



Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

***EHRlichia canis, Rickettsia conorii e ANAPlasma
PHAGOCYTOPHILUM***

**Estudo da prevalência, por IFI e PCR, em população canina da área
metropolitana do Porto**

Eva Elisabete Correia Marques da Silva

Orientador

Professor Dr. Armando José da Silva Lemos

Co-Orientador(es)

Professora Doutora Maria Berta de Jesus Duarte da Silva

Doutora Ana Sofia Pereira dos Santos

Porto 2010

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

***EHRlichia canis, Rickettsia conorii e ANAPlasma
PHAGOCYTOPHILUM***

**Estudo da prevalência, por IFI e PCR, em população canina da área
metropolitana do Porto**

Eva Elisabete Correia Marques da Silva

Orientador

Professor Dr. Armando José da Silva Lemos

Co-Orientador(es)

Professora Doutora Maria Berta de Jesus Duarte da Silva

Doutora Ana Sofia Pereira dos Santos

Porto 2010

DEDICATÓRIA

O caminho mais curto entre dois pontos é uma recta, mas por vezes é necessário coragem e persistência para fazer uma longa curva sinuosa, com a fé que se atingirá o ponto que tanto se almeja...

A todos que por vezes pensam se vale a pena perseguirem um sonho, aqui deixo o meu testemunho: não há nada que não se consiga, desde que se esteja disposto a fazer o esforço necessário. Dezoito anos e vários cursos após o meu 1º ano de caloiira, com o apoio constante do meu marido, aqui alcanço mais um sonho (talvez o mais antigo): o de ser veterinária!

Se cada dia cai

*Se cada dia cai,
dentro de cada noite,
há um poço
onde a claridade está presa.*

*Há que sentar-se na beira
do poço da sombra
e pescar luz caída
com paciência.*

Pablo Neruda (1904-1973)

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo imprescindível apoio para a realização não só do estágio e da tese como de todo o curso;

Ao Professor Armando, meu orientador de estágio, pela paciência e empenho ímpares, assim como a ajuda dispensada em todas as etapas do trabalho, desde a fase de projecto, passando pela execução, até à correção do relatório;

À Doutora Ana e à Doutora Rita, do CEVDI, pela simpatia e disponibilidade, assim como pela ajuda inestimável na execução e correção de todo o trabalho;

À Professora Doutora Berta, por disponibilizar as instalações e materiais do laboratório de Imunogenética do ICBAS e pelo seu contributo na execução e apreciação do trabalho realizado;

À Professora Doutora Corália, pela ajuda no tratamento estatístico dos dados;

A todo o pessoal do Laboratório de Imnogenética pela ajuda na realização da vertente laboratorial deste trabalho, em especial à Dra Sandra pela sua paciência e simpatia ao ter-me iniciado nos meandros do trabalho laboratorial;

À Dra. Adélia e Dr. Victor do Canil Municipal do Porto e ao Dr. Helder do Canil Intermunicipal da Associação de Municípios de Terras de Santa Maria da Feira, por permitirem as recolhas de sangue enriquecendo a amostra (e aos funcionários que auxiliaram de alguma forma);

A todos os proprietários, veterinários e instituições que autorizaram e auxiliaram a recolha das amostras, permitindo a realização desta investigação;

Àqueles que, de alguma forma, permitiram e colaboraram na relização deste estudo;

O meu muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE QUADROS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	ix
RESUMO	xi
INTRODUÇÃO	1
OBJECTIVOS	9
MATERIAIS E MÉTODOS	10
RESULTADOS	15
CONCLUSÕES E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	25
BIBLIOGRAFIA	27
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. I: Principais agentes patogénicos transmitidos ao Homem por ixodídeos	1
Fig. II: <i>Ixodes scapularis</i>	2
Fig. III: <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	2
Fig. IV: <i>Dermacentor reticulatus</i>	2
Fig. V: <i>Argas reflexus</i>	2
Fig. VI: Ciclo de vida da carraça (adaptado)	3
Fig. VII: Microorganismos detectados/isolados de ixodídeos em Portugal	3
Fig. VIII: <i>A. phagocitophilum</i> (em neutrófilo de cão)	5
Fig. IX: Mórula de <i>E. canis</i> (em monócito de cão)	5
Fig. X: <i>Rickettsia conorii</i> em células Vero	5
Fig. XI: A - sistema de venopunção para tubos com vácuo (flebótomo e respectiva agulha), B - tubos vacutainer K3 EDTA, C - tubos vacutainer heparina litium, D - punção da jugular de cão	10
Fig. XII: Várias etapas da realização da técnica IFI	11
Fig. XIII: Reacção negativa (à esquerda) e positiva (à direita) para <i>E. canis</i> , <i>R. conorii</i> e <i>A. phagocytophilum</i> (400x)	12
Fig. XIV: Várias etapas da realização da técnica PCR	12
Fig. XV: Visualização da electroforese em gel de agarose (resultados obtidos pelo método PCR <i>nested</i> para os agentes <i>A. phagocytophilum</i> , <i>R. conorii</i> e <i>E. canis</i>)	24

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I: Distribuição da amostra por grupos etários	15
Quadro II: Frequências de seropositivos e negativos, por idades, para cada um dos agentes	15
Quadro III: Teste do qui-quadrado (idade <i>versus</i> serologia) para cada um dos agentes	16
Quadro IV: Distribuição da amostra por porte	17
Quadro V: Frequências de seropositivos e negativos, por porte, para cada um dos agentes	17
Quadro VI: Teste do qui-quadrado (porte <i>versus</i> serologia) para cada um dos agentes	18
Quadro VII: Distribuição da amostra por concelho (tabela e gráfico)	19
Quadro VIII: Distribuição da amostra por local de amostragem	19
Quadro IX: Frequências de seropositivos e negativos, por local, para cada um dos agentes	19
Quadro X: Teste do qui-quadrado (local <i>versus</i> serologia) para cada um dos agentes	20
Quadro XI: Gráfico da distribuição da amostra por grupo	21
Quadro XII: Frequências de seropositivos e negativos, por grupo, para cada um dos agentes	21
Quadro XIII: Teste do qui-quadrado (grupo <i>versus</i> serologia) para cada um dos agentes	22
Quadro XIV: Percentagem de animais por titulação máxima, para cada um dos agentes	23
Quadro XV: Titulações máximas para as amostras testadas por PCR, para os agentes <i>A. phagocytophilum</i> , <i>E. canis</i> e <i>R. conorii</i>	23

