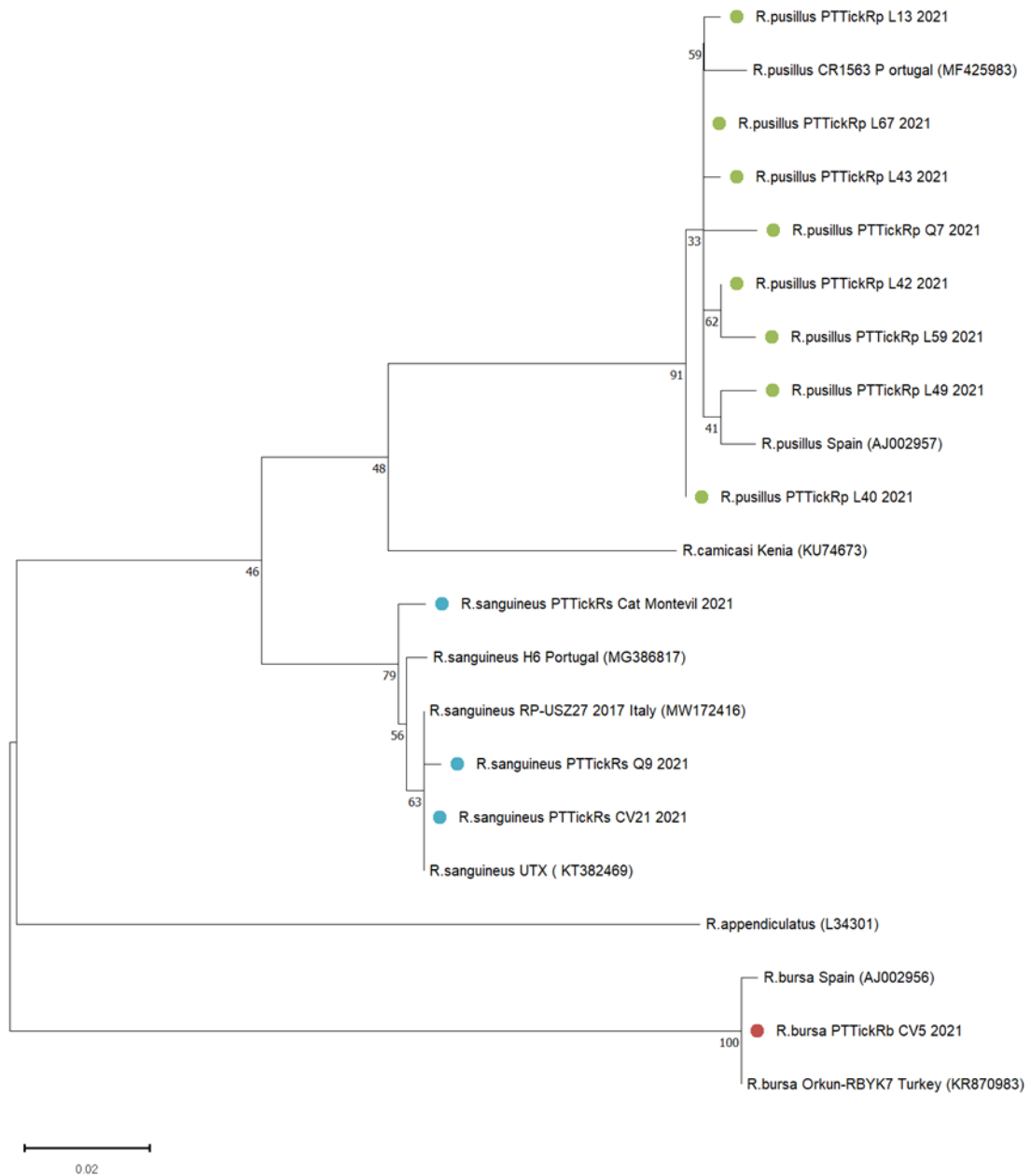


Figura 3.3- Filogenia do género *Rhipicephalus* baseado na análise de 460 bp do gene 16S rRNA. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações. Os círculos assinalados representam as sequências obtidas neste estudo.

1.2. Detecção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos nos ectoparasitas

Do total de 253 ixodídeos testados para deteção de DNA de *Rickettsia* spp., seis (2,4%) exemplares foram positivos. Foi detetada *R. helvetica* em três *I. ventalloi*; *R. sibirica mongolitimonae* em dois *R. pusillus* e *R. massiliae* em um *R. sanguineus* (Quadro 3.2).

A análise das sequências de *R. helvetica* mostraram 100% de identidade relativamente aos genes *gltA* (341/341bp) e *OmpB* (382/382bp) de sequências de *R. helvetica* encontradas na Rússia (KP866150) e no Japão (LC461080). As sequências de *R. sibirica mongolitimonae* mostraram 100% de identidade para os genes *OmpA* (491/491bp) (MF379309) e *OmpB* (464/464pb) (AF123715), com sequências previamente descritas em Portugal. No que respeita à análise da sequência de *R. massiliae*, esta apresentou uma identidade de 100% (341/341bp) para o fragmento que codifica o gene *gltA* de uma sequência obtida em ixodídeos colhidos em França (MK608658).

No que se refere à pesquisa de *Cytauxzoon* spp., encontrámos três (16,7%) ixodídeos positivos num total de 18 estudados. A deteção deste agente foi realizada por PCR em tempo-real e foi detetado em *H. lusitanicum*, *R. pusillus* e *I. ventalloi*. Foi ainda feito um PCR convencional usando *primers* específicos para *Cytauxzoon felis*, mas não obtivemos amplificação.

Em relação à deteção de *Hepatozoon*, foram encontrados dois (2,8%) ixodídeos positivos em dois *H. lusitanicum* dos 71 ixodídeos testados. As sequências analisadas para o gene 18S rRNA mostraram uma identidade de 100% (625/625bp) com *Hepatozoon felis* (MH656727), detetado previamente num gato na Croácia.

As duas pulgas testadas foram negativas para todos os agentes, incluindo *Rickettsia* spp, *Bartonella* spp., *Babesia* spp./*Theileria* spp., *Cytauxzoon* e *Hepatozoon*. Todas as moscas testadas para os mesmos agentes (10/42) foram negativas (Quadro 3.1).

1.3. Detecção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos nas amostras de sangue dos lince ibéricos

Foram testadas 39 amostras de sangue total de lince. Da pesquisa realizada para vários agentes, *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Cytauxzoon* spp. e *Hepatozoon* spp., foram detetados 24 (61,5%) positivos para *Hepatozoon* e 13 (33,3%) para *Cytauxzoon*. A análise da sequência de DNA que codifica para o gene 18S rRNA, mostrou 100% de identidade com *Hepatozoon felis* (MH656727) encontrado em gato na Croácia (Quadro 3.1). Não foi possível determinar a espécie de *Cytauxzoon* presente. Foi ainda realizado um PCR convencional com *primers* específicos de *C. felis*, dos lince positivos, ao qual não obtivemos amplificados, pelo que se deduz que poderam estar infetados com outras espécies de *Cytauxzoon*.

1.4. Detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* e anti-*Bartonella* por Imunofluorescência indireta em soros de lince ibérico

Foram testados 39 soros de lince, e do total de soros analisados foram encontrados 32 (82,1%) lince com anticorpos IgG anti-*Rickettsia* e 16 (41,0%) com anticorpos IgG anti-*Bartonella*. No que respeita aos anticorpos contra *Rickettsia*, nove (23,1%) tinham anticorpos com um título de 128; 12 (30,8%) com título de 256 e 11 (28,2%) com título de 512. Relativamente à presença de anticorpos anti-*Bartonella*, 10 (25,6%) lince apresentaram títulos de 64 e seis (15,4%) tinham títulos superiores a 128.

Quadro 3.1- Resultados da pesquisa de agentes no sangue dos lince e resultados da serologia nos soros dos mesmos.

| Agentes patogénicos testados | PCR % (positivos/testados) | Serologia % (positivos/testados) |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Bactérias | | |
| <i>Rickettsia spp.</i> | 0% (0/39) | 82,1% (32/39) |
| <i>Bartonella spp.*</i> | 0% (0/39) | 41,0% (16/39) |
| Protozoários | | |
| <i>Babesia spp./ Theileria spp.</i> | 0% (0/39) | |
| <i>Cytauxzoon spp.*</i> | 33,3% (13/39) | |
| <i>Hepatozoon felis</i> | 61,5% (24/39) | |

*Pesquisa através de PCR em tempo real.

Quadro 3-2- Resultados da pesquisa de agentes patogênicos nos ectoparasitas colhidos de linces Ibéricos.

| Ectoparasitas | N total | Sexo (M; F) | Deteção de DNA de agentes patogênicos % (positivos/testados) | | | | | Espécies detetadas |
|-------------------------------|---------|-------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------------------------|
| | | | <i>Bartonella</i> spp. | <i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp. | <i>Cytauxzoon</i> spp. * | <i>Hepatozoon</i> spp. | <i>Rickettsia</i> spp. | |
| Espécie de pulgas | | | | | | | | |
| <i>Ctenocephalides felis</i> | 2 | | 0% (0/2) | 0% (0/2) | 0% (0/2) | 0% (0/2) | 0% (0/2) | |
| Espécies de ixodídeos | | | | | | | | |
| <i>Hyalomma lusitanicum</i> | 6 | 3M; 3F | 0% (0/6) | 0% (0/4) | 33,3% (1/3) | 33,3% (2/6) | 0% (0/6) | <i>Hepatozoon felis</i> |
| <i>Ixodes ventralloi</i> | 168 | 71M; 97F | 0% (0/81) | 0% (0/81) | 10% (1/10) | 0% (0/33) | 1,8% (3/168) | <i>Rickettsia helvetica</i> |
| <i>Rhipicephalus pusillus</i> | 76 | 31M; 45F | 0% (0/31) | 0% (0/29) | 20% (1/5) | 0% (0/30) | 1,3% (2/76) | <i>R. sibirica</i> <i>R. mongolitimonae</i> |
| <i>R. sanguineus</i> | 3 | 1M; 2F | 0% (0/3) | 0% (0/2) | | 0% (0/2) | 33,3% (1/3) | <i>R. massiliae</i> |
| Espécie de moscas | | | | | | | | |
| <i>Hippobosca longipennis</i> | 42 | | 0% (0/10) | 0% (0/10) | 0% (0/2) | 0% (0/10) | 0% (0/10) | |
| TOTAL | 297 | 106M; 147F | 0% (0/133) | 0% (0/128) | 13,6% (3/22) | 2,4% (2/83) | 2,3% (6/265) | |

* Pesquisa através de PCR em tempo real.

2. Cavalos da raça Garrana

2.1. Caracterização morfológica e molecular dos ectoparasitas

Nos anos de 2019 e 2020, no mês de julho, foram colhidos um total de 115 ixodídeos nos cavalos da raça Garrana. Foram identificadas três espécies diferentes pertencentes a dois gêneros distintos de ixodídeos: *R. bursa* (78,3%), *R. sanguineus* (18,3%) e *H. marginatum* (3,4%). Todos os ixodídeos identificados eram adultos, com 66 fêmeas (57,4%) e 49 machos (42,6%). Sendo que aproximadamente 57% dos ixodídeos estavam ingurgitados.

Do total de ixodídeos identificados foi realizada a confirmação da espécie de alguns exemplares utilizando o gene 16S RNA. Foram confirmadas molecularmente 9 (9/90) espécies de *R. bursa*. Todas as sequências analisadas eram idênticas 100% (401/401bp) com *R. bursa* (MT302761) descrito em cabra-selvagem, na Turquia. No que respeita à espécie de *R. sanguineus*, foi confirmada molecularmente em dois exemplares (2/21), que apresentaram uma identidade de 100% (403/403bp) com *R. sanguineus* (KT382469) descritos em cães nos EUA.

As sequências obtidas de *R. sanguineus* e *R. bursa* estão presentes na árvore filogenética mostrada na figura 3.3, conjuntamente com as outras sequências do género *Rhipicephalus* descritas neste trabalho.

2.2. Detecção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos nos ectoparasitas

Do total de 115 ixodídeos testados para deteção de DNA de *Rickettsia* spp., 24 (20,9%) exemplares foram positivos. Vinte e um (18,3%) *R. bursa*, dois (1,7%) *R. sanguineus* e um (0,9%) *H. marginatum* (Quadro 3.3). Nos *R. bursa* identificados, foi detetada uma sequência nucleotídica de DNA com 100% de identidade com *Candidatus Rickettsia barbariae*, em ambos os genes *OmpA* (488/488bp) (MK028340) e *OmpB* (775/775bp) (DQ423363.1). Foi também detetado num *R. bursa* e num *R. sanguineus* uma sequência de DNA com uma identidade de 100% no gene *gltA* (341/341bp) de *R. massiliae* (MK608658) e 99,79% de identidade com o gene *OmpA* (469/470bp) (MG521363). Noutro *R. sanguineus* foi detetada uma sequência de DNA com 99,8 % (489/490bp) de identidade com *R. conorii para* o gene *OmpA* (KR401144), encontrado em cão na Espanha. Num *H. marginatum*, detetamos uma sequência nucleotídica com 100% (341/341bp) de identidade ao gene *gltA* de *R. aeschlimannii* (MK608659) encontrado na França.

Testámos também todos os 115 ixodídeos para a presença de DNA de piroplasmídeos, nomeadamente *Babesia* spp. e *Theileria* spp. Obtivemos 31 ixodídeos positivos (30 *R. bursa* e um *R. sanguineus*). Seis (5,2%) exemplares foram positivos para *Babesia caballi* e 25 (21,7%) exemplares positivos para *Theileria equi* (Quadro 3.3). Dos 115 ixodídeos, seis *R. bursa* estavam co-infetados com *Candidatus Rickettsia barbariae* e *Theileria equi*, e um estava co-infetado com *B. caballi*.

2.3. Tentativa de isolamento de rickettsias a partir de ixodídeos

No ano de 2021, todos os ixodídeos (n=36) colhidos nos cavalos Garranos, foram usados para tentativa de isolamento de *Rickettsia*. Dos exemplares colhidos, 29 (80,6%) eram *R. bursa* e sete (19,4%) *R. sanguineus*. Todos os ixodídeos eram adultos, dos quais, 17 (47,2%) fêmeas e 19 (52,8%) machos.