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: FICHA INDIVIDUAL DE RECOLHA DE DADOS	I
ANEXO II: TABELA DE DADOS DAS AMOSTRAS	II
ANEXO III: PROTOCOLO DE PESQUISA DE ANTICORPOS PELA TÉCNICA IFI	VI
ANEXO IV: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA	VIII
ANEXO V: PROTOCOLO DE PCR (PROGRAMAS DO TERMOCICLADOR)	X
ANEXO VI: PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DE PCR	XII
ANEXO VII: PROTOCOLO DE SEQUENCIAÇÃO	XIII
ANEXO VIII: PROTOCOLO DE ISOLAMENTO	XIV
ANEXO IX: PROTOCOLOS DE COLORAÇÕES E SOLUÇÕES	XVI

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Ac: Anticorpo

BID: Duas vezes ao dia, geralmente de 12 em 12 horas

Bp: Pares de bases

CEVDI: Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Dra: Doutora

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay*

Fig.: Figura

G: Gauss

g: força centrífuga relativa (raio da centrífuga em cm x velocidade em rpm)

gtlA: Gene da citrato sintetase

°C: Graus Celsius

h: Hora

IC: Intervalo de Confiança

ICBAS: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

IFI: Imunofluorescência Indirecta

IM: Intramuscular

INE: Instituto Nacional de Estatística

>: Maior

≥: Maior ou igual

®: Marca registada

<: Menor

≤: Menor ou igual

μL: Microlitro

mg: Miligrama

ml: Mililitro

n: Número de indivíduos

OmpB: “ Outer membrane protein” B

%: Percentagem

χ²: Qui-quadrado

PBS: Tampão fosfato salino

PCR: “Polymerase chain reaction”

PO: *per os*, por via oral

Kg: Quilograma

Rpm: Rotações por minuto

rRNA: “ribossomal ribonucleic acid”

SC: Via subcutânea.

SID: Uma vez ao dia, de 24 em 24 horas

s.l.: “sensu lato”

SNC: Sistema Nervoso Central

vs: Versus

RESUMO

Os cães estão expostos ao parasitismo por artrópodes vectores de diversos agentes patogénicos (tais como *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii*), que estão a ampliar a sua distribuição geográfica, principalmente devido a mudanças climáticas e acesso a novos nichos ecológicos.

Em Portugal, *Rhipicephalus sanguineus* é um dos ixodídeos vector mais importantes, encontrando-se distribuído por todo o país e, embora as maiores densidades populacionais ocorram nos meses mais quentes, pode estar activo durante todo o ano.

A sintomatologia associada às doenças em estudo (ehrlichiose, rickettsiose e anaplasrose canina) é inespecífica, podendo existir desde indivíduos assintomáticos, até animais que apresentem febre, linfadenomegália e hemorragias (bem com outros sinais clínicos e alterações hematológicas e bioquímicas), podendo conduzir à morte.

O diagnóstico definitivo é difícil e é a informação conjunta de vários factores (da anamnese, estação do ano, presença de ixodídeos, sinais clínicos, etc.), com a seroconversão (detectada por IFI) e a identificação do agente (por PCR ou por cultura celular), que permitem a sua realização.

Com este trabalho pretendeu estudar-se a prevalência de *E. canis*, *R. conorii* e *A. phagocytophilum* em cães da área metropolitana do Porto, assim como determinar alguns factores de risco, recolhendo-se amostras de sangue a 142 cães, entre Outubro e Dezembro de 2009 e pesquisando-se a existência de anticorpos anti-*E. canis*, anti-*R. conorii* e anti-*A. phagocytophilum* (por IFI, n=140) e a existência dos agentes por biologia molecular (PCR, n=11).

Tendo-se suspeitado da presença de *A. phagocytophilum* (em duas das amostras testadas por PCR), realizou-se a sequenciação das mesmas, não tendo sido possível confirmar a identidade do agente.

Os objectivos definidos foram atingidos, obtendo-se seroprevalências de 10% para *A. phagocytophilum*, de 11,4% para *E. canis* e de 37,1% para *R. conorii* e concluindo-se que existe uma correlação significativa entre a idade dos animais e o resultado da serologia para *R. conorii*.

INTRODUÇÃO

Os canídeos estão expostos ao parasitismo por diversos artrópodes incluindo piolhos, pulgas, mosquitos e ixodídeos (Otranto *et al.*, 2009).

Estes parasitas lesionam o animal através de acções mecânica, espoliadora, irritativa e inflamatória, podendo originar reacções alérgicas e toxicidade no hospedeiro, devido aos produtos resultantes do seu catabolismo. Por outro lado, têm também uma acção indirecta, não menos importante, na medida em que são vectores de diversos agentes patogénicos, podendo transmitir aos canídeos, a outros animais e mesmo aos humanos uma grande variedade de agentes responsáveis por doenças infecciosas, incluindo protozoários, rickettsias e outras bactérias, vírus e até fungos (Figueiredo, 2007).

A emergência de doenças infecciosas e parasitárias associadas a artrópodes vectores, que estão a ampliar a sua distribuição geográfica, principalmente devido a mudanças climáticas e acesso a nichos ecológicos diferentes dos habituais, representa um novo desafio para a medicina humana e veterinária (André, 2008).

Agentes patogénicos	Doença	Distribuição geográfica	Principais vectores
Vírus			
Encefalite transmitida por carraça (TBE)	Meningoencefalite	Europa, Ásia	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>
Febre hemorrágica Crimeia-Congo (CCHF)	Febre hemorrágica	Europa, Ásia, África	<i>Hyalomma marginatum marginatum</i> , <i>H. m. rufipes</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.
Febre da carraça do Colorado (CTF)	Doença febril sistémica	América do Norte	<i>Dermacentor andersoni</i>
Bactérias			
<i>Rickettsias</i>			
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Febre exantemática das Montanhas Rochosas	América do Norte Central e do Sul	<i>Dermacentor</i> spp. <i>Amblyomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.
<i>R. conorii</i>	Febre botonosa ou escarvo-nodular	Sub-região Mediterrânica Ásia e África	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Amblyomma</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.
<i>R. japonica</i>	Febre exantemática oriental	Japão	<i>Haemaphysalis</i> spp.
<i>R. africae</i>	Febre da carraça africana	África	<i>Amblyomma hebraeum</i>
<i>R. slovaca</i>	Tibola (Linfadenopatia causada pela picada da carraça)	Europa	<i>Dermacentor marginatus</i>
<i>R. helvetica</i>	Perimiocardite crónica	Europa	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Ehrlichias</i>			
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrlichiose monocítica humana	EUA	<i>Amblyomma americanum</i>
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Ehrlichiose granulocítica humana (HGE)	EUA Europa	<i>Ixodes scapularis</i> <i>I. ricinus</i> ;
<i>Borrelias</i>			
<i>Borrelia burgdorferi</i> sl.	Borreliose de Lyme	EUA Europa África Austrália	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> <i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. holocyclus</i>
Outras bactérias			
<i>Francisella tularensis</i>	Tuarémia	Europa, Ásia, África, América do Norte	<i>Haemaphysalis leporipalustris</i> , <i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>D. andersoni</i> , <i>D. americanum</i> <i>Rhipicephalus</i> spp.
<i>Coxiella burnetii</i>	Febre Q	Europa, Ásia, África, América do Norte	
Protozoários			
Babesias			
<i>Babesia microti</i>	Babesiose humana	EUA	<i>I. scapularis</i>
<i>B. divergens</i>	Babesiose humana	Europa	<i>I. ricinus</i>