Da totalidade das tentativas de isolamento, foi observado crescimento de rickettsias em duas (5,6%) culturas a partir de macerados de *R. bursa*. Este crescimento foi detetado ao fim de 14 dias nos frascos colocados a 28°C, por observação de um raspado das células do frasco de cultura e da detecção das rickettsias por IFA. Foi realizada uma subcultura do isolamento e retirada também uma alíquota para extração de DNA. Foi realizado PCR e sequenciação da *Rickettsia* isolada.

A detecção e sequenciação das amostras com base num fragmento do gene que codifica a proteína externa *outer membrane protein (ompA)*, revelaram uma sequência com 99,8% (488/489bp) de identidade relativamente à sequência *Candidatus Rickettsia barbariae* (MK028340) disponível na base de dados do GenBank.

A manutenção da cultura não foi bem-sucedida, pelo que requer que novas tentativas a partir das alíquotas congeladas.

Quadro 3.3 - Resultados da pesquisa de agentes patogênicos nos ectoparasitas colhidos nos cavalos garranos.

| Ectoparasitas recolhidos | Agentes patogênicos detectados por PCR (positivos/testados) | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------------------------|--|
| | N total | Sexo (M; F) | <i>Candidatus R. barbarie</i> | <i>R. massiliae</i> | <i>R. conorii</i> | <i>R. aeschlimannii</i> | <i>Babesia caballi</i> | <i>Theileria equi</i> | Ixodídeos com agente % (positivos/testados) | |
| Espécies de ixodídeos | | | | | | | | | | |
| <i>Rhipicephalus bursa</i> | 90 | 45M; 45F | 22,2% (20/90) | 1,1% (1/90) | 0% (0/90) | 0% (0/90) | 6,7% (6/90) | 26,7% (24/90) | 56,7% (51/90) | |
| <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 21 | 4M; 17F | 0% (0/21) | 4,8% (1/21) | 4,8% (1/21) | 0% (0/21) | 0% (0/21) | 4,8% (1/21) | 14,3% (3/21) | |
| <i>Hyalomma marginatum</i> | 4 | 0M; 4F | 0% (0/4) | 0% (0/4) | 0% (0/4) | 25% (1/4) | 0% (0/4) | 0% (0/4) | 25% (1/4) | |
| Total | 115 | 49M; 66F | 17,4% (20/115) | 1,7% (2/115) | 0,9% (1/115) | 0,9% (1/115) | 5,2% (6/115) | 21,7% (25/115) | 47,8% (55/115) | |

3. Aves Selvagens

3.1. Caracterização morfológica e molecular dos ectoparasitas

Os ectoparasitas foram colhidos durante os meses de outono de 2020 e os meses de verão de 2021, em 34 aves selvagens de oito espécies diferentes, identificadas no EVOA (Quadro 3.4). Foram colhidos um total de 116 ectoparasitas, dos quais 95 (81,9%) ixodídeos, 20 (17,2%) piolhos e uma (0,9%) mosca hipoboscídeo. Todos os ixodídeos pertenciam à mesma espécie *H. marginatum*. Num total de 95 ixodídeos, 91 (95,8%) eram ninfas, duas (2,1%) larva e duas (2,1%) fêmeas (Quadro 3.4). Oitenta e quatro por cento dos ixodídeos estavam ingurgitados.

Dos ixodídeos identificados, foi realizada a confirmação da espécie de alguns exemplares utilizando o gene 16S rRNA. Foram confirmadas, usando os marcadores moleculares, 10,5% (10/95) das espécies de *H. marginatum*, cuja a análise das sequências mostrou a existência de quatro polimorfismos (Anexo 1).

Os piolhos e a mosca foram apenas identificados com base nos dados moleculares (gene COI). As sequências de DNA dos piolhos apresentaram 100% (382/382bp) de identidade com o gene COI de *Trinoton querquedulae* (AF385015), encontrado em pato-real nos EUA e a mosca hipoboscídeo apresentava uma sequência com 100% (658/658bp) de identidade com o gene COI de *Ornithomya biloba* (MF496010), descrita na República Checa.

3.2. Detecção molecular de rickettsias nos ectoparasitas

Do total de 95 ixodídeos testados para deteção de DNA de *Rickettsia* spp., 11 (11,6%) exemplares foram positivos, nomeadamente uma larva e 10 ninfas (Quadro 3.5). Dos 11 *H. marginatum* positivos, todas as sequências eram idênticas. A análise através do BLAST mostrou 100% de identidade para vários genes como, *gltA*. (341/341bp) (MK608659), *OmpA* (491/491bp) (MH932058) e *OmpB* (775/775bp) (KU961544) de *R. aeschlimannii*.

Todos os *H. marginatum* positivos foram detetados em passeriformes, uma ordem da classe Aves que agrupa aves vulgarmente conhecidas como pássaros. Foram positivas sete ninfas e uma larva, de três indivíduos da espécie *Acrocephalus scirpaceus* (Rouxinol-pequeno-dos-caniços), uma ave migradora nidificante. Duas ninfas de dois indivíduos da espécie *Saxicola rubicola* (Cartaxo-comum), ave residente no EVOA. Uma ninfa de um indivíduo da espécie *Euplectes afer* (Bispo-de-coroa-amarela), um passeriforme residente.

Do total de 20 piolhos, foram testados 13 (65%), para *Rickettsia* e todos foram negativos, assim como a mosca hipoboscídeo testada (Quadro 3.5).

Quadro 3.4- Lista das espécies de aves selvagens e os respectivos ectoparasitas colhidos.

| Espécie das aves | Fenologia na área de estudo | Nº de indivíduos infestados | Espécies de ectoparasitas | | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------|------------------|
| | | | Ixodídeos (número/fase) | Piolhos | Moscas |
| | | | <i>H. marginatum</i> | <i>T. querquedulae</i> | <i>O. biloba</i> |
| Passeriformes | | | | | |
| <i>Acrocephalus scirpaceus*</i> (Rouxinol-pequeno-dos-caniços) | MN | 6 | 1L; 18N; 1F | | |
| <i>Euplectes afer*</i> (Bispo-de-coroa-amarela) | R | 2 | 4N | | |
| <i>Hirundo rustica</i> (Andorinha-das-chaminés) | MN | 1 | | | 1 |
| <i>Saxicola rubetra</i> (Cartaxo-nortenho) | MP | 1 | 55N | | |
| <i>Saxicola rubicola*</i> (Cartaxo-comum) | R | 6 | 1L; 14N; 1F | | |
| Anseriformes | | | | | |
| <i>Anas acuta</i> (Arrábio) | I | 4 | | 4 | |
| <i>Anas crecca</i> (Marrequinha-comum) | I | 12 | | 13 | |
| <i>Anas platyrhynchos</i> (Pato-real) | R | 2 | | 3 | |
| Total | | 34 | 2L; 91N; 2F | 20 | 1 |

Fenologia: R- Residente; MN - Migrador nidificante; MP -Migrador de passagem; I – Invernante

L- Larva; N- Ninfa; F- Fêmea

*Espécie com ixodídeos positivos para *Rickettsia* spp.

Quadro 3.5- Resultados da pesquisa de *Rickettsia* spp. nos ectoparasitas colhidos em aves selvagens.

| Ectoparasitas | Total | Fase ciclo de vida | | | <i>Rickettsia</i> spp. % (positivos/testados) | Espécie detetada |
|------------------------------|-------|--------------------|----|----|--------------------------------------------------|------------------------|
| | | L | N | A | | |
| Espécie de ixodídeo | | | | | | |
| <i>Hyalomma marginatum</i> | 95 | 2 | 91 | 2F | 11,6% (11/95) | <i>R. aeschlimanii</i> |
| Espécie de piolho | | | | | | |
| <i>Trinoton querquedulae</i> | 20 | | | | 0% (0/13) | |
| Espécie de mosca | | | | | | |
| <i>Ornithomya biloba</i> | 1 | | | | 0% (0/1) | |
| Total | 116 | | | | 10,1% (11/109) | |

L- Larva; N- Ninfa; A- Aulto; F- Fêmea

Animais domésticos

3.3. Caracterização morfológica e molecular dos ectoparasitas

Em 2021, durante os meses de primavera (março, abril e maio), foram recolhidos ectoparasitas de cinco cães e 13 gatos que chegaram à Associação Focinho's, no concelho de Alcácer do Sal. Foi colhido um total de 66 ectoparasitas, dos quais 34 (51,5%) ixodídeos e 32 (48,5%) pulgas. Foram identificadas duas espécies diferentes de ixodídeos, pertencentes ao mesmo género: *R. sanguineus* (82,4%) e *R. pusillus* (17,6%). Todos os ixodídeos identificados eram adultos, correspondendo 21 fêmeas (61,8%) e 13 machos (38,2%). Todas as pulgas foram identificadas como *Ctenocephalides felis*, não tendo sido possível identificar o sexo das mesmas (Quadro 3.6).

Do total de pulgas detetadas, foi realizada a identificação molecular em 15% (5/32) dos exemplares. onde todas apresentavam sequências idênticas, com 100% (491/491bp) de identidade com o gene COI de *C. felis* de sequências do GenBank (MN268683).

3.4. Deteção molecular de rickettsias nos ectoparasitas

Dos 24 *R. sanguineus* colhidos nos cães que foram testados para a presença de DNA de *Rickettsia* spp., apenas um (4,2%) exemplar foi positivo. A análise do fragmento da sequência do gene *gltA*, mostrou uma identidade de 99% (381/382bp) com *R. massiliae* (MT309038).

Nos gatos, foram colhidos quatro *R. sanguineus* e seis *R. pusillus* e foram testados para a presença de DNA de *Rickettsia* spp.. Todos os exemplares de *R. pusillus* foram negativos e três (75%) *R. sanguineus* foram positivos para *R. massiliae* (Quadro 3.6).

Das 32 pulgas colhidas, testámos 22 para a presença de DNA de *Rickettsia* spp. e as restantes foram congeladas a -80°C para futuras tentativas de isolamentos. Das 22 pulgas testadas, seis (27,3%) foram positivas (Quadro 3.6). A análise das sequências do gene *gltA* revelaram 100% (341/341bp) de identidade com *R. felis* (MT048288) em cinco pulgas e *R. asembonensis* (MN003394) em uma pulga.

Quadro 3.6- Resultados da pesquisa de *Rickettsia* spp. nos ectoparasitas colhidos dos animais domésticos (cães e gatos).

| Ectoparasitas | N total | Sexo (M; F) | Deteção de DNA de agentes patogénicos % (positivos/testados) | |
|---------------------------------|---------|-------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| | | | <i>Rickettsia</i> spp. | Espécies detetadas |
| Espécies de ixodídeos | | | | |
| <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | 28 | 11M; 17F | 14,3% (4/28) | <i>R. massiliae</i> |
| <i>Rhipicephalus pusillus</i> | 6 | 2M; 4F | 0% (0/6) | |
| Espécie de pulga | | | | |
| <i>Ctenocephalides felis</i> | 32 | | 27,3% (6/22) | <i>R. felis</i> <i>R. asemonensis</i> |
| Total | 66 | | 17,9% (10/56) | |

3.5. Deteção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos nas amostras de sangue dos cães

Foi feita a pesquisa de *Rickettsia*, *Babesia* e *Theileria* em 27 amostras de sangue colhidas em cães de canil, onde se incluem os cinco cães parasitados. Não foi detetado DNA de nenhum dos agentes patogénicos nesta matriz biológica (Quadro 3.7).

3.6. Deteção de anticorpos anti-*Rickettsia* por Imunofluorescência indireta em soros de cães

Foram testados 27 soros dos cães do canil e, do total de soros analisados, foram encontrados sete (25,9%) cães com anticorpos IgG anti-*Rickettsia* (Quadro 3.7). Cerca de dois (7,4%) tinham anticorpos com um título de 128, três (11,1%) com título 256 e dois (7,4%) com um título de 512.

Quadro 3.7- Resultados da pesquisa de agentes patogénicos por PCR e serologia no sangue dos cães.

| Agentes patogénicos testados | PCR | Serologia |
|--------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | % (positivos/testados) | % (positivos/testados) |
| Bactérias | | |
| <i>Rickettsia</i> spp. | 0% (0/27) | 25,9% (7/27) |
| Protozoários | | |
| <i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp. | 0% (0/27) | |

Capítulo 4 - Discussão

Conhecer as interações entre os agentes patogénicos, os seus artrópodes vetores, as espécies que circulam e os seus hospedeiros que envolvem o ciclo de vida do agente, é de extrema importância para caracterizar a sua eco-epidemiologia. Os estudos eco-epidemiológicos são importantes para prever e identificar potenciais agentes patogénicos para o Homem e animais e possíveis surtos e doenças, como zoonoses emergentes que possam surgir de focos silváticos e evoluir para focos urbanos. Os animais selvagens são importantes hospedeiros de uma variada gama de artrópodes vetores e dos agentes a eles associados, e comparativamente com os animais domésticos, são muito menos vezes estudados pela dificuldade em capturar estes animais. Os animais selvagens podem ser importantes sentinelas para identificar os agentes que circulam numa determinada área geográfica.

O foco principal neste trabalho, foi identificar que espécies de ectoparasitas parasitam determinados grupos de animais selvagens e que espécies de rickettsias e outros agentes estão associados a estes vetores. Paralelamente, foi também objetivo deste estudo analisar as amostras biológicas destes animais, para verificar se eles tinham bacteriémia e qual a sua resposta imunitária a estes agentes. Alargámos posteriormente este estudo aos ectoparasitas de cães e gatos domésticos, como estudo comparativo com os animais selvagens.

Podemos dizer que este é, provavelmente, o primeiro estudo no âmbito dos ectoparasitas e dos seus agentes zoonóticos realizado na população de lince ibérico reintroduzidos em Portugal, assim como nos cavalos selvagens da raça Garrana residentes no Norte de Portugal. A inclusão neste estudo da população das aves, pareceu-nos também ser relevante pela escassez de estudos na área da pesquisa das rickettsias nos ectoparasitas de aves em Portugal.

1. Lince ibérico

A área do nosso estudo foi o PNVG, uma das áreas selecionadas em 2015 para a reintrodução do lince ibérico no nosso país. O nosso estudo abrangeu os ectoparasitas colhidos na população de lince ibérico atualmente residente no parque, assim como os agentes patogénicos que neles circulam.