Fig. I: Principais agentes patogénicos transmitidos ao Homem por ixodídeos (Silva *et al.*, 2006).

O clima é um factor importante na distribuição espacial e temporal dos vectores e agentes patogénicos, verificando-se que as alterações climáticas têm um impacto importante na ecologia das populações de vectores, provocando uma variação na incidência e uma alteração na sazonalidade das doenças associadas aos mesmos (Sousa *et al.*, 2006).

Os membros da Ordem Ixodida, vulgarmente designados por carraças, são artrópodes ectoparasitas hematófagos estritos, vectores de alguns dos agentes etiológicos mais importantes para os humanos e animais. Conhecem-se cerca de 850 espécies que, de acordo com a sua morfologia, se agrupam na sua quase totalidade em duas grandes famílias: Ixodidae ou carraças de corpo duro (que possuem um escudo dorsal esclerotizado) e Argasidae ou carraças de corpo mole (desprovidas de escudo dorsal). Existe uma terceira família, Nuttalielidae, representada apenas por uma espécie (*Nuttalliela namaqua*), bastante rara (apenas conhecida na África do Sul), que possui características intermédias entre os elementos das outras famílias e cujo papel na transmissão de agentes infecciosos ainda é desconhecido (Silva *et al.*, 2006).



Fig. II: *Ixodes scapularis*
Fonte: Scott Bauer

Fig. III: *Rhipicephalus sanguineus*
Fonte: Darlyne Murawski

Fig. IV: *Dermacentor reticulatus*
Fonte: Rainer Altenkamp

Fig. V: *Argas reflexus*
Fonte: Facultad Biología, UCM

Fig. II, III e IV: Família Ixodidae. Fig. V: Família Argasidae.

Nestas duas famílias, cerca de 10% das espécies conhecidas são vectores de agentes patogénicos, embora sejam os ixodídeos (membros da família Ixodidae) os que se revestem de maior importância médica (Silva *et al.*, 2006).

O ciclo de vida dos ixodídeos compreende quatro fases (uma inactiva – ovo e três activas - larva, ninfa e adulto), sendo necessário uma refeição sanguínea para que cada fase activa passe para a fase seguinte, num processo conhecido por muda. Apenas os adultos apresentam dimorfismos sexual e a cópula ocorre, normalmente, sobre o hospedeiro e durante a ingestão de sangue (Figueiredo, 2007). O processo alimentar é geralmente longo e, embora a sua duração esteja dependente da fase

evolutiva, pode levar de 2 a 14 dias, período durante o qual os ixodídeos permanecem fixos ao hospedeiro até completarem a refeição sanguínea.

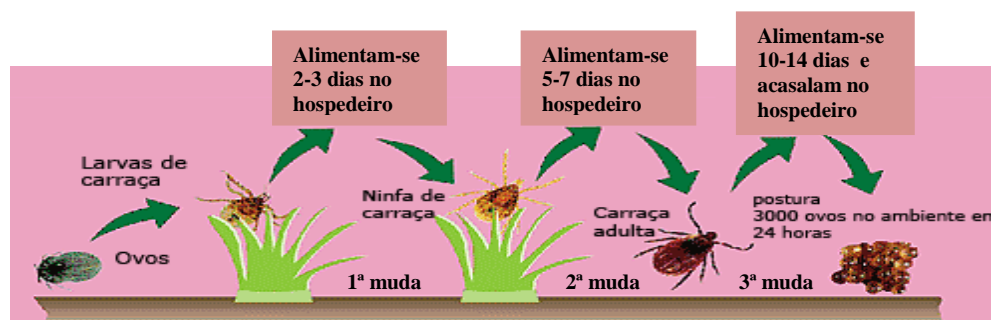


Fig. VI: Ciclo de vida da carrça *R. sanguineus* (adaptado).
Fonte: Merial, 2009

Em Portugal, *Rhipicephalus sanguineus* é um dos ixodídeos vector mais importantes, encontrando-se distribuído de norte a sul do país e embora as maiores densidades populacionais ocorram nos meses mais quentes pode estar activo durante todo o ano.

Espécie ixodológica (Vector/Reservatório)	Agente Etiológico	Patologia associada	Patogenia em Portugal	Assinalado em Portugal
<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>Rickettsia slovaca</i>	Tibola	Desconhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1995
	<i>Borrelia burgdorferi sl</i>	Borreliose de Lyme	Conhecida	Baptista <i>et al.</i> , 2004
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Vírus Palma	—	Desconhecida	Filipe <i>et al.</i> , 1994
<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Rickettsia aeschlimanii</i>	—	Desconhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1999
	Vírus Dhori	—	Desconhecida	Filipe & Casals, 1979
<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Borrelia burgdorferi sl</i>	Borreliose de Lyme	Conhecida	Baptista <i>et al.</i> , 2004
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Ehrlichiose granulocítica humana	Desconhecida	Santos <i>et al.</i> , 2004a
	<i>Rickettsia helvetica</i>	Perimiocardite crónica	Desconhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1999
<i>Ixodes ventraloi</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Ehrlichiose granulocítica humana	Desconhecida	Santos <i>et al.</i> , 2004a
	<i>Rickettsia helvetica</i>	Perimiocardite crónica	Desconhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1999
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Rickettsia conorii</i>	Febre botonosa ou escarso-nodular	Conhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1995
	<i>R. massiliae</i>	—	Desconhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1995
	Vírus Thogoto	—	Desconhecida	Filipe & Calisher, 1984
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	<i>Rickettsia massiliae</i>	—	Desconhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1995
	Bar 29/MTU5	—	Desconhecida	Bacellar <i>et al.</i> , 1995

Fig. VII: Microorganismos detectados/isolados de ixodídeos em Portugal (Silva *et al.*, 2006).