Diversos microrganismos transmitidos por vetores são conhecidos por infetar felinos domésticos e selvagens em todo o mundo, incluindo outras espécies de lince, como protozoários do filo Apicomplexa (*Babesia*, *Cytauxzoon*, *Theileria*, *Hepatozoon*) e bactérias do género *Bartonella*, *Rickettsia*, etc. As informações sobre agentes patogénicos associados a ectoparasitas de lince ibérico são escassas.

Neste estudo, detetámos a parasitar o lince ibérico, quatro espécies de ixodídeos: *I. ventralloi*, *R. pusillus*, *H. lusitanicum* e *R. sanguineus*, uma espécie de pulga *C. felis* e uma espécie de mosca hipoboscídeo, *H. longipennis*. Todas estas espécies de ectoparasitas encontradas nos lince ibéricos da população reintroduzida em Portugal, à exceção de *C. felis*, já havia sido antes descrita na população de lince ibéricos na Sierra Morena e Doñana em Espanha (Márquez & Millán, 2009; Millán et al.,

2007b). Este facto dá-nos uma ideia mais concreta sobre alguma especificidade que determinados vetores têm para algumas espécies.

Todos os ixodídeos recolhidos eram adultos, o que pode estar relacionado com a época da colheita do ano. Contudo, devemos salvaguardar que este facto pode também ter resultado do operador (médico veterinário), ao remover estes parasitas aleatoriamente, o possa ter feito porque a visualização e remoção de fases adultas será mais fácil. O facto de termos também uma percentagem pequena de pulgas na amostragem, pode ser devido à maior dificuldade da sua colheita, dada a pequena dimensão deste ectoparasita.

Verificámos ainda, que há uma diferença nas espécies de ixodídeos removidas dos lince durante os meses outubro-dezembro, comparativamente às espécies de ixodídeos recolhidas dos lince mortos nos meses de abril-maio. Durante o outono, *I. ventalloi* foi a espécie mais prevalente, enquanto nos meses de primavera a espécie predominante foi o *R. pusillus*. Ou seja, aparentemente, e mesmo tendo em conta que colhemos menos carraças na primavera, parece haver uma dinâmica sazonal, dependendo da estação do ano, em relação às espécies encontradas.

I. ventalloi e *R. pusillus* são as duas espécies mais prevalentes a parasitar o lince ibérico, e são também as mais frequentemente encontradas a parasitar a sua presa principal, o coelho europeu (*Oryctolagus cuniculus*) (Remesar et al., 2021). Muito provavelmente, o lince fica parasitado com estas espécies no ato de predação e procura da presa.

Estas espécies já tinham sido descritas a parasitar lince ibéricos (Márquez & Millán, 2009), gatos e cães (Pennisi et al., 2015) e também a parasitar outros mamíferos selvagens, tais como, coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), raposas (*Vulpes vulpes*), ouriços (*Erinaceus europaeus*), alguns roedores e também aves (Santos-Silva et al., 2006, 2011).

Estas espécies de ixodídeos tem uma ecologia endofílica, ou seja, recolhem-se em ninhos do seu hospedeiro principal, não estando presente livre na vegetação, podendo ocasionalmente encontrarem-se fora de tocas de coelhos, e conseqüentemente, podem parasitar outros hospedeiros.

Uma evidência que reforça a ecologia endofílica destas espécies, está relacionado com um estudo que foi realizado no PNVG (2012-2014) na mesma área, mas em que nunca foi detetada a presença de *I. ventalloi* ou *R. pusillus* na vegetação (Santos-Silva et al., 2017). Neste mesmo trabalho, *R. pusillus* só foi detetado em gineta-europeia (*Genetta genetta*) e gatos (*Felis catus*), espécies simpátricas do lince ibérico no PNVG (Santos-Silva et al., 2017). Por estes motivos, é essencial que quando se realizam estudos sobre a eco-epidemiologia dos vetores e dos seus ciclos de vida, tenhamos em conta os seus hospedeiros e o seu habitat. Muitas das vezes, os ectoparasitas associados a determinados animais podem não ser o reflexo dos ectoparasitas encontrados na vegetação e noutros animais. Este aspeto revela a importância da pesquisa destes ectoparasitas em populações de animais específicas e não só na área onde eles habitam.

As baixas prevalências de parasitação do lince com *H. lusitanicum* e *R. sanguineus*, leva-nos a querer que não sejam espécies que frequentemente se alimentem em lince, mas como são frequentemente

encontradas na vegetação em busca de um hospedeiro, é normal que esporadicamente, não tendo outros animais para se alimentar, que parasitem o lince.

Quanto aos insetos encontrados a parasitar os lincos, detetámos moscas hipoboscidae *H. longipennis*, também designadas de mosca-piolho do cão. Embora, *H. longipennis* seja um parasita muito comum de carnívoros domésticos e selvagens, particularmente na África Oriental, Norte África e Médio Oriente, a espécie tem sido relatada ocasionalmente noutros países, principalmente a parasitar cães domésticos. A maioria dos registos europeus são em regiões com clima mediterrâneo quente, como Espanha, Itália, Grécia, Chipre e Bulgária (Reeves & Lloyd, 2019). A presença de *H. longipennis* pode ser relevante, uma vez que pode ser um potencial vetor de microrganismos patogénicos para animais e para o Homem. Já foi relatada a sua potencial capacidade vetorial na transmissão de um nemátodo *Acanthocheilonema dracunculoides* e outros (Rani et al., 2011).

Neste estudo, das 10 moscas testadas para os agentes seleccionados, nenhuma foi positiva. Contudo, devemos ter sempre em conta que mesmo que os vetores não estejam infetados, eles podem causar outro tipo de reações, como prurido, irritação da pele e desconforto para seus hospedeiros (Reeves & Lloyd, 2019).

Deteção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos nos seus ectoparasitas

O estudo molecular dos ixodídeos colhidos nos lincos, revelou a presença de três espécies de *Rickettsia*: *R. sibirica mongolotimonae*, *R. helvetica*, e *R. massiliae*, em *R. pusillus*, *I. ventalloi*, e *R. sanguineus*, respetivamente. Estas espécies já tinham sido descritas previamente em Portugal, mas esta é a primeira vez que as detetamos em ectoparasitas colhidos em lincos-ibéricos em Portugal.

R. sibirica mongolotimonae é uma *Rickettsia* patogénica para o Homem e estão descritos casos em doentes Portugueses (De Sousa et al., 2006). *R. pusillus* é o principal vetor desta *Rickettsia* em Portugal, França e Espanha, e noutros países tem sido detetada no género *Hyalomma*. Curiosamente, *R. sibirica mongolotimonae* foi descrita pela primeira vez num sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) encontrado na mesma área do PNVG (De Sousa et al., 2006).

R. helvetica está associada à transmissão por carraças do género *Ixodes* e já tinha sido encontrada em *I. ventalloi* colhidos em lincos ibéricos em Espanha (Márquez & Millán, 2009), em gatos em Itália (Pennisi et al., 2015), e em aves em Portugal (Santos-Silva et al., 2006). É transmitida pelo mesmo vetor da *Borrelia s.l.*, mas existem muito poucos casos descritos de infeção no Homem (De Sousa R., 2019; Parola et al., 2005).

R. massiliae está associada a ixodídeos do género *Rhipicephalus*, e é a espécie de *Rickettsia* mais frequentemente encontrada neste género, comparativamente com *R. conorii*, também associada ao mesmo vetor. Estão descritos alguns casos de infeção no Homem em França (Vitale et al., 2006) Itália (Cascio et al., 2013) e Romênia (Zaharia et al., 2016) e em cães. Contudo, no estudo realizado em cães em Portugal e que revela a deteção de *R. massiliae* (Barradas et al., 2020), tem algumas

incongruências que nos sugerem que a sua deteção possa ter sido resultado de contaminações com os ixodídeos estudados na mesma altura. O facto de não conseguirem ter amplificado mais nenhum gene para além do *gltA*, revela fortes indícios de uma contaminação laboratorial.

Estudámos também a presença de protozoários do filo Apicomplexa (*Babesia*, *Cytauxzoon*, *Theileria*, *Hepatozoon*), que afetam carnívoros selvagens e domésticos. Por motivos económicos, não foram pesquisados em todos os ectoparasitas colhidos nos lince e foram selecionadas aleatoriamente um número de ixodídeos, pulgas e moscas, onde foram pesquisados esses agentes.

Detetámos DNA de *Hepatozoon felis* em dois machos de *H. lusitanicum* colhidos do mesmo lince ibérico. Existem poucos estudos sobre *H. felis* até ao momento e não estão descritos quais os seus vetores artrópodes, tendo sido apenas detetada a presença de DNA em algumas espécies de ixodídeos, como por exemplo, a deteção em *R. sanguineus* (Maia et al., 2014). Contudo, *H. felis* nunca foi anteriormente detetado em *H. lusitanicum*. Outras espécies de *Hepatozoon* foram encontradas em pulgas, ácaros, piolhos, mosquitos e flebotómíneos e por isso será provável que *H. felis* também possa ser transmitido por um artrópode hematófago. Este achado pode ser importante na epidemiologia de *H. felis* em Portugal, uma vez que poderá ser um possível vetor. Mas este facto precisa de estudos mais aprofundados, como pesquisa de oócitos de *H. felis* nos tecidos do ixodídeo. Por outro lado, este facto pode estar relacionado com a parasitação do lince ibérico e de este poder estar infetado com *H. felis*, uma vez que a sequência encontrada no lince é igual à sequência encontrada no ixodídeo. E também pelo facto de que no estudo realizado por Santos-Silva e colaboradores no PNVG, nenhum *H. lusitanicum* ter sido encontrado com *Hepatozoon* spp.

Ou seja, uma vez que este protozoário não é transmitido via picada de um artrópode e sim pela ingestão do mesmo, não nos parece que haja uma relação entre a elevada prevalência de *H. felis* nos lince ibéricos e este achado no *H. lusitanicum*.

H. lusitanicum está também associado à transmissão de *Theileria annulata* (Viseras, 1999) e também já foi encontrado DNA de *Rickettsia*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii* entre outros agentes, nesta espécie de ixodídeo (CEVDI, 2021; González et al., 2020; Santos-Silva et al., 2017). Apesar de *H. marginatum* estar mais frequentemente associado à espécie *R. aeschlimannii* em Portugal, já foi detetada *R. aeschlimannii* em *H. lusitanicum* no âmbito do programa REVIVE (Relatório REVIVE, 2018).

Deteção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos nas amostras de sangue

De 39 sangues de lince analisados para a presença de bactérias do género *Rickettsia* e *Bartonella* e protozoários *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* e *Hepatozoon*, todas as amostras foram negativas à exceção de *Hepatozoon felis*, que foi positivo em 61,5% (n=24) dos lince ibéricos e *Cytauxzoon* spp. em 33,3% (n=13) da amostra. Não foram detetados lince bacteriémicos, ao contrário de estudos anteriores que relatam uma prevalência de 37% em *Lynx rufus* (EUA) e 33,3% em *Lynx pardinus*

(Espanha) relativamente à presença de *Bartonella henselae* (Kosoy & Goodrich, 2018; Meli et al., 2009). No entanto, estudos realizados em gatos em Portugal descrevem uma prevalência de *Bartonella* spp. no sangue que variam entre 1,5% (Maia et al., 2014) a 46,1% (Alves et al., 2009).

Relativamente ao *H. felis*, a alta prevalência encontrada, pode indicar que o linco ibérico possa desempenhar um papel no ciclo de vida deste parasita e na epizootia da hepatozoonose em Portugal e deve ser investigado. Este é o primeiro relato de *Hepatozoon felis* em sangue de linco ibérico. Em Portugal este protozoário foi relatado no sangue de gatos com uma prevalência de 5,7 %, em gatos no sul de Portugal (Maia et al., 2014) e gatos no norte e centro do país com uma prevalência de 13,8% (Vilhena et al., 2013). *H. felis* é uma espécie conhecida por causar doença principalmente em gatos (Baneth et al., 2013).

Até ao momento, não se sabe exatamente o modo de infeção dos felinos por esta espécie de *Hepatozoon*, uma vez que nenhum vetor artrópode ainda foi confirmado. Mas tendo em conta que os parasitas deste género têm como hospedeiro definitivo um artrópode vetor, associa-se que seja transmitido de igual forma que outros, através da ingestão de ixodídeos.

A possibilidade de haver mais do que uma rota de transmissão é possível, uma vez que outras espécies de *Hepatozoon* são transmitidos tanto por vetores artrópodes quanto por outras vias, como por exemplo, *H. canis* é transmitido por *R. sanguineus*, e por via transplacentária, e *H. americanum* é transmitido pelo *Amblyomma maculatum* e por carnivorismo (Johnson et al., 2009) (Baneth, 2011).

Para este resultado propomos várias hipóteses para haver uma prevalência de infeção por *H. felis* tão elevada. Sendo este um parasita transmitido através da ingestão de artrópodes vetores infetados, levamos a querer que a predação do coelho-europeu, possa estar ligado com esta alta prevalência de *H. felis*, no entanto das espécies de ixodídeos que mais vulgarmente parasitam o coelho, nenhuma foi positiva para *Hepatozoon*.

Outra hipótese tem haver também com a predação, mas a passagem do protozoário não se realiza por ingestão de oocistos de *H. felis* presentes nos artrópodes vetores, mas sim por ingestão de tecidos do hospedeiro mamífero infetado com merozoítos de *H. felis*.

Outra possibilidade é que os lincos são reservatórios deste protozoário e que o mantêm em circulação e infetam posteriormente os ixodídeos ou outros vetores.

São necessários estudos mais aprofundados para perceber se estes lincos têm infeção de merozoítos nos tecidos musculares ou se estes estão presentes como gametócitos nos seus leucócitos e monócitos. Uma coincidência que poderá estar relacionado com a alta prevalência de infeção por *H. felis*, é a atividade aumentada de desidrogenase láctica (LDH) em 64,3% dos lincos analisados e a da creatinofosfoquinase (CPK) (dados não mostrados) e que podem sugerir que os lincos possam ter algum dano no tecido muscular causados por *H. felis*.

A infeção transplacentária, também pode ser uma possibilidade, uma vez que 53,5% dos lincos analisados tem menos de 1 ano de idade e 39,5% deles já estão infetados, assim como algumas das suas progenitoras (dados não mostrados). Esta hipótese já foi demonstrada num estudo com gatos na Espanha (Baneth et al., 2013).

A hepatozoonose felina parece ser principalmente subclínica, visto que uma alta proporção da população está infetada sem manifestações clínicas aparentes. A sua ampla distribuição geográfica

pode ser devida à transmissão por algum vetor com uma distribuição global, como uma espécie de pulga, ácaro ou ixodídeo ou até mesmo uma mosca hipoboscídeo, ou a vias alternativas de transmissão altamente bem-sucedidas, como transmissão transplacentária ou carnivorismo de um hospedeiro intermediário de vida selvagem ainda desconhecido.

Detetámos ainda 33,3% dos lince positivos para *Cytauxzoon* spp., mas não foi possível confirmar a espécie. Foi realizado um PCR convencional com *primers* específicos para a espécie *Cytauxzoon felis*, ao qual não obtivemos positivos. O que nos leva a querer que estes possam estar infetados com outras espécies de *Cytauxzoon*, que têm vindo a ser reportadas em felinos na Europa (Panait et al., 2021). Este resultado vai de encontro com os relatos de infeção por *Cytauxzoon* spp. na população de lince ibéricos de vida livre da Serra Morena, na Andaluzia, Espanha (Meli et al., 2009; Millán et al., 2007).

Deteção de anticorpos anti-*Rickettsia* e anti-*Bartonella* por Imunofluorescência indireta em soros de lince ibérico

No sentido de perceber a exposição e a resposta imunitária dos lince a rickettsias e *Bartonella*, investigámos a presença de anticorpos específicos nestes animais. Do total dos 39 lince analisados por IFA, 82,1% (32/39) e 41,0% (16/39) apresentavam títulos positivos de anticorpos anti-*Rickettsia* e anti-*B. henselae*, respetivamente. A prevalência de anticorpos anti-*Rickettsia* do GFE obtida neste estudo, é semelhante à encontrada em lince (*Lynx rufus*) nos EUA (87%) (Chomel et al., 2004), mas mais elevada quando comparada com outros felinos, como em gatos domésticos (16,2% e 43,2 %) em Portugal e noutros países Europeus (Alves et al., 2009).

Comparando os resultados obtidos por serologia e por biologia molecular nos sangue dos lince ibéricos, a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* difere bastante da bacteriémia, uma vez que nenhum dos lince foi positivo para presença de *Rickettsia* spp.. Este facto demonstra possivelmente que os lince podem apresentar uma rickettsiémia transitória, e que apesar de se poderem infetar, muito provavelmente não desenvolvem sinais clínicos e não são reservatórios de *Rickettsia*.

A prevalência de anticorpos anti-*B.henselae* obtida neste trabalho, é semelhante aos valores descritos em estudos anteriores em felinos domésticos na Europa, Itália (45,9%)(Ebani et al., 2020), Grécia (58,8%)(Diakou et al., 2017) e Portugal (48,1%)(Alves et al., 2009), onde foi utilizada a mesma técnica e o mesmo cut-off de positividade. No entanto nos EUA é descrita uma prevalência mais baixa (23,1%) em lince (*Lynx rufus*) (Chomel et al., 2004) utilizando a mesma técnica e o mesmo cut-off.

2. Cavalos de raça Garrana

O estudo realizado nos cavalos Garranos ao longo de dois anos, identificou *R. bursa* (78,3%) como a principal espécie de ixodídeo que parasita os Garranos. Todos os ixodídeos encontrados a parasitar os cavalos eram adultos. Este facto pode ser devido à estação do ano em que foram colhidos (verão) ou devido à dificuldade da colheita, uma vez que os estados larvares e de ninfa são difíceis de visualizar.

R. bursa está descrito em vários países a parasitar ruminantes, javalis e cães, e já tinha sido reportado em cavalos domésticos na região Norte do País (Ferrolo et al., 2016).

Deteção molecular de rickettsias e outros agentes patogénicos nos seus ectoparasitas

Do total de 90 *R. bursa* analisados, 23% foram positivos para *Candidatus Rickettsia barbariae*. Esta *Rickettsia* foi identificada pela primeira vez em *R. bursa* colhidos em ovelhas no Sul de Portugal e designada PoTiRb169 (De Sousa et al., 2006). Desde então tem sido detetada em vários países, tanto em *R. bursa* (Abdelkadir et al., 2019; Cicculli et al., 2019) como em outras espécies de ixodídeos, tais como *R. turanicus* e *R. sanguineus* (Chochlakis et al., 2012; Mura et al., 2008; Waner et al., 2014). Até hoje não há casos de doença associados a esta *Rickettsia*, apesar de esporadicamente estar descrita a remoção de *R. bursa* do Homem (Papa et al., 2016).

Foi também detetado *R. massilae* num *R. bursa* e num *R. sanguineus*, tal como descrito anteriormente nos *R. sanguineus* colhidos em lince. Em *R. sanguineus* colhidos nos Garranos, foi também detetada *R. conorii*, o agente da febre escarar-nodular e uma das espécies mais patogénicas para o Homem. A baixa prevalência encontrada em ixodídeos, deve-se em geral ao facto de esta ter também um efeito deletério para o seu próprio vetor (Socolovschi et al., 2012).

Quanto à pesquisa de *Babesia* spp. e *Theileria* spp., detetámos ixodídeos infetados com *Babesia caballi* e *Theileria equi*. Estas duas espécies são os agentes responsáveis pela piroplasmose equina, que é uma doença que afeta equídeos (cavalos, burros, mulas e zebras). Animais infetados são portadores destes agentes por um longo período de tempo e servem como fonte de infeção para os ixodídeos. Esta doença é endémica nas regiões tropicais e subtropicais, onde os seus vetores são conhecidos. Estão confirmados que algumas espécies dos géneros, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma* são vetores competentes destes agentes (Onyiche et al., 2019; Scoles & Ueti, 2015).

Estes protozoários têm distribuição geográfica semelhante, uma vez que os vetores associados à sua transmissão são comuns. Contudo, apresentam ciclos de vida diferentes, onde *B. caballi* é transmitida transovariamente, enquanto que *T. equi* é transmitida apenas transestadialmente (Scoles & Ueti, 2015). A diferença de prevalência encontrada entre *T. equi* (21,7%) e *B. caballi* (5,2%), tem sido relatada noutros estudos em ixodídeos, assim como no sangue de equinos. Esta diferença nas prevalências de infeção, pode ser explicado pelo facto de que, equídeos uma vez infetados com *T. equi* permanecem portadores desse protozoário para o resto da vida como infeção crónica, este facto pode sugerir que, os ixodídeos não infetados adquirem este agente durante a sua alimentação nos equinos

infetados/reservatórios. No caso de *B. cabalii*, estes resultados podem sugerir que, *R bursa* não seja um vetor capaz de transmitir este agente transovaricamente e por sua vez mantê-lo na natureza, uma vez que a infecção de ixodídeos por alimentação em equinos não é tão provável, porque os equinos infetados que sobrevivem à infecção por *B. cabalii* eliminam completamente este agente da circulação sanguínea passado uns anos (Onyiche et al., 2019).

Em Portugal existem vários estudos em cavalos, nomeadamente na região Norte, que comprovam que estes animais tem altas prevalências de anticorpos contra estes agentes (Ribeiro et al., 2013). No entanto, o estudo realizado em vetores é reduzido.

R. bursa é um vetor confirmado de *T. equi*, mas não é conhecido como vetor de *B. cabalii*, no entanto, demonstra ter um papel importante na sua distribuição, já tendo sido reportado nesta espécie de ixodídeos anteriormente (Onyiche et al., 2019; Romiti et al., 2020). A deteção de *T. equi* em *R. sanguineus* pode sugerir que este tenha um papel como vetor deste agente, no entanto a sua capacidade vetorial ainda não foi comprovada.

Estes estudos são fundamentais para compreender o ciclo enzoótico desta doença em Portugal, demonstrando a importância de estudar os ectoparasitas, para melhor compreensão da relação entre os vetores e os hospedeiros, poder identificar potenciais agentes que circulam na natureza e o impacto que têm na população destes animais e de outros que estão em contacto e habitam em áreas comuns.

Apesar de não terem sido realizados estudos serológicos e/ou moleculares em amostras de sangue destes animais, seria de todo o interesse compreender o papel destes animais na eco-epidemiologia de várias espécies de *Rickettsia* e até mesmo de outros agentes.

De realçar que estes animais podem ser utilizados em práticas desportivas (corridas, equitação, etc.) e turismo equestre, o que propicia o contacto entre os seus ectoparasitas e o Homem, podendo ser importante na prevenção de doenças associadas a vetores.

3. Aves selvagens

Neste estudo foram colhidos ixodídeos de aves do EVOA, localizado no estuário do Tejo. Os ixodídeos foram identificados morfologicamente e alguns confirmados por biologia molecular, uma vez que a identificação da espécie de larvas e ninfas requer alguma perícia. Todos os ixodídeos identificados (n=95), eram da espécie *H. marginatum* e foram identificadas as três fases evolutivas (2,1%) larvas (95,8%) ninfas e (2,1%) adultos.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores em aves selvagens, onde as fases imaturas de *H. marginatum* são as mais frequentemente reportadas a parasitar aves selvagens (Santos-Silva et al., 2006). Contudo, em estudos anteriores realizados em Portugal foram identificadas também outras espécies de ixodídeos como: *H. lusitanicum*, *Ixodes ventalloi*, *I. canisuga*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. pusillus*, *R. turanicus*, entre outros (Silva et al. 2001; Santos-Silva et al., 2006).

Na pesquisa de agentes nos ixodídeos colhidos em aves, detetámos a presença de *R. aeschlimannii* (11,6%) em fases imaturas de *H. marginatum*. Esta espécie de *Rickettsia* já foi encontrada a causar doença no Homem e, até à data, estão descritos seis casos humanos; quatro em doentes infetados em África e mais recentemente, o primeiro caso europeu, num doente infetado na Grécia (Raoult et al. 2002). As manifestações clínicas são idênticas às de outras rickettsioses (De Sousa R., 2019). De acordo com o programa REVIVE, a prevalência de infeção para *R. aeschlimanni* em *H. marginatum* é de cerca de 20-25% nos ixodídeos recolhidos a nível nacional (CEVDI, 2021).

A presença de *H. marginatum* infetados com *R. aeschlimannii* foi mais elevada em aves migradoras, como o *Acrocephalus scirpaceus* comparativamente às aves residentes. Este facto, demonstra o papel relevante que estas aves podem ter na disseminação de carraças infetadas não só com rickettsias, mas também com outros agentes potencialmente patogénicos para o Homem.

Aves selvagens são conhecidas como importantes reservatórios/hospedeiros de alguns ectoparasitas e agentes patogénicos. As aves migratórias podem viajar milhares de quilómetros e transportar consigo ixodídeos, pulgas, piolhos, moscas entre outros, disseminando-os por várias regiões geográficas. Através dessas rotas migratórias podem ser trazidos novos artrópodes vetores, assim como agentes a eles associados, para uma fauna onde estes não estão presentes, dando início a um novo ciclo de transmissão entre as aves selvagens e as populações de animais locais. Embora alguns elementos da migração das aves possam ser previstos (e.g. local de nidificação), é difícil quantificar o risco que isso representa em termos de entrada e saída de artrópodes vetores e os agentes a eles a associados. (Sparagano et al., 2015).

No nosso estudo verificámos que os passeriformes são mais frequentemente parasitados por ixodídeos, mas podem também transportar outros artrópodes hematófagos. Os anseriformes são frequentemente parasitados por piolhos mastigadores e não ixodídeos, uma vez que estes se encontram no meio aquático.

Dos insetos colhidos nestas aves, temos a salientar a identificação da mosca *Ornithomya biloba* encontrada a parasitar a Andorinha-das-Chaminés (*Hirundo rustica*), uma espécie migratória. Esta mosca já tinha sido identificada nesta espécie de passeriforme na Eslováquia (Oboňa et al., 2019, 2021). *O. biloba* é um ectoparasita de pássaros e é comum na Europa, no entanto, a sua distribuição ainda não é totalmente conhecida. Esta é a primeira vez que esta espécie de mosca é descrita em Portugal. Sendo um artrópode hematófago pode vir a ser importantes sob ponto de vista epidemiológico, uma vez que já há vários relatos de agentes patogénicos noutras espécies de moscas hisposcídios (Bezerra-Santos & Otranto, 2020).

A espécie de piolho detetada nos anseriformes (*Trinoton querquedulae*) já foi detetada no Sul de Portugal (Tomás et al., 2016). Estes piolhos mastigadores são ectoparasitas permanentes e obrigatórios específicos do hospedeiro, comumente encontrados em pássaros. Os piolhos mastigadores de pássaros alimentam-se principalmente de penas e detritos dérmicos, embora algumas espécies se alimentam de sangue e por isso não se sabe se terão algum papel relevante na transmissão de potenciais agentes patogénicos.

4. Animais domésticos

Os ectoparasitas encontrados a parasitar os cães e gatos domésticos recolhidos pela Associação de Proteção de Animais, foram *R. sanguineus*, nos cães e *R. pusillus*, *R. sanguineus* e pulgas *C. felis* em gatos. Estes achados vão de encontro ao já descrito noutros estudos, realizados quer em Portugal quer noutros países da Europa (Alves et al., 2009; Pennisi et al., 2015).

A pulga do gato, *C. felis*, é a espécie de pulga mais comum a parasitar cães e gatos em todo o mundo, tendo uma distribuição cosmopolita. *C. felis* é um vetor de vários agentes patogénicos para o Homem incluindo as espécies de *Bartonella* e *Rickettsia* (Chomel et al. 2006, Reif & Macaluso 2009). Do total de 22 pulgas *C. felis* testadas para *Rickettsia*, 22,7% foram positivas para *R. felis* e 4,5% para *R. asembonensis*.

Apesar de *R. felis* ser encontrada geralmente associada à pulga *C. felis* (Reif & Macaluso, 2009) existem outras espécies de pulgas que também já foram encontradas infetadas com esta *Rickettsia* (Rakotonanahary et al. 2017). *R. felis* já foi encontrada em pulgas de gatos em todos os continentes (Shaw et al. 2004 Hawley et al. 2007 Gilles et al. 2008 Giudice et al. 2014).