Esta é uma espécie que demonstra preferência por construções humanas e por zonas citadinas onde exista um mínimo de vegetação, como parques públicos e jardins privados, onde habitem ou passem cães. Os ixodídeos podem colonizar canis e casas, desenvolvendo populações estáveis e permanentes, as quais não parecem interessar-se muito pelo parasitismo humano, apresentando uma clara afinidade pelos canídeos (Figueiredo, 2007); no entanto, as fases imaturas parecem ser menos específicas para o hospedeiro, sendo estas as prováveis responsáveis da transmissão da doença ao

Homem, especialmente durante os meses de Verão (Mannelli *et al.*, 2003). Em 2003 foi descrito um caso de um sem abrigo alcoólico que vivia com o seu cão na rua, perto de Marselha, ao qual foram retirados 22 ixodídeos (1 adulto e 21 ninfas) da espécie *R. sanguineus* (Rovero, 2008).

Apesar desta espécie de ixodídeo ter sido encontrada por todo o país, tem maior incidência no sul, onde as condições lhe são mais propícias: temperaturas mínimas anuais acima dos 10-14°C e humidade relativa entre 60-75% (Alexandre, 2005). Quando as condições ambientais (temperatura, humidade relativa, fotoperíodo) são favoráveis esta espécie pode completar anualmente 2 ou 3 ciclos de vida, com posturas na ordem dos 5000 ovos (Silva *et al.*, 2006).

A transmissão accidental ao Homem de *Rickettsia conorii*, assim como de outros agentes, faz-se habitualmente através da saliva do artrópode vector. Os ixodídeos infectam-se ao efectuarem uma refeição de sangue em animais infectados, mantendo o agente no seu organismo e podendo transmiti-lo durante os estados evolutivos seguintes à infecção original (transmissão transtadial). Quando ocorrer a invasão dos ovários o agente transmite-se aos ovos e, neste caso, a nova geração de ixodídeos quando eclodir já se encontra infectada (transmissão transovária).

No caso das rickettsias ocorre tanto a transmissão transovárica como a transtadial. Já outros agentes como a ehrlichia ou o anaplasma não são transmitidos transovaricamente (Duarte, 2008).

As rickettsias estão amplamente distribuídas, em focos endémicos, por várias regiões geográficas do Mundo, incluindo Portugal, e são importantes causas de morbidade e mortalidade no Homem e nos animais domésticos (Kidd, 2006). Estes agentes são bactérias intracelulares obrigatórias que têm como alvo preferencial as células endoteliais dos hospedeiros e provocam doenças (rickettsioses) que afectam o Homem e alguns animais domésticos. Pertencem ao Reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alpha-Proteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Rickettsiaceae que engloba os Géneros *Rickettsia* e *Orientia* (Euzéby, 2008).

O Género *Rickettsia* divide-se taxonomicamente em dois grupos distintos: o grupo das febres exantemáticas (que inclui *R. conorii*, *R. felis*, *R. slovaca*, *R. rickettsii* e *R. akari*) e o grupo do tifo (que inclui *R. typhi* e *R. prowazekii*), sendo que cada um destes grupos possui diferentes espécies de rickettsias passíveis de afectar o Homem e/ou os animais domésticos (Sousa *et al.*, 2003). As estratégias para detecção de rickettsias baseiam-se no reconhecimento de sequências de diferentes genes que codificam proteínas como as 17kDA, citrato sintetase (gltA) e as proteínas de membrana OmpA e OmpB (*outer membrane protein*) (Sousa, 2008). As rickettsias do grupo das febres exantemáticas têm capacidade de polimerisar a actina e passar de uma célula para a outra sem provocar destruição das mesmas, ao contrário das do grupo do tifo que se multiplicam na célula hospedeira até que esta rebente (Walker *et al.*, 2003).

Em Portugal existem duas estirpes responsáveis pela doença vulgarmente denominada de febre da carraça: as estirpes *Rickettsia conorii* Malish e *R. conorii* Israeli tick typhus. As duas estirpes já foram isoladas a partir de humanos e do vector *Rhipicephalus sanguineus* (Sousa, 2008). Esta zoonose, também conhecida por febre escaro-nodular, febre botonosa ou febre mediterrânica, em humanos, tem carácter endémico, com predomínio estival nos países da orla mediterrânica, tendo sido identificada em Portugal pela 1ª vez em 1917, sendo uma doença de declaração obrigatória desde 1950 (Alexandre, 2005). Trata-se de uma infecção causada pela *R. conorii* e cujos sinais clínicos clássicos incluem febre, exantema, cefaleias, mialgias a presença de uma escara escura característica no local da mordida da carraça (Harrus, 2007).

Recentemente, um estudo realizado no Brasil sobre prevalência de rickettsioses e erlichioses, mostrou que 42,4% dos animais estudados eram serorreactivos para *Rickettsia spp.* demonstrando que os cães podem ser sentinela para a infecção humana nas mesmas áreas (Saito *et al.*, 2008).

A ehrlichiose canina monocítica é causada por *E. canis* e por *E. chaffensis*, sendo esta última responsável pela erliquiose humana monocítica. A ehrlichiose granulocítica canina e a anaplasmoses são causadas por *E. ewingii* e por *Anaplasma phagocytophilum* respectivamente (Cardoso *et al.*, 2008).

A infecção por *A. phagocytophilum* é uma doença generalizada em canídeos cujos alvos primários são os neutrófilos. Até 2001, esta espécie pertencia ao género *Ehrlichia* e englobava *E. phagocytophila* (agente da febre da carraça em bovinos, ovinos e caprinos), *E. equi* (agente da ehrlichiose granulocítica equina) e o agente da ehrlichiose granulocítica humana (assim denominado). Actualmente estes três agentes encontram-se englobados numa única espécie (*A. phagocytophilum*), pertencendo ao género *Anaplasma* que, tal como o género *Ehrlichia*, se caracteriza por serem bactérias gram negativas, intracelulares obrigatórias, pleomórficas, que se replicam em vacúolos membranares de células eucarióticas, através de divisão binária, formando grandes corpos de inclusão denominados de mórulas.