Estudos demonstram que *R. felis* pode ser transmitido entre *C. felis* por co-alimentação e acasalamento (Hirunkanokpun et al., 2011) e outros indicam que *R. felis* é mantida em *C. felis* por transmissão vertical (transovárica e transtadial) (Reif & Macaluso, 2009), no entanto ainda não foi comprovado nenhum destes modos de transmissão em pulgas capturadas da natureza. Estudos sugerem que os animais domésticos como cães e gatos são considerados hospedeiros reservatórios (Gracia et al., 2015; Ng-Nguyen et al., 2020). Esta rickettsia é patogénica para o Homem e já foram relatados vários casos de doença em vários países, não incluindo Portugal.

Neste estudo foi também possível detetar *R. asembonensis* em pulgas de gato. Esta rickettsia foi descrita muito recentemente em pulgas de ouriço (*A. erinacei*) colhidas no nosso país (Barradas et al., 2021). Esta espécie foi inicialmente identificada no Quênia, na região de Asembo, e desde então tem sido relatada em outros locais na África, Ásia, Oriente Médio, Europa, e no Norte e Sul da América, apresentando uma ampla distribuição geográfica. Apesar de ter sido primeiramente isolada de *C. felis*, tem sido detetada em várias espécies de pulgas e outros artrópodes hematófagos (Maina et al., 2019).

Vários estudos apontam para que os gatos possam ter uma importância muito relevante nos ciclos de transmissão de várias zoonoses, principalmente as transmitidas por vetores, uma vez que quando vivem ao ar livre são frequentemente parasitados por ixodídeos e pulgas (Persichetti et al., 2018).

A vulnerabilidade das populações humanas às rickettsias transmitidas por pulgas, é particularmente preocupante em países desenvolvidos, uma vez que são implementados programas agressivos de controle de pragas e podem não controlar os seus ectoparasitas, o que pode resultar na realocação de vetores artrópodes para novos hospedeiros (e.g. humanos e seus animais de estimação), por exemplo após o extermínio de roedores.

A detecção destes agentes nestes vetores proporcionou um melhor conhecimento sobre a diversidade de rickettsias transmitidas por pulgas do gato e demonstra que é fundamental a realização da vigilância dos vetores e de potenciais agentes patogénicos para o Homem.

Deteção de anticorpos anti-*Rickettsia* por Imunofluorescência indireta em soros de cães

O estudo serológico realizado nos cães do canil, mostrou uma seroprevalência para anticorpos anti-*Rickettsia* de 25,9%. Esta prevalência é ligeiramente inferior a estudos realizados anteriormente em Portugal, em que se relata uma seroprevalência de 38,5% em cães do Sul do país (Alexandre et al., 2011). Os valores da seroprevalência em cães de Países ao redor do Mediterrâneo são variáveis, por exemplo 56,4% em Espanha (Solano-Gallego et al., 2006). e 81% em Israel, onde sucedem casos humanos (Harrus et al., 2007).

Alguns estudos relatam uma sazonalidade dos títulos de anticorpos em cães, que indicam uma resposta imune de curta duração, devido a reinfeções frequentes por *Rickettsia* spp.. Com base nesta observação, a seroprevalência em cães tem sido usada como marcador epidemiológico de infeções por *R. conorii* (Ortuño et al., 2009). Estudos relatam que a prevalência e os títulos de anticorpos diminuíram rapidamente no inverno, quando os *R. sanguineus* estavam inativos, mas aumentaram novamente na primavera seguinte (Levin et al., 2012).

É de realçar que os canídeos estudados são provenientes de um canil, onde é feita profilaxia de ectoparasitas sob diversas formas, explicando a baixa percentagem encontrada de anticorpos anti-*Rickettsia* e o facto de todos eles não apresentarem bacteriémia e parasitémia para microrganismos do género *Rickettsia*, *Babesia* e *Theileria*.

Os cães normalmente não apresentam sinais clínicos de doença. No entanto, quando existe alguma falha metabólica ou imunológica podem desenvolver doença após a infeção por *R. conorii* (Solano-Gallego et al., 2006). Por outro lado, a inespecificidade e autolimitação da infeção por *R. conorii*, combinada com falta de técnicas diagnósticas específicas e um baixo índice de suspeita por médicos veterinários, pode ter impedido a associação de infeção por *R. conorii* a sinais clínicos em cães (Solano-Gallego et al., 2006).

Conclusão

O objetivo principal deste estudo foi estudar a eco-epidemiologia de bactérias do género *Rickettsia*, *Bartonella* e protozoários do filo Apicomplexa, em populações específicas de animais selvagens e domésticos, assim como nos seus ectoparasitas.

Neste trabalho, concluímos que o lince ibérico (*Lynx pardinus*) é frequentemente parasitado com as espécies de ixodídeos *I. ventalloi* e *R. pusillus*, associados à sua presa principal, o coelho europeu. Associados aos seus ectoparasitas identificámos a presença de agentes patogénicos como *R. sibirica mongolitimonae*, *R. helvetica* e *R. massiliae*. O lince ibérico demonstra ainda ser um potencial reservatório de *Hepatozoon felis* e *Cytauxzoon* spp. e os dados serológicos nesta população revelaram uma elevada exposição a *Rickettsia* e *Bartonella*. Realçamos também a descoberta de mosca *H. longipennis* a parasitar os lincos.

Nos cavalos da raça Garrana (*Equus caballus celticus*), concluímos que estes animais estão frequentemente parasitados por *R. bursa* e outros ixodídeos como *R. sanguineus*, nos quais foram detetadas a presença de *Rickettsia aeschlimannii*, *Candidatus R. barbarie*, *R. conorii*, *R. massiliae*, agentes patogénicos para o Homem e *Theileria equi* e *Babesia cabalii* associados à piroplasmose equina.

Neste estudo corroborámos ainda o que outros estudos têm vindo a demonstrar, relativamente ao papel das aves na disseminação de ectoparasitas e na manutenção de ciclo de transmissão de alguns agentes patogénicos. Dos insetos colhidos em aves, temos a salientar a identificação da mosca *O. biloba* encontrada a parasitar uma espécie migratória, nomeadamente a Andorinha-das-Chaminés (*Hirundo rustica*), identificada pela primeira vez em Portugal.

O estudo realizado nos cães e nos gatos domésticos, mostra que estes animais são parasitados por diferentes tipos de vetores, como ixodídeos e pulgas e que estes podem estar infetados com espécies patogénicas para o Homem. Este facto realça a extrema importância de manter estes animais desparasitados, uma vez que estes animais mantêm uma proximidade estreita com o Homem.

Este estudo demonstra que existe alguma “especificidade” entre as espécies de vetores (e.g. espécies de ixodídeos) e os seus hospedeiros, e que este facto também condiciona o tipo de agentes patogénicos que podem ser transmitidos aos hospedeiros, ou acidentalmente ao Homem, quando este entra em contacto próximo com estes animais.

Este estudo reforça por isso a ideia do conceito de uma “só saúde” e a importância dos estudos integrados na vertente animal, humana interligados com o ambiente. A vigilância e compreensão dos potenciais ciclos de transmissão / infeção de agentes patogénicos para o Homem e os animais são fundamentais para mitigar o impacto das zoonoses transmitidas por vetores.

Referências

- Abdad, M. Y., Abou Abdallah, R., Fournier, P.-E., Stenos, J., & Vasoo, S. (2018). A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(8), e01728-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-17>
- Abdelkadir, K., Palomar, A. M., Portillo, A., Oteo, J. A., Ait-Oudhia, K., & Khelef, D. (2019). Presence of *Rickettsia aeschlimannii*, «*Candidatus Rickettsia barbariae*» and *Coxiella burnetii* in ticks from livestock in Northwestern Algeria. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4), 924–928. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.018>
- Alexandre, N., Santos, A. S., Bacellar, F., Boinas, F. J., Nuncio, M. S., & de Sousa, R. (2011). Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(2), 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.03.001>
- Álvarez-Fernández, A., Breitschwerdt, E. B., & Solano-Gallego, L. (2018). Bartonella infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasites & Vectors*, 11(1), 624. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3152-6>
- Alves, A. S., Milhano, N., Santos-Silva, M., Santos, A. S., Vilhena, M., & de Sousa, R. (2009). Evidence of Bartonella spp., Rickettsia spp. And Anaplasma phagocytophilum in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 1–3. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02636.x>
- Anderson, K. B., Thomas, S. J., & Endy, T. P. (2016). The Emergence of Zika Virus: A Narrative Review. *Annals of Internal Medicine*, 165(3), 175. <https://doi.org/10.7326/M16-0617>
- Bacellar, F., Lencastre, I., & Filipe, A. R. (1998). O tifo murino estará a re-emergir em Portugal? *Eurosurveillance*, 3(2), 18–20. <https://doi.org/10.2807/esm.03.02.00124-pt>
- Bacellar, F., Nuncio, M. S., Alves, M. J., & Filipe, A. R. (1995). [Rickettsia slovaca: An agent of the group of exanthematous fevers, in Portugal]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 13(4), 218–223.
- Bacellar, F., Sousa, R., Santos, A., Santos-Silva, M., & Parola, P. (2002). Boutonneuse fever in Portugal: 1995–2000. Data of a state laboratory. *European Journal of Epidemiology*, 18(3), 275–277. <https://doi.org/10.1023/A:1023391212354>
- Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.015>
- Baneth, G., Sheiner, A., Eyal, O., Hahn, S., Beaufils, J.-P., Anug, Y., & Talmi-Frank, D. (2013). Redescription of Hepatozoon felis (Apicomplexa: Hepatozoidae) based on phylogenetic analysis, tissue and blood form morphology, and possible transplacental transmission. *Parasites & Vectors*, 6(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-102>
- Baptista, S., Quaresma, A., Aires, T., Kurtenbach, K., Santos-Reis, M., Nicholson, M., & Collares-Pereira, M. (2004). Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293, 109–116. [https://doi.org/10.1016/S1433-1128\(04\)80016-0](https://doi.org/10.1016/S1433-1128(04)80016-0)
- Barradas, P. F., Mesquita, J. R., Ferreira, P., Amorim, I., & Gärtner, F. (2020). Detection of tick-borne pathogens in Rhipicephalus sanguineus sensu lato and dogs from different districts of Portugal. *Ticks and tick-borne diseases*, 11(6), 101536. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101536>

Barradas, P. F., Mesquita, J. R., Mateus, T. L., Ferreira, P., Amorim, I., Gärtner, F., & de Sousa, R. (2021). Molecular detection of *Rickettsia* spp. in ticks and fleas collected from rescued hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Portugal. *Experimental and Applied Acarology*, 83(3), 449–460. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00600-y>

Birtles, R. J., & Raoult, D. (1996). Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *International journal of systematic bacteriology*, 46(4), 891–897. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-891>

Bezerra-Santos, M. A., & Otranto, D. (2020). Keds, the enigmatic flies and their role as vectors of pathogens. *Acta Tropica*, 209, 105521. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105521>

Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M., & Nene, V. (2004). Theileria: Intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*, 129 Suppl, S271–283. <https://doi.org/10.1017/s0031182003004748>

Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M. F., & Raoult, D. (2010). Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(8), e667–e676. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.11.011>

Black, W. C., 4th, & Piesman, J. (1994). Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), 10034–10038. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.10034>

Breitschwerdt, E. B. (2017). Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 96–e21. <https://doi.org/10.1111/vde.12413>

Brissos, J., de Sousa, R., Santos, A. S., & Gouveia, C. (2015). Rickettsial infection caused by accidental conjunctival inoculation. *BMJ Case Reports*, 2015, bcr2014207029. <https://doi.org/10.1136/bcr-2014-207029>

Cascio, A., Torina, A., Valenzise, M., Blanda, V., Camarda, N., Bombaci, S., Iaria, C., De Luca, F., & Wasniewska, M. (2013). Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Rickettsia massiliae*. *Emerging infectious diseases*, 19(5), 836–837. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121169>

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. (2021). REVIVE 2020 Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP).

Chochlakis, D., Ioannou, I., Sandalakis, V., Dimitriou, T., Kassinis, N., Papadopoulos, B., Tselentis, Y., & Psaroulaki, A. (2012). Spotted fever group *Rickettsiae* in ticks in Cyprus. *Microbial Ecology*, 63(2), 314–323. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9926-4>

Choi, Y. J., Jang, W. J., Kim, J. H., Ryu, J. S., Lee, S. H., Park, K. H., Paik, H. S., Koh, Y. S., Choi, M. S., & Kim, I. S. (2005). Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerging infectious diseases*, 11(2), 237–244. <https://doi.org/10.3201/eid1102.040603>

Chomel, BB, Boulouis, HJ, Maruyama, S., & Breitschwerdt, EB (2006). *Bartonella* spp. em animais de estimação e efeito na saúde humana. *Doenças infecciosas emergentes*, 12 (3), 389-394. <https://doi.org/10.3201/eid1203.050931>

Chomel, B. B., & Kasten, R. W. (2010). Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 743–750. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04679.x>

Chomel, B. B., Kikuchi, Y., Martenson, J. S., Roelke-Parker, M. E., Chang, C.-C., Kasten, R. W., Foley, J. E., Laudre, J., Murphy, K., Swift, P. K., Kramer, V. L., & O'Brien, S. J. (2004). Seroprevalence of

Bartonella infection in American free-ranging and captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). *Veterinary Research*, 35(2), 233–241. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004001>

Ciculli, V., Capai, L., Quilichini, Y., Masse, S., Fernández-Alvarez, A., Minodier, L., Bompard, P., Charrel, R., & Falchi, A. (2019). Molecular investigation of tick-borne pathogens in ixodid ticks infesting domestic animals (cattle and sheep) and small rodents (black rats) of Corsica, France. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(3), 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.007>

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

De Bruin, A., van Leeuwen, A. D., Jahfari, S., Takken, W., Földvári, M., Dremmel, L., Sprong, H., & Földvári, G. (2015). Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0764-y>

De Carvalho, I. L., Milhano, N., Santos, A. S., Almeida, V., Barros, S. C., De Sousa, R., & Nuncio, M. S. (2008). Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 8(4), 575–579. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0245>

De Sousa, R., Barata, C., Vitorino, L., Santos-Silva, M., Carrapato, C., Torgal, J., Walker, D., & Bacellar, F. (2006). *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 12(7), 1103–1108. <https://doi.org/10.3201/eid1207.051494>

De Sousa, R., França, A., Dória Nóbrega, S., Belo, A., Amaro, M., Abreu, T., Poças, J., Proença, P., Vaz, J., Torgal, J., Bacellar, F., Ismail, N., & Walker, D. H. (2008). Host- and microbe-related risk factors for and pathophysiology of fatal *Rickettsia conorii* infection in Portuguese patients. *The Journal of infectious diseases*, 198(4), 576–585. <https://doi.org/10.1086/590211>

De Sousa, R., Lopes de Carvalho, I., Santos, A. S., Bernardes, C., Milhano, N., Jesus, J., Menezes, D., & Nuncio, M. S. (2012). Role of the lizard *Teira dugesii* as a potential host for *Ixodes ricinus* tick-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3767–3769. <https://doi.org/10.1128/AEM.07945-11>

De Sousa, R., Pereira, B. I., Nazareth, C., Cabral, S., Ventura, C., Crespo, P., Marques, N., & da Cunha, S. (2013). *Rickettsia slovaca* Infection in Humans, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), 1627–1629. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130376>

De Sousa, R. M. (2007). Mediterranean Spotted Fever and Identification of New Agents of Rickettsioses in Portugal [Tese de Doutoramento em Ciências da Vida (Saúde Pública), Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa].

De Sousa R., R. (2019). Febre escaro-nodular e outras Rickettsioses. Em M. S. Nuncio & M. J. Alves (Eds.), *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores* (2ª edição). Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP); Departamento de doenças infecciosas, Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac.

Dennis, D. T., & Piesman, J. F. (2005). Chapter1- Overview of Tick-Borne Infections of Humans. Em J. L. Goodman, D. T. Dennis, & D. E. Sonenshine (Eds.), *Tick-Borne Diseases of Humans* (pp. 1–11). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555816490.ch1>

Diakou, A., Di Cesare, A., Accettura, P. M., Barros, L., Iorio, R., Paoletti, B., Frangipane di Regalbono, A., Halos, L., Beugnet, F., & Traversa, D. (2017). Intestinal parasites and vector-borne pathogens in stray and free-roaming cats living in continental and insular Greece. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(1), e0005335. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005335>

- Ebani, V. V., Guardone, L., Marra, F., Altomonte, I., Nardoni, S., & Mancianti, F. (2020). Arthropod-Borne Pathogens in Stray Cats from Northern Italy: A Serological and Molecular Survey. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(12), E2334. <https://doi.org/10.3390/ani10122334>
- Eremeeva, M. E., Bosserman, E. A., Demma, L. J., Zambrano, M. L., Blau, D. M., & Dasch, G. A. (2006). Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5569–5577. <https://doi.org/10.1128/AEM.00122-06>
- Esmailnejad, B., Tavassoli, M., Asri-Rezaei, S., Dalir-Naghadeh, B., Mardani, K., Jalilzadeh-Amin, G., Golabi, M., & Arjmand, J. (2014). PCR-Based Detection of *Babesia ovis* in *Rhipicephalus bursa* and Small Ruminants. *Journal of parasitology research*, 2014, 294704. <https://doi.org/10.1155/2014/294704>
- Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: Taxonomy, biology and ecology. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 34(1), 53–65. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2345>
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J., & Walker, A. (2004). *Tick of domestic animals in Mediterranean region. A guide to identification of species*. University of Zaragoza.
- Estrada-Peña, A., Jameson, L., Medlock, J., Vatansever, Z., Tishkova, F., (2012). Unraveling the ecological complexities of tick-associated Crimean-Congo hemorrhagic fever virus transmission: A gap analysis for the Western Palearctic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 743- 752.
- EVOA | Companhia das Lezírias. (2021). O EVOA. EVOA- espaço de visitação e observa o de aves. Disponível em: <https://evoa.pt/quem-somos/o-evoa>. Acesso em: 3 Agosto 2021
- Dantas-Torres F., & D. Ortranto. (2017). *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille, 1806). Em A. Estrada-Peña, A. Daniel Mihalca, & T. N. Petney (Eds.), *Ticks of Europe and North Africa A Guide to Species Identification* (1.^a ed.). Springer.
- Ferrolho, J., Antunes, S., Santos, A. S., Velez, R., Padre, L., Cabezas-Cruz, A., Santos-Silva, M. M., & Domingos, A. (2016). Detection and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. And *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus bursa* in Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(3), 443–448. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.004>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Fournier, P.-E., Dumler, J. S., Greub, G., Zhang, J., Wu, Y., & Raoult, D. (2003). Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. Nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5456–5465. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5456-5465.2003>
- Fuxelius, H. H., Darby, A., Min, C. K., Cho, N. H., & Andersson, S. G. E. (2007). The genomic and metabolic diversity of *Rickettsia*. *Research in Microbiology*, 158(10), 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.008>
- Gillespie, J. J., Beier, M. S., Rahman, M. S., Ammerman, N. C., Shallom, J. M., Purkayastha, A., Sobral, B. S., & Azad, A. F. (2007). Plasmids and *Rickettsial* Evolution: Insight from *Rickettsia felis*. *PLoS ONE*, 2(3), e266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000266>
- GIMENEZ D. F. (1964). STAINING RICKETTSIAE IN YOLK-SAC CULTURES. *Stain technology*, 39, 135–140. <https://doi.org/10.3109/10520296409061219>

- González, J., González, M. G., Valcárcel, F., Sánchez, M., Martín-Hernández, R., Tercero, J. M., & Olmeda, A. S. (2020). Transstadial Transmission from Nymph to Adult of *Coxiella burnetii* by Naturally Infected *Hyalomma lusitanicum*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(11), E884. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110884>
- González-Acuña, D., & Guglielmone, A. A. (2005). Ticks (Acari: Ixodoidea: Argasidae, Ixodidae) of Chile. *Experimental & Applied Acarology*, 35(1–2), 147–163. <https://doi.org/10.1007/s10493-004-1988-2>
- Gracia, M. J., Marcén, J. M., Pinal, R., Calvete, C., & Rodes, D. (2015). Prevalence of *Rickettsia* and *Bartonella* species in Spanish cats and their fleas. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 233–239. <https://doi.org/10.1111/jvec.12159>
- Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., & Lindgren, E. (2009). Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 593232. <https://doi.org/10.1155/2009/593232>
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K.-P., & Weiss, L. (2010). Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.11.003>
- Hafner, M. S., Sudman, P. D., Villablanca, F. X., Spradling, T. A., Demastes, J. W., & Nadler, S. A. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5175), 1087–1090. <https://doi.org/10.1126/science.8066445>
- Harrus, S., Lior, Y., Ephros, M., Grisaru-Soen, G., Keysary, A., Strenger, C., Jongejan, F., Waner, T., & Baneth, G. (2007). *Rickettsia conorii* in humans and dogs: a seroepidemiologic survey of two rural villages in Israel. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(1), 133–135.
- Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J., & Fèvre, E. M. (2017). Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife-Livestock-Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>
- Hildebrandt, A., Gray, J. S., & Hunfeld, K.-P. (2013). Human Babesiosis in Europe: What clinicians need to know. *Infection*, 41(6), 1057–1072. <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0526-8>
- Hornok, S. (2017). *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794). Em A. Estrada-Peña, A. Daniel Mihalca, & T. N. Petney (Eds.), *Ticks of Europe and North Africa A Guide to Species Identification* (1.^a ed.). Springer.
- Hornok, S., de la Fuente, J., Biró, N., Fernández de Mera, I. G., Meli, M. L., Elek, V., Gönczi, E., Meili, T., Tánczos, B., Farkas, R., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2011). First molecular evidence of *Anaplasma ovis* and *Rickettsia* spp. in keds (Diptera: Hippoboscidae) of sheep and wild ruminants. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(10), 1319–1321. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0649>
- Horta, M. C., Labruna, M. B., Durigon, E. L., & Schumaker, T. T. S. (2006). Isolation of *Rickettsia felis* in the mosquito cell line C6/36. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1705–1707. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1705-1707.2006>
- Hubálek, Z., & Rudolf, I. (2012). Tick-borne viruses in Europe. *Parasitology Research*, 111(1), 9–36. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2910-1>

- Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., & Onishi, T. (2002). Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Veterinary parasitology*, 106(3), 265–271. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00065-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00065-1)
- IUCN. (2015). *Lynx pardinus*: Rodríguez, A. & Calzada, J.: *The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T12520A50655794* [Data set]. International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T12520A50655794.en>
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends in Parasitology*, 35(5), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>
- Johnson, E. M., Panciera, R. J., Allen, K. E., Sheets, M. E., Beal, J. D., Ewing, S. A., & Little, S. E. (2009). Alternate pathway of infection with Hepatozoon americanum and the epidemiologic importance of predation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1315–1318. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0375.x>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Klompen, H. (2005). Ticks, the Ixodida. Em W. C. Marquardt & B. C. Kondratieff (Eds.), *Biology of disease vectors* (2nd ed). Elsevier Academic Press.
- Kosoy, M., & Goodrich, I. (2018). Comparative Ecology of Bartonella and Brucella Infections in Wild Carnivores. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 322. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00322>
- Kubo, M., Miyoshi, N., & Yasuda, N. (2006). Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cat. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 68(8), 833–837. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.833>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Labruna, M. B., Pacheco, R. C., Nava, S., Brandão, P. E., Richtzenhain, L. J., & Guglielmone, A. A. (2007). Infection by Rickettsia bellii and Candidatus «Rickettsia amblyommii» in Amblyomma neumanni ticks from Argentina. *Microbial Ecology*, 54(1), 126–133. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9180-3>
- Lawrence, A. L., Brown, G. K., Peters, B., Spielman, D. S., Morin-Adeline, V., & Šlapeta, J. (2014). High phylogenetic diversity of the cat flea (Ctenocephalides felis) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and veterinary entomology*, 28(3), 330–336. <https://doi.org/10.1111/mve.12051>
- Leiby, D. A. (2011). Transfusion-Transmitted Babesia spp.: Bull's-Eye on Babesia microti. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 14–28. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-10>
- Leite, J. (2012). A Raça Equina Garrana. In N. Brito & J. Alves (coord). I Congresso Internacional do Garrano. Candidatura a Património Nacional, Livro de Atas. Arcos de Valdevez: ATAHCA – Associação de Desenvolvimento das Terras Altas do Homem, Cávado e Ave. (pp. 30-49).
- Levin, M. L., Killmaster, L., Eremeeva, M. E., & Dasch, G. A. (2009). Effects of Rickettsia conorii infection on the survival of Rhipicephalus sanguineus ticks. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 277–278. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02234.x>
- Levin, M. L., Killmaster, L. F., & Zemtsova, G. E. (2012). Domestic Dogs (Canis familiaris) as Reservoir Hosts for Rickettsia conorii. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 28–33. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0684>

- Liu, D., Wang, Y. Z., Zhang, H., Liu, Z. Q., Wureli, H. Z., Wang, S. W., Tu, C. C., & Chen, C. F. (2016). First report of *Rickettsia raoultii* and *R. slovaca* in *Melophagus ovinus*, the sheep ked. *Parasites & vectors*, 9(1), 600. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1885-7>
- Maia, C., Ferreira, A., Nunes, M., Vieira, M. L., Campino, L., & Cardoso, L. (2014). Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4), 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.01.009>
- Maina, A. N., Jiang, J., Luce-Fedrow, A., St. John, H. K., Farris, C. M., & Richards, A. L. (2019). Worldwide Presence and Features of Flea-Borne *Rickettsia asembonensis*. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 334. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00334>
- Mangold, A. J., Bargues, M. D., & Mas-Coma, S. (1998). Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of Rhipicephalus and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology research*, 84(6), 478–484. <https://doi.org/10.1007/s004360050433>
- Marquardt, W. C., & Kondratieff, B. C. (Eds.). (2005). *Biology of disease vectors* (2nd ed). Elsevier Academic Press.
- Márquez, F. J., & Millán, J. (2009). Rickettsiae in ticks from wild and domestic carnivores of Doñana National Park (Spain) and surrounding area. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 Suppl 2, 224–226. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02147.x>
- Marrero, M., & Raoult, D. (1989). Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(2), 197–199. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.197>
- Martello, E., Selmi, M., Ragagli, C., Ambrogi, C., Stella, M. C., Mannelli, A., & Tomassone, L. (2013). *Rickettsia slovaca* in immature *Dermacentor marginatus* and tissues from *Apodemus* spp. In the northern Apennines, Italy. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(6), 518–521. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.002>
- Meli, M. L., Cattori, V., Martínez, F., López, G., Vargas, A., Simón, M. A., Zorrilla, I., Muñoz, A., Palomares, F., López-Bao, J. V., Pastor, J., Tandon, R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., & Lutz, H. (2009). Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *PloS One*, 4(3), e4744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004744>
- Merhej, V., Angelakis, E., Socolovschi, C., & Raoult, D. (2014). Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.014>
- Milhano, N., Carvalho, I. L. de, Alves, A. S., Arroubé, S., Soares, J., Rodriguez, P., Carolino, M., Nuncio, M. S., Piesman, J., & de Sousa, R. (2010). Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1(4), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.09.003>
- Millán, J., Naranjo, V., Rodríguez, A., de la Lastra, J. M. P., Mangold, A. J., & de la Fuente, J. (2007a). Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitology*, 134(Pt 7), 995–1001. <https://doi.org/10.1017/S003118200700248X>
- Millán, J., Ruiz-Fons, F., Márquez, F. J., Viota, M., López-Bao, J. V., & Paz Martín-Mateo, M. (2007b). Ectoparasites of the endangered Iberian lynx *Lynx pardinus* and sympatric wild and domestic carnivores

in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 21(3), 248–254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2007.00696.x>

Mosbacher, M. E., Klotz, S., Klotz, J., & Pinna, J. L. (2011). Bartonella henselae and the Potential for Arthropod Vector-Borne Transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(5), 471–477. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0106>

Mura, A., Masala, G., Tola, S., Satta, G., Fois, F., Piras, P., Rolain, J.-M., Raoult, D., & Parola, P. (2008). First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, «Candidatus Rickettsia barbariae», in ticks from Sardinia, Italy. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(11), 1028–1033. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02082.x>

Natural.pt. Parque Natural do Vale do Guadiana. 2021. Disponível em: <https://natural.pt/protected-areas/parque-natural-vale-guadiana?locale=pt>. Acesso em: 26 Agosto 2021

Nava, S. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience, Volume*(14), 2857. <https://doi.org/10.2741/3418>

Nentwig, A., Meli, M. L., Schrack, J., Reichler, I. M., Riond, B., Gloor, C., Howard, J., Hofmann-Lehmann, R., & Willi, B. (2018). First report of Cytauxzoon sp. infection in domestic cats in Switzerland: natural and transfusion-transmitted infections. *Parasites & vectors*, 11(1), 292. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2728-5>

Ng-Nguyen, D., Hii, S.-F., Hoang, M.-T. T., Nguyen, V.-A. T., Rees, R., Stenos, J., & Traub, R. J. (2020). Domestic dogs are mammalian reservoirs for the emerging zoonosis flea-borne spotted fever, caused by Rickettsia felis. *Scientific Reports*, 10, 4151. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61122-y>

Nicholson, W. L., Sonenshine, D. E., Noden, B. H., & Brown, R. N. (2019). Ticks (Ixodida). *Medical and Veterinary Entomology*, 603–672. doi:10.1016/b978-0-12-814043-7.00027-3

Nunes, M., Parreira, R., Lopes, N., Maia, C., Carreira, T., Sousa, C., Faria, S., Campino, L., & Vieira, M. L. (2015). Molecular Identification of Borrelia miyamotoi in Ixodes ricinus from Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(8), 515–517. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1765>

Oboňa, J., Greš, S., Krišovský, P., & Hromada, M. (2021). *Faunistic records and new parasite-host associations of Louse flies (Diptera: Hippoboscidae) from Sabinov, Slovakia*. 13.