Fig. VIII: *A. phagocytophilum* (em neutrófilo de cão).
Fonte: Arsenaut & Messic, 2005

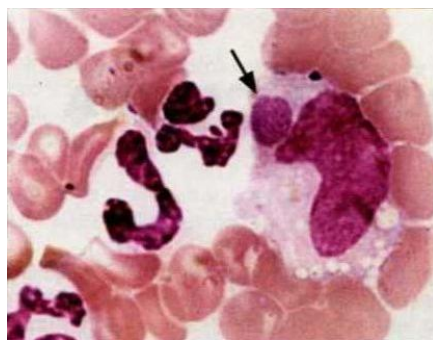


Fig. IX: Mórula de *E. canis* (em monócito de cão).
Fonte: Almosny, 2000

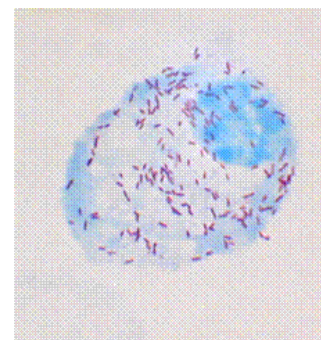


Fig. X: *Rickettsia conorii* em células Vero
Fonte: Roveri, 2008

Os principais vectores de *A. phagocytophilum* pertencem ao complexo *Ixodes ricinus*, incluindo as espécies *I. ricinus* na Europa, *I. persulcatus* na Europa de Leste e Ásia, *I. scapularis* e *I. pacificus* na América do Norte (Alleman & Wamsley, 2008). Este agente também já foi identificado em *I. ricinus* e *I. ventralloii* em Portugal Continental e na ilha da Madeira (Santos et al, 2009).

Ehrlichia canis foi observada pela primeira vez como agente de doença em canídeos em 1935 por A. Donatien e F. Lestoquard, investigadores franceses, que na altura desenvolviam um trabalho sobre leishmaniose, no Instituto Pasteur da Argélia (Donatien & Lestoquard, 1935 e 1937). Os animais afectados desenvolviam um processo febril agudo que cursava com anemia e nos seus monócitos, observados em esfregaço sanguíneo, podia ver-se microorganismos que inicialmente se supôs tratar de rickettsias. Actualmente sabe-se que este é o agente da ehrlichiose monocítica canina, tendo sido isoladas e caracterizadas quatro estirpes de *E. canis*: Flórida, Oklahoma, Israelita e Venezuelana que, apesar de geograficamente isoladas estão estreitamente relacionadas como se demonstrou por sequenciação do gene 16rRNA (Alexandre, 2005).

A espécie *E. canis* relaciona-se intimamente com *E. chafeensis* e *E. ewingii*, ambos agentes etiológicos de doença tanto em canídeos como em humanos. Contudo até ao momento a *E. canis* continua a estar associada a patologia em canídeos tendo sido apenas diagnosticados dois casos em humanos na Venezuela (Perez *et al.*, 1996; Unver *et al.*, 2001, Perez *et al.*, 2006).

A ehrlichiose monocítica canina apresenta três fases características: uma aguda (inicial) que pode perdurar por 2-4 semanas, uma sub-clínica que pode perdurar até 5 anos e uma crónica onde o animal demonstra sintomatologia mais grave, podendo levar à morte.

Visto que o *R. sanguineus* é vector de outros agentes para além de *E. canis*, surgem frequentemente animais com infecções múltiplas com *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *A. platys* que influenciam o curso clínico da doença, contribuindo para a deterioração do estado de saúde do animal. A sintomatologia das três doenças (ehrlichiose, rickettsiose e anaplasmose canina) é inespecífica podendo existir desde indivíduos assintomáticos, até animais que apresentem febre, letargia, linfadenomegália, hemorragias (com existência de petéquias e epistaxis), sintomatologia sistémica gastrointestinal e do sistema nervoso central, etc., com alterações hematológicas (como trombocitopénia e anemia) e alterações bioquímicas (como hipoalbuminémia, hiperglobulinémia, níveis elevados de fosfatase alcalina), podendo conduzir à morte dos mesmos, independentemente dos títulos da serologia (apesar de títulos mais altos corresponderem normalmente a animais com sintomatologia clínica).

Existem vários métodos laboratoriais directos e indirectos utilizados no diagnóstico das patologias associadas a vectores. Os directos são os que se baseiam na detecção da presença do agente e incluem a microscopia (a visualização de esfregaço sanguíneo para pesquisa das mórulas de

E. canis ou *A. phagocytophilum*), a cultura celular (com inoculação directa em HL60 para isolamento de *A. phagocytophilum* ou com inoculação directa seguida de centrifugação, técnica conhecida por *shell vial*, para isolamento de *E. canis* em DH82 ou *Rickettsia* spp. Vero E6) e a detecção de ácidos nucleicos (PCR - *Polymerase Chain Reaction*). Os indirectos baseiam-se na detecção de anticorpos específicos em soro, plasma e liquor, recorrendo a técnicas como a imunofluorescência indirecta (IFI), a *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e o *Western immunoblot*. Também existem diversos *kits* comerciais que nalguns casos permitem o diagnóstico rápido de mais de uma doença através do método ELISA e ainda diversos testes fornecidos por vários laboratórios que combinam a utilização dos métodos IFI e PCR.

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

Actualmente, o teste serológico mais utilizado (o “gold standard test”) é o IFI, recomendado pelo grupo de trabalho das rickettsioses da Organização Mundial de Saúde. As recomendações para a confirmação serológica da doença incluem a demonstração de seroconversão, ou seja, um aumento ou diminuição em quatro vezes no título original em sangue recolhido com quinze dias de intervalo.

Outro método muito utilizado actualmente é a detecção de DNA do agente através do método PCR. Este apresenta como principais vantagens a sua elevada especificidade e sensibilidade tanto nos animais como nos vectores, o facto de permitir detectar a doença na fase aguda ainda no período de pré-patência dos anticorpos e o facto de possibilitar a identificação específica do agente causal por sequenciação. Como desvantagens apresenta-se o facto de ser um método dispendioso, exigindo equipamento laboratorial e técnicos especializados. Ainda assim, um resultado negativo pode não excluir a presença de infecção devendo, sempre que possível, ser associado a um método serológico.

A infecção simultânea, com mais do que um agente patogénico, pode ter implicações importantes na apresentação clínica, diagnóstico, terapêutica e prognóstico do paciente, sendo importante caracterizar estas influências, de modo a conhecer potenciais co-infecções. Existem indicações de que cães com elevada exposição a ixodídeos podem ser sujeitos a uma elevada taxa de infecção concomitante com múltiplos agentes, potencialmente zoonóticos (Figueiredo, 2007).

O diagnóstico definitivo é difícil e é a informação conjunta da anamnese, residência do animal em área endémica, estação do ano, presença de ixodídeos, dos sinais clínicos, das alterações hematológicas e bioquímicas, com a possível identificação do agente no sangue periférico por visualização de esfregaço sanguíneo (na fase aguda da doença), a seroconversão detectada por IFI e identificação do agente por PCR ou por cultura celular, que permitem a sua realização.

A melhor profilaxia destas doenças assenta na implementação de medidas higiénicas e educacionais. A utilização de antiparasitários externos em cães (e outros animais de companhia) é altamente recomendada especialmente nos meses de maior prevalência de ectoparasitas hematófagos. Por vezes o tratamento ambiental pode ser necessário em caso de infestações elevadas de *R. sanguineus* em interiores, devido ao seu comportamento marcadamente endofílico (Dantas-Torres, 2008).

Como tratamento de eleição para canídeos (nas três patologias) diversos autores referem a administração de doxiciclina por via oral, na dose de 10mg/Kg/dia, numa administração única (SID) durante três semanas, podendo ser necessário prolongar o tratamento em situações mais graves. Como muitas vezes existem infecções concomitantes por vários agentes e a sintomatologia é inespecífica e, visto que a doxiciclina é ineficaz no tratamento de alguns deles (como no caso da babesiose) é de considerar um tratamento combinado de doxiciclina (conforme descrito anteriormente) com dipropionato de imidocarb na dose de 5mg/Kg por injeção sub-cutânea ou intramuscular com repetição passados 14 dias. Normalmente a resposta ao tratamento é boa e rapidamente perceptível (em 24-48h), desde que este seja realizado precocemente.

A prevalência destes agentes, em Portugal, ainda é desconhecida em grande parte do país, havendo resultados muito díspares nos diversos estudos realizados. Assim, num estudo de 2007, realizado no Distrito de Bragança, a 473 cães, sobre a seroprevalência de *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii*, *Borrelia burgdorferi* s.l. e *Francisella tularensis* e usando limiar de positividade (*cut off*) de 1:128 verificou-se que 65% dos cães apresentaram anticorpos para os agentes em estudo: 17,6% para *A. phagocytophilum*, 14,8% para *E. canis*, 55,3% para *R. conorii*, 12,7% para *B. burgdorferi* e 2,5% para *F. tularensis* (Figueiredo, 2007). Num outro estudo, realizado na região do Algarve em 400 cães, divididos pelas 4 estações do ano, sobre a seroprevalência de *E. canis*, *R. conorii* e *B. Burgdorferi* s.l. usando um *cut off* de 1:128, os resultados obtidos foram de 5,25% para *E. canis*, 38,5% para *R. conorii* e 2,25% para *B. burgdorferi* (Alexandre, 2005). Num outro estudo realizado entre Maio de 2007 e Fevereiro de 2008, em canídeos de Lisboa, sobre *R. conorii* (n=91), *E. canis* (n=90), *L. infantum* (n=56) e *B. canis* (n=26), obtiveram-se respectivamente seroprevalências de 72,53%, 50%, 14,29% e 42,31%, tendo sido utilizado como limiar de positividade os valores de 1:40 e/ou 1:80 (Duarte, 2008). Ainda noutro estudo, realizado na região de Lisboa em 23 cães (Ferreira, 2008), obteve-se seroprevalências de 87,0% para *R. conorii* (*cut off* de 1:40), 60,9% para *B. canis* (*cut off* de 1:32) e 39,1% para *E. canis* (com um *cut off* de 1:50), dificultando ainda mais a comparação ao estabelecer diferentes limites de positividade conforme o agente.

OBJECTIVOS

Com este trabalho pretendeu estudar-se a prevalência de *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia conorii* numa amostra de cães sub-dividida em quatro grupos de estudo (cães residentes em canis, em explorações agrícolas, atendidos em clínicas veterinárias e cães de caçadores), na área metropolitana do Porto.

Objectivou, ainda, testar-se se haveria algum factor de predisponência para a doença dentro dos factores estudados (sexo, idade, porte, grupo de estudo).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram recolhidas amostras de sangue a 142 cães, durante o período de Outubro a Dezembro de 2009, na área metropolitana do Porto, de ambos os sexos, desde os 6 meses até aos 17 anos, de várias sub-populações (a que foi chamado grupo de estudo): cães residentes em canis municipais há menos de 1 mês (recolhidos da rua ou entregues pelos seus proprietários por diversos motivos), cães assistidos em clínicas veterinárias, cães de explorações agrícolas (com vacarias) e cães de caçadores (utilizados para caçar por todo o país).

A cada animal do estudo foi atribuído um código, que foi inscrito nos tubos de sangue respectivos e numa ficha onde se preencheram alguns dados pertinentes sobre o mesmo (ver anexo I). Estes dados foram posteriormente inseridos em folha de cálculo do programa *Microsoft Office Excel* e codificados para tratamento estatístico (ver anexo II).

De cada animal foi recolhido 4,5ml de sangue para tubo de vácuo com EDTA e mais 4,5ml para tubo de vácuo heparinizado. O primeiro tubo foi utilizado para a realização do PCR e o segundo para IFI. O método de recolha utilizado foi por punção da jugular com recurso a tubos vacutainer (recorrendo a flebótomo e agulhas apropriadas) excepto nos cães do Canil Municipal do Porto (onde só foi possível efectuar a recolha em cães sedados no protocolo de eutanásia) em que se fez punção cardíaca utilizando seringas de 10 ml e agulhas 18G de 1,5 polegadas.

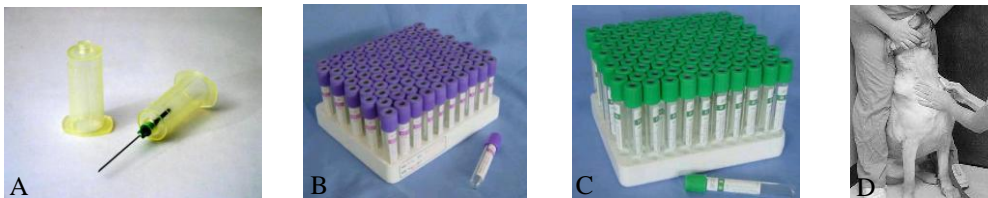


Fig. XI: A - sistema de venopunção para tubos com vácuo (flebótomo e respectiva agulha), B - tubos vacutainer K3 EDTA, C - tubos vacutainer heparina litium, D - punção da jugular de cão.