Oboňa, J., Sychra, O., Greš, S., Heřman, P., Manko, P., Roháček, J., Šestáková, A., Šlapák, J., & Hromada, M. (2019). A revised annotated checklist of louse flies (Diptera, Hippoboscidae) from Slovakia. *ZooKeys*, 862, 129–152. <https://doi.org/10.3897/zookeys.862.25992>

Ogden, N. H., & Lindsay, L. R. (2016). Effects of Climate and Climate Change on Vectors and Vector-Borne Diseases: Ticks Are Different. *Trends in Parasitology*, 32(8), 646–656. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.015>

Oteo, J. A., Maggi, R., Portillo, A., Bradley, J., García-Álvarez, L., San-Martín, M., Roura, X., & Breitschwerdt, E. (2017). Prevalence of Bartonella spp. by culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. *Parasites & vectors*, 10(1), 553. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2483-z>

Oteo, J. A., Nava, S., Sousa, R. de, Mattar, S., Venzal, J. M., Abarca, K., Labruna, M. B., & Zavala-Castro, J. (2014). Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 54–65. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100009>

- Onyiche, T. E., Suganuma, K., Igarashi, I., Yokoyama, N., Xuan, X., & Thekisoe, O. (2019). A Review on Equine Piroplasmiasis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(10), E1736. <https://doi.org/10.3390/ijerph16101736>
- Olmeda, A. S., Armstrong, P. M., Rosenthal, B. M., Valladares, B., del Castillo, A., de Armas, F., Miguelez, M., González, A., Rodríguez Rodríguez, J. A., Spielman, A., & Telford, S. R., 3rd (1997). A subtropical case of human babesiosis. *Acta tropica*, 67(3), 229–234. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(97)00045-4)
- Ortuño, A., Pons, I., Nogueras, M. M., Castellà, J., & Segura, F. (2009). The dog as an epidemiological marker of *Rickettsia conorii* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 241–242. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02158.x>
- Otranto, D., Cantacessi, C., Pfeiffer, M., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Deplazes, P., Genchi, C., Guberti, V., & Capelli, G. (2015). The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe: Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Veterinary Parasitology*, 213(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.022>
- Panait, L. C., Mihalca, A. D., Modrý, D., Juránková, J., Ionică, A. M., Deak, G., Gherman, C. M., Heddergott, M., Hodžić, A., Veronesi, F., Reichard, M., Ziemann, E. A., Nielsen, C. K., Jiménez-Ruiz, F. A., & Hrazdilová, K. (2021). Three new species of Cytauxzoon in European wild felids. *Veterinary parasitology*, 290, 109344. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109344>
- Papa, A., Xanthopoulou, K., Kotriotsiou, T., Papaioakim, M., Sotiraki, S., Chaligiannis, I., & Maltezos, E. (2016). *Rickettsia* species in human-parasitizing ticks in Greece. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(5), 299–304. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw022>
- Parola, P., Paddock, C. D., & Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719–756. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005>
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.-E., & Raoult, D. (2013). Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: A Geographic Approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 897–928. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Pennisi, M.-G., Persichetti, M.-F., Serrano, L., Altet, L., Reale, S., Gulotta, L., & Solano-Gallego, L. (2015). Ticks and associated pathogens collected from cats in Sicily and Calabria (Italy). *Parasites & Vectors*, 8, 512. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1128-3>
- Pereira, A., Parreira, R., Cotão, A. J., Nunes, M., Vieira, M. L., Azevedo, F., Campino, L., & Maia, C. (2018). Tick-borne bacteria and protozoa detected in ticks collected from domestic animals and wildlife in central and southern Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(2), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.008>
- Pérez-Osorio, C. E., Zavala-Velázquez, J. E., León, J. J. A., & Zavala-Castro, J. E. (2008). *Rickettsia felis* as Emergent Global Threat for Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), 1019–1023. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071656>
- Perlman, S. J., Hunter, M. S., & Zchori-Fein, E. (2006). The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings. Biological Sciences*, 273(1598), 2097–2106. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3541>

- Persichetti, M. F., Pennisi, M. G., Vullo, A., Masucci, M., Migliazzo, A., & Solano-Gallego, L. (2018). Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy. *Parasites & Vectors*, *11*, 136. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2725-8>
- Piotrowski, M., & Rymaszewska, A. (2020). Expansion of Tick-Borne Rickettsioses in the World. *Microorganisms*, *8*(12), 1906. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121906>
- Portillo, A., de Sousa, R., Santibáñez, S., Duarte, A., Edouard, S., Fonseca, I. P., Marques, C., Novakova, M., Palomar, A. M., Santos, M., Silaghi, C., Tomassone, L., Zúquete, S., & Oteo, J. A. (2017). Guidelines for the Detection of Rickettsia spp. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, *17*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1966>
- Rakotonanahary, R.J.L., Harrison, A., Maina, A.N. et al. Molecular and serological evidence of flea-associated typhus group and spotted fever group rickettsial infections in Madagascar. *Parasites Vectors* *10*, 125 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2061-4>
- Rani, P. A. M. A., Coleman, G. T., Irwin, P. J., & Traub, R. J. (2011). Hippobosca longipennis—A potential intermediate host of a species of Acanthocheilonema in dogs in northern India. *Parasites & Vectors*, *4*(1), 143. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-143>
- Raoult, D., Fournier, P. E., Abboud, P., & Caron, F. (2002). First documented human Rickettsia aeschlimannii infection. *Emerging infectious diseases*, *8*(7), 748–749. <https://doi.org/10.3201/eid0807.010480>
- Rasmussen, E. (2020). Drones against vector-borne diseases. *Science Robotics*, *5*(43). <https://doi.org/10.1126/scirobotics.abc7642>
- Reeves, W. K., & Lloyd, J. E. (2019). Chapter 20—Louse Flies, Keds, and Bat Flies (Hippoboscoidea). Em G. R. Mullen & L. A. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* (pp. 421–438). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00020-0>
- Regier, Y., O'Rourke, F., & Kempf, V. A. J. (2016). Bartonella spp. - A chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasites & Vectors*, *9*, 261. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1546-x>
- Regnery, R. L., Spruill, C. L., & Plikaytis, B. D. (1991). Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of bacteriology*, *173*(5), 1576–1589. <https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1576-1589.1991>
- Reif, K. E., & Macaluso, K. R. (2009). Ecology of Rickettsia felis: A Review. *Journal of Medical Entomology*, *46*(4), 723–736. <https://doi.org/10.1603/033.046.0402>
- Remesar, S., Castro-Scholten, S., Cano-Terriza, D., Díaz, P., Morrondo, P., Jiménez-Martín, D., Rouco, C., & García-Bocanegra, I. (2021). Molecular identification of zoonotic Rickettsia species in Ixodidae parasitizing wild lagomorphs from Mediterranean ecosystems. *Transboundary and Emerging Diseases*, *n/a*(n/a). <https://doi.org/10.1111/tbed.14379>
- Ribeiro, A. J., Cardoso, L., Maia, J. M., Coutinho, T., & Cotovio, M. (2013). Prevalence of Theileria equi, Babesia caballi, and Anaplasma phagocytophilum in horses from the north of Portugal. *Parasitology Research*, *112*(7), 2611–2617. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3429-9>
- Ricketts, H. T. (1909). A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever a preliminary report. *Journal of the American Medical Association*, *LII*(5), 379–380. <https://doi.org/10.1001/jama.1909.25420310039002>

- Romiti, F., Magliano, A., Antognetti, V., Manna, G., Cersini, A., Scicluna, M. T., & De Liberato, C. (2020). Investigation of Ixodid ticks as vectors of *Babesia caballi* and *Theileria equi* (Protozoa: Apicomplexa) in central Italy. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, 45(1), 25–31. <https://doi.org/10.1111/jvec.12370>
- S. Hornok. (2017). *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776). Em A. Estrada-Peña, A. Daniel Mihalca, & T. N. Petney (Eds.), *Ticks of Europe and North Africa A Guide to Species Identification* (1.^a ed.). Springer.
- Sachman-Ruiz, B., & Quiroz-Castañeda, R. E. (2018). Genomics of Rickettsiaceae: An Update. Em *Farm Animals Diseases, Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74563>
- Santos, A. S., Bacellar, F., Santos-Silva, M., Formosinho, P., Grácio, A. J., & Franca, S. (2002). Ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 2(3), 165–177. <https://doi.org/10.1089/15303660260613738>
- Santos, A. S., Santos-Silva, M. M., Almeida, V. C., Bacellar, F., & Dumler, J. S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 10(9), 1643–1648. <https://doi.org/10.3201/eid1009.040276>
- Santos Silva M, M., De Sousa, R., de Carvalho, I. L., Santos, A. S., Osório, H., & Nuncio, M. S. (2016). REVIVE 2011-2015 Ixodídeos. Em Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac, *REVIVE 2011-2015- Culicídeos e Ixodídeos Rede de Vigilância de Vetores*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP).
- Santos-Silva, M. M. (2017a). *Hyalomma lusitanicum* Koch, 1844. Em Estrada-Peña A., Daniel Mihalca A., & T. N. Petney (Eds.), *Ticks of Europe and North Africa A Guide to Species Identification* (1.^a ed.). Springer.
- Santos-Silva, M. M. (2017b). *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1936. Em Estrada-Peña A., Daniel Mihalca A., & T. N. Petney (Eds.), *Ticks of Europe and North Africa A Guide to Species Identification* (1.^a ed.). Springer.
- Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., & Bacellar, F. (2011). The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1), 85–121. <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9440-x>
- Santos-Silva, M. M., Melo, P., Santos, N., Antunes, S., Duarte, L. R., Ferrolho, J., Milhano, N., Santos, P. T., Domingos, A., & Santos, A. S. (2017). PCR screening of tick-borne agents in sensitive conservation areas, Southeast Portugal. *Molecular and Cellular Probes*, 31, 42–45. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.11.005>
- Santos-Silva, M. M., Sousa, R., Santos, A. S., Melo, P., Encarnação, V., & Bacellar, F. (2006). Ticks parasitizing wild birds in Portugal: Detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Experimental & Applied Acarology*, 39(3–4), 331–338. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9008-3>
- Schex, S., Dobler, G., Riehm, J., Müller, J., & Essbauer, S. (2011). *Rickettsia* spp. In wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(5), 493–502. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0060>

- Schouls, L. M., Van De Pol, I., Rijpkema, S. G., & Schot, C. S. (1999). Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks. *Journal of clinical microbiology*, 37(7), 2215–2222. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.7.2215-2222.1999>
- Scoles, G. A., & Ueti, M. W. (2015). Vector ecology of equine piroplasmiasis. *Annual Review of Entomology*, 60, 561–580. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>
- Segura, F., Pons, I., Miret, J., Pla, J., Ortuño, A., & Noguera, M. M. (2014). The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasites & vectors*, 7, 353. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-353>
- Sekeyová, Z., Danchenko, M., Filipčík, P., & Fournier, P. E. (2019). Rickettsial infections of the central nervous system. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(8), e0007469. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007469>
- Service, M. W. (2012). *Medical entomology for students* (5th ed). Cambridge University Press.
- Shpynov, S. N., Fournier, P.-E., Pozdnichenko, N. N., Gumenuk, A. S., & Skiba, A. A. (2018). New approaches in the systematics of rickettsiae. *New Microbes and New Infections*, 23, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.02.012>
- Silva, M. M., Santos, A. S., Formosinho, P., & Bacellar, F. (2006). Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Med Port*, 19, 39–48.
- Silva, M. M., Formosinho, P., Melo, P., Santos, A., & Filipe, A. R. (2001). Ixodídeos (Acari: Ixodidae) parasitas de aves silváticas em Portugal * Ticks (Acari: Ixodidae) ectoparasites from wild birds in Portugal. 3.
- Sinclair J. R. (2019). Importance of a One Health approach in advancing global health security and the Sustainable Development Goals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38(1), 145–154. <https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2949>
- Socolovschi, C., Gaudart, J., Bitam, I., Huynh, T. P., Raoult, D., & Parola, P. (2012). Why Are There So Few Rickettsia conorii conorii-Infected Rhipicephalus sanguineus Ticks in the Wild? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1697. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001697>
- Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., & Parola, P. (2009a). The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks. *Veterinary Research*, 40(2), 34. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009017>
- Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., & Parola, P. (2009b). Update on tick-borne bacterial diseases in Europe. *Parasite (Paris, France)*, 16(4), 259–273. <https://doi.org/10.1051/parasite/2009164259>
- Sofia Santos, A., & Margarida Santos-Silva, M. (2019). Ixodes ventalloi Gil Collado, 1936: A Vector Role to be Explored. Em S. Savić (Ed.), *Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81615>
- Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>
- Solano-Gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Di Marco, M., Caldin, M., Furlanello, T., & Breitschwerdt, E. (2006). Febrile Illness Associated with Rickettsia conorii Infection in Dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1985–1988. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060326>
- Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (Eds.). (2014). *Biology of ticks* (2nd ed). Oxford University Press.

- Sparagano, O., George, D., Giangaspero, A., & Špitalská, E. (2015). Arthropods and associated arthropod-borne diseases transmitted by migrating birds. The case of ticks and tick-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*, 213(1), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.028>
- Stafford III, K. C. (2007). Tick Management Handbook. The Connecticut Agricultural Experiment Station.
- Swei, A., Couper, L. I., Coffey, L. L., Kapan, D., & Bennett, S. (2020). Patterns, Drivers, and Challenges of Vector-Borne Disease Emergence. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 20(3), 159–170. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2432>
- Szekeres, S., Docters van Leeuwen, A., Tóth, E., Majoros, G., Sprong, H., & Földvári, G. (2019). Road-killed mammals provide insight into tick-borne bacterial pathogen communities within urban habitats. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 277–286. <https://doi.org/10.1111/tbed.13019>
- Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., & Miyamura, S. (1995). Classification of Rickettsia tsutsugamushi in a new genus, Orientia gen. Nov., as Orientia tsutsugamushi comb. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 589–591. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-589>
- Tomás, A., Palma, R. L., Rebelo, M. T., & da Fonseca, I. P. (2016). Chewing lice (Phthiraptera) from wild birds in southern Portugal. *Parasitology International*, 65(3), 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.02.007>
- Tsai, Y.-L., Chang, C.-C., Chuang, S.-T., & Chomel, B. B. (2011). Bartonella species and their ectoparasites: Selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(4), 299–314. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.04.005>
- Valcárcel, F., González, J., González, M. G., Sánchez, M., Tercero, J. M., Elhachimi, L., Carbonell, J. D., & Olmeda, A. S. (2020). Comparative Ecology of Hyalomma lusitanicum and Hyalomma marginatum Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae). *Insects*, 11(5), 303. <https://doi.org/10.3390/insects11050303>
- Vatanséver, Z. (2017). Rhipicephalus bursa Canestrini and Fanzago, 1878. Em A. Estrada-Peña, A. Daniel Mihalca, & T. N. Petney (Eds.), *Ticks of Europe and North Africa A Guide to Species Identification* (1.^a ed.). Springer.
- Vilhena, H., Martínez-Díaz, V. L., Cardoso, L., Vieira, L., Altet, L., Francino, O., Pastor, J., & Silvestre-Ferreira, A. C. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*, 6(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-99>
- Viseras, J., Hueli, L. E., Adroher, F. J., & García-Fernández, P. (1999). Studies on the transmission of Theileria annulata to cattle by the tick Hyalomma lusitanicum. Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B, 46(8), 505–509. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1999.tb01242.x>
- Vitale, G., Mansuelo, S., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2006). Rickettsia massiliae human isolation. *Emerging infectious diseases*, 12(1), 174–175. <https://doi.org/10.3201/eid1201.050850>
- Walker, A. R. & International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases. (2003). *Ticks of domestic animals in Africa: A guide to identification of species*. Bioscience Reports.
- Walker, D. H., & Ismail, N. (2008). Emerging and re-emerging rickettsioses: Endothelial cell infection and early disease events. *Nature Reviews Microbiology*, 6(5), 375–386. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1866>

- Waner, T., Keysary, A., Eremeeva, M. E., Din, A. B., Mumcuoglu, K. Y., King, R., & Atiya-Nasagi, Y. (2014). *Rickettsia africae* and *Candidatus Rickettsia barbariae* in ticks in Israel. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(5), 920–922. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0697>
- Wang, J.-L., Li, T.-T., Liu, G.-H., Zhu, X.-Q., & Yao, C. (2017). Two Tales of *Cytauxzoon felis* Infections in Domestic Cats. *Clinical Microbiology Reviews*, *30*(4), 861–885. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-17>
- Wilson, A. J., Morgan, E. R., Booth, M., Norman, R., Perkins, S. E., Hauffe, H. C., Mideo, N., Antonovics, J., McCallum, H., & Fenton, A. (2017). What is a vector? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1719), 20160085. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0085>
- World Health Organization (WHO). (2021). Malaria. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Acesso em: 8 September 2021
- Yu, X.-J., & Walker, D. H. (2005). *Rickettsia da Rocha-Lima* 1916, 567AL. Em D. J. Brenner, N. R. Krieg, G. M. Garrity, J. T. Staley, D. R. Boone, P. Vos, M. Goodfellow, F. A. Rainey, & K.-H. Schleifer (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 96–114). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5_28
- Zaharia, M., Popescu, C. P., Florescu, S. A., Ceausu, E., Raoult, D., Parola, P., & Socolovschi, C. (2016). *Rickettsia massiliae* infection and SENLAT syndrome in Romania. *Ticks and tick-borne diseases*, *7*(5), 759–762. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.008>

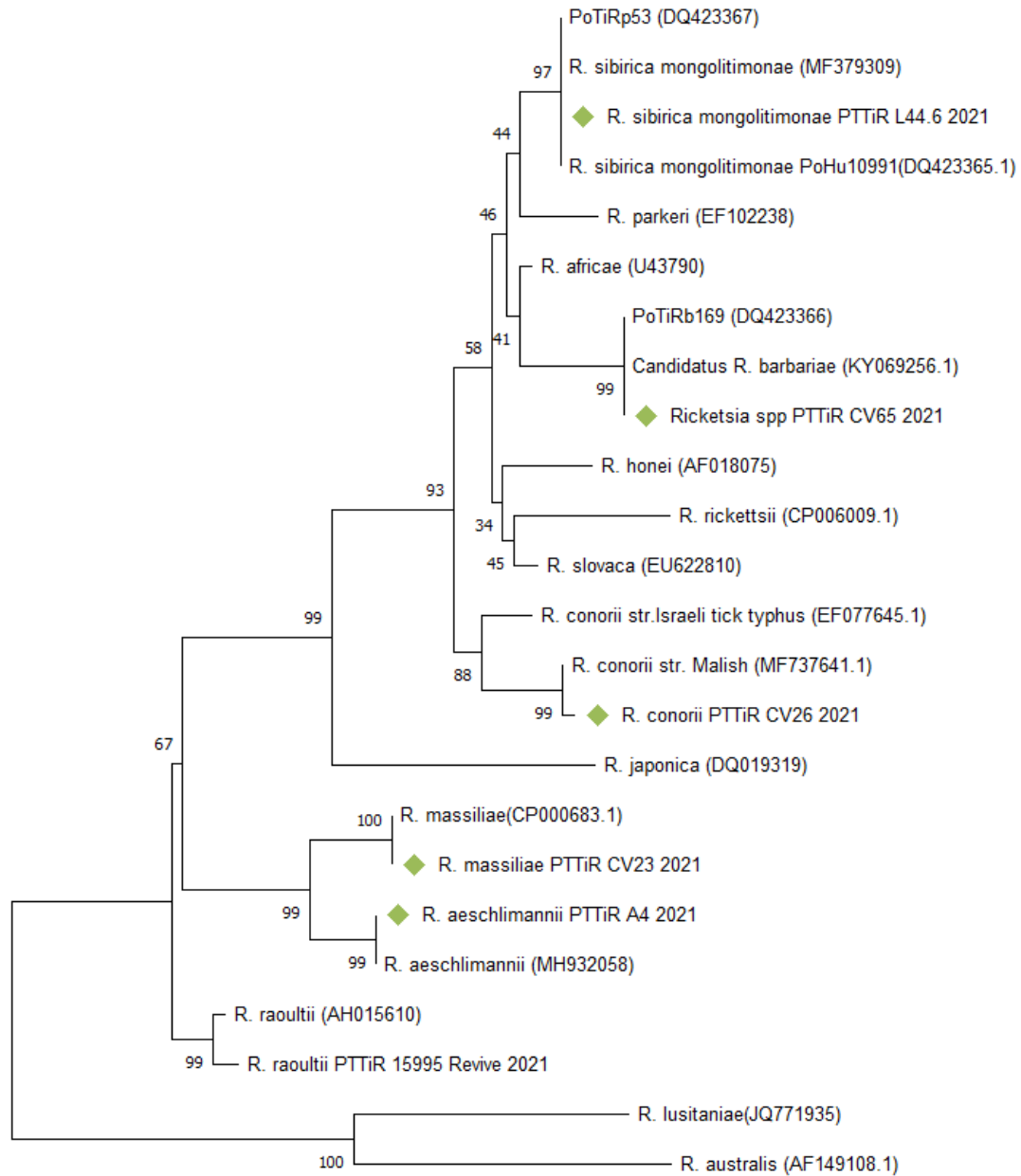
Anexos

Anexo 1: Polimorfismos encontrados nas espécies de ectoparasitas, a sua percentagem de identidade e o respetivo número de acesso da sequência com maior identidade no BLAST, assim como os números de acesso do GenBank das sequências obtidas neste estudo.

| | Polimorfismos (n/testados) | Identidade do Blast (bp/%) | Número de acesso <i>GenBank</i> | Número de acesso <i>GenBank</i> nosso estudo |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Ixodídeos | | | | |
| 16S RNA | | | | |
| <i>R. sanguineus</i> | 3/5 | | | |
| PTTickRs Cat Montevil 2021 | | 400/403(99.26%) | KT382469 | OL454844 |
| PTTickRs CV21 2021 | | 403/403(100%) | KT382469 | OL454845 |
| PTTickRs Q9 2021 | | 403/403(100%) | JX997393 | OL454846 |
| <i>R. pusillus</i> | 8/17 | | | |
| PTTickRp L13 2021 | | 401/405(99.01%) | MW172218 | OL454848 |
| PTTickRp L67 2021 | | 402/405(99.26%) | MW172218 | OL454849 |
| PTTickRp L42 2021 | | 401/405(99.01%) | MW172218 | OL454850 |
| PTTickRp L59 2021 | | 399/405(98.52%) | MW172218 | OL454851 |
| PTTickRp L40 2021 | | 403/405(99.51%) | MW172218 | OL454852 |
| PTTickRp L43 2021 | | 401/405(99.01%) | MW172218 | OL454853 |
| PTTickRp Q7 2021 | | 399/405(98.52%) | MW172218 | OL454854 |
| PTTickRp L49 2021 | | 402/409(98.29%) | AJ002957 | OL454855 |
| <i>R. bursa</i> | 1/9 | | | |
| PTTickRb CV5 2021 | | 401/401(100%) | MT302761 | OL454856 |
| <i>H. marginatum</i> | 3/10 | | | |
| PTTickHm_A1_2021 | | 403/403(100%) | MT229186 | OL454857 |
| PTTickHm_A10_2021 | | 402/403(99,76%) | MT229186 | OL454858 |
| PTTickHm_A14_2021 | | 403/403(100%) | MK058363 | OL454859 |
| PTTickHm_A8_2021 | | 403/405(99,51%) | MG418664 | OL454860 |
| <i>I. ventraloi</i> | 16/44 | | | |
| PTTicklv_L49_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454861 |
| PTTicklv_L53_2021 | | 412/412(100%) | MF621233 | OL454862 |
| PTTicklv_L43_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454863 |
| PTTicklv_L44_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454864 |
| PTTicklv_L67_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454865 |
| PTTicklv_L62_2021 | | 409/413(99,03%) | MF621233 | OL454866 |
| PTTicklv_L63_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454867 |
| PTTicklv_L67.7_2021 | | 412/413(99,76%) | MF621233 | OL454868 |
| PTTicklv_L54_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454869 |
| PTTicklv_L58_2021 | | 412/412(100%) | MW172218 | OL454870 |
| PTTicklv_L40_2021 | | 410/412(99,51%) | MW173479 | OL454871 |
| PTTicklv_L40.2_2021 | | 410/412(99,51%) | MF621233 | OL454872 |
| PTTicklv_L50_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454873 |
| PTTicklv_L50.1_2021 | | 410/412(99,51%) | MF621233 | OL454874 |
| PTTicklv_L60_2021 | | 411/413(99,51%) | MF621233 | OL454875 |
| PTTicklv_L69_2021 | | 411/412(99,76%) | MF621233 | OL454876 |
| COI | | | | |
| <i>H. lusitanicum</i> | 3/3 | | | |
| PTTickHI L20_2021 | | 658/658(100%) | EU827701 | OL454880 |
| PTTickHI Q4_2021 | | 658/658(100%) | EU827743 | OL454881 |

| | | | | |
|-------------------------------|-----|------------------|----------|----------|
| PTTickHI Q5_2021 | | 658/658(100%) | EU827700 | OL454882 |
| Pulga | | | | |
| <i>Ctenocephalides felis</i> | 2/7 | | | |
| PTFlea_Nairobi_2021 | | 513/513(100%) | MG586657 | OL507710 |
| PTFlea_Cat3_202 | | 491/491(100%) | MN268683 | OL507711 |
| Piolho | | | | |
| <i>Trinoton querquedulae</i> | 2/7 | | | |
| PTLiceP1A_2021 | | 377/382(98.69%) | AF385015 | OL602112 |
| PTLiceP2A_2021 | | 380/382 (99.48%) | AF385015 | OL602113 |
| Moscas | | | | |
| <i>Hippobosca longipennis</i> | 1/2 | | | |
| PTFliesQ1_2021 | | 658/658(100%) | MK405667 | OL505727 |
| <i>Ornithomya biloba</i> | 1/1 | | | |
| PTFliesA1_2021 | | 658/658(100%) | MF496010 | OL505728 |

Anexo 2: Filogenia dos membros do género *Rickettsia* baseada na análise de 532 bp do gene *OmpA*. Árvore filogenética inferida pelo método Maximum Likelihood baseado no modelo Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993). Os números representam a percentagem de árvores em que os taxa associados ficaram juntos depois de 1000 simulações. As sequências assinaladas a verde representam as sequências obtidas neste estudo.



0,02