As amostras de sangue foram de seguida transportadas em bolsa isotérmica. Quando não foi possível o transporte imediatamente após a recolha, os tubos foram guardados no frigorífico (a 4°C). Já no laboratório de imunogenética, no ICBAS (Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar), os tubos de sangue com heparina foram centrifugados a 2000 rpm durante 5 minutos, para a separação do plasma dos restantes constituintes (em câmara de fluxo laminar), sendo este colocado em tubos *ependorf* de 2ml e imediatamente congelados a -80°C. No caso dos tubos de sangue com EDTA, fez-se a extracção de DNA a partir de 4,5ml de amostra recorrendo ao *kit* da Puregene Gentra® e de

acordo com as indicações do fornecedor (ver anexo IV). O DNA foi então acondicionado em tubos *ependorff* de 1,5ml e congelado a -20°C.

Todas as amostras foram acondicionadas em gelo seco numa caixa de esferovite e transportadas até ao laboratório do CEVDI (Centro de Estudos e Vectores de Doenças Infecciosas) em Águas de Moura para a realização da IFI e PCR. Os controlos positivos (da IFI e do PCR) assim com as lâminas da imunofluorescência foram gentilmente cedidos pelo CEVDI assim como o material e equipamento utilizado na sua realização.

A pesquisa de anticorpos no plasma pela técnica IFI foi realizada recorrendo a lâminas de antigénio produzidas “In House” com a estirpe espanhola de *E. canis*, *A. phagocytophilum* Webster e *R. conorii* Malish (ver anexo III). Todas as amostras de plasma (n=140) foram descongeladas e pesquisadas inicialmente na diluição 1:64, definido como valor de *cut off*. Nas amostras consideradas positivas a 1:64 foram feitas diluições seriadas (1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 e 1:4096) para determinar o título final.

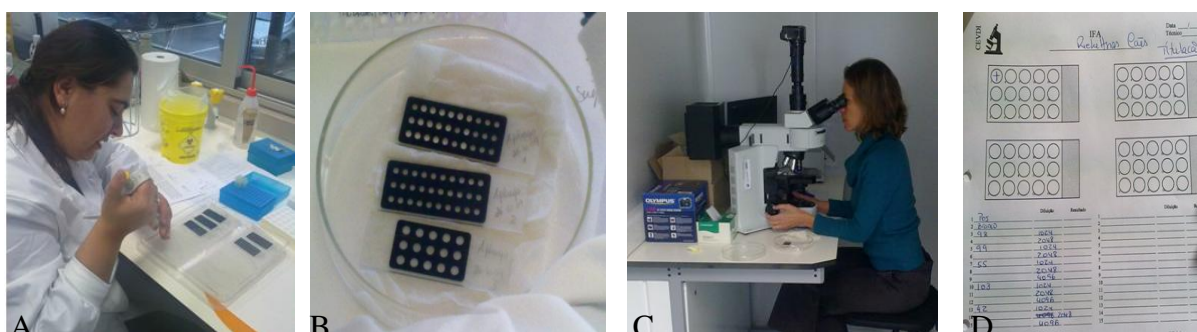


Fig. XII: Várias etapas da realização da técnica IFI. A – pingar os poços das lâminas com as várias titulações do agente (Eva Silva, autora); B – hidratação das lâminas; C – visualização das lâminas no microscópio de fluorescência por técnico especializado (Dra Rita, do CEVDI); D – folha de registo dos resultados.

Pesquisou-se a existência de anticorpos anti-*E. canis*, anti-*R. conorii* e anti-*A. phagocytophilum*. As amostras positivas foram determinadas pela visualização dos agentes com fluorescência verde-maçã (no caso das lâminas de antigénio de *E. canis* e *A. phagocytophilum* foram apenas valorizados os microrganismos que se encontram no interior das células de cultura) e as amostras negativas surgiram como um campo escuro com as células de cultura coradas de vermelho.

O PCR foi realizado nas amostras de DNA de animais que apresentaram resultado positivo de IFI para pelo menos dois dos três agentes em estudo bem como numa amostra extra escolhida aleatoriamente do grupo de animais com resultado de IFI negativo para os agentes em estudo (n=11).

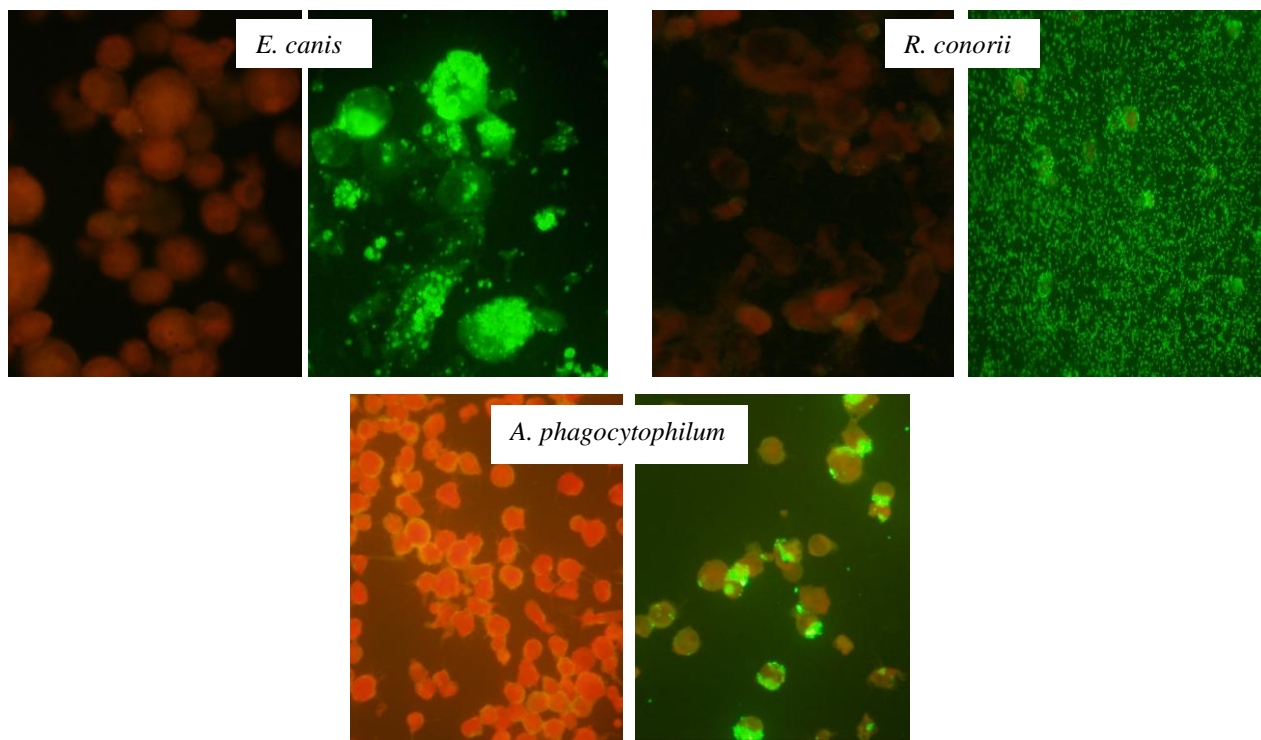


Fig. XIII: Reacção negativa (à esquerda) e positiva (à direita) para *E. canis*, *R. conorii* e *A. phagocytophilum* (400x)

Após a quantificação do DNA e avaliação do seu grau de pureza (no Nanodrop1000®), realizou-se o teste *nested* PCR.



Fig. XIV: Várias etapas da realização da técnica PCR. Da esquerda para a direita: A – Nanodrop1000®; B – Termociclador; C – Gel para observação das bandas de DNA.

Para detecção de ácidos nucleicos de *E. canis*, o protocolo consistiu num PCR “nested”, utilizando na primeira reacção os *primers* ECC (5'- AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC -3') e ECB (5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA -3') e na segunda reacção o par HE3 (5'- TATAGG TACCGTCATTATCTTCCCTAT -3') e HCS (5'- CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA -

3'), que amplificam um fragmento de 390bp do gene que codifica a sub-unidade 16S do RNA ribossómico (*16S rRNA*) (Dawson et al, 1996).

Para detecção de *R. conorii* utilizaram-se, na primeira reacção, os *primers* Omp B OR (5'- GCTTTATAACCAGCTAAACCACC -3') e Omp B OF (5'- GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA -3') e na 2ª reacção os *primers* Omp B IF (5'- GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA -3') e Omp B IR (5' –GGTTTGGCCCATATACCATAAG -3'), que amplificam um fragmento de 420 bp do gene que codifica uma proteína de membrana (*ompB*) (Choi et al, 2005).

No caso do *A. phagocytophilum* os *primers* utilizados foram o HS1 (5'– TGGGCTGGTAMTGAAAT –3') e o HS6 (5'– CCICCIIGGIACIAYACCTTC –3') na 1ª reacção e o HS43 (5'- ATWGCWAARGAAGCATAGTC -3') e o HS45 (5'- ACTTCACGYITCATAGAC-3') na 2ª reacção, *primers* que amplificam um fragmento de 442 bp do operão que codifica proteínas de choque térmico (*groESL*) (Sumner et al, 1997).

O PCR foi realizado num volume total de 50 µl na primeira reacção (ou 25 µl na segunda reacção), contendo 1µM de cada *primers*, 2,5 U of Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTP, 50mM potassium chloride, 10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl pH 8,3 (FastStart Taq DNA Polymerase Kit, Roche) e 10 µl do extracto de DNA (ou 2,5 µl do amplicon na segunda reacção). As condições de amplificação foram dependentes dos *primers* utilizados e estão descritas no protocolo do anexo V. Em cada corrida do PCR, para além dum controlo positivo (*A. phagocytophilum* Webster, *E. canis* estirpe espanhola e *R. parkeri*) também foi usada água estéril como controlo negativo. Para prevenir contaminação cruzada utilizaram-se pontas estéreis com filtro e as etapas da preparação da master mix, da aplicação das amostras de DNA e da amplificação e electroforese foram realizadas em três salas separadas.

Após a reacção de PCR, efectuou-se um gel com 1,5% de agarose com GelRed® (1 µl/30ml), diluído em água bidestilada da Biotarget®. Após a completa dissolução da agarose (em micro-ondas) e o seu arrefecimento a cerca de 37°C, adicionou-se 1µl de GelRed® a 30 ml da agarose e colocou-se a mistura na tina de electroforese (*Horizon 58*, Life Technologies®) com pentes de 14 poços. Após a solidificação do gel, procedeu-se à imersão do mesmo com TBE a 1%, à adição de 5µl das amostras a testar com 2µl de azul de bromofenol e à respectiva colocação nos poços do gel. Os últimos poços foram reservados para a aplicação de 5 µl do(s) controlo(s) negativo(s) e 5µl do(s) controlo(s) positivo(s). A tina foi então fechada e ligou-se o aparelho para as condições de electroforese de 15-30 minutos a 100 Volts e 400 mA, com uma fonte de alimentação EPS 600 (*Electroforesis Power Supply*, Pharmacia®). Decorrido este tempo, o gel foi colocado num aparelho transiluminador

(*Electrophoresis Documentation and Analysis System*, Kodak®) e na presença de luz ultravioleta foram verificadas e fotografadas as bandas de DNA.

Os produtos de PCR considerados positivos foram então purificados recorrendo ao kit JETquick Spin Column Technique®, Genomed, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (ver anexo VI) e sequenciados para confirmar a identidade do fragmento DNA amplificado. Na reacção de sequenciação foram usados os primers internos (da segunda reacção de PCR) tendo os produtos finais sido analisados no sequenciador ABI 377 ADN®, na Unidade Laboratorial de Utilização Comum do Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge. A procura da homologia das seqüências foi feita através da análise BLASTN do GenBank.

Os resultados obtidos foram inseridos em folha de cálculo do programa *Microsoft Office Excel* para, juntamente com os dados registados de cada animal, poderem ser tratados estatisticamente. Posteriormente, estes dados foram exportados para o programa *SPSS (PASW Statistics 17)* e tratados, calculando-se a frequência para os diversos parâmetros em estudo, a prevalência de animais seropositivos no total da amostra e a sua distribuição geográfica (frequência por concelho), assim como se algum dos factores estudados (sexo, idade e grupo de estudo) influenciavam significativamente ou não os resultados obtidos com recurso ao teste estatístico do qui-quadrado (χ^2). Um nível de probabilidade (p) < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A determinação das prevalências foi calculada com base na relação dos resultados seropositivos em função da totalidade da amostra em estudo, para um intervalo de confiança de 95%.

Devido à inexistência de resultados de seroprevalência na zona estudada, assim como o total desconhecimento do número de canídeos que existem (ou seja, qual o tamanho da população) e com base nos diversos estudos efectuados noutras regiões de Portugal e de Espanha, França e Itália, estimou-se que a prevalência esperada para as três patologias seria de 10%. Assim, com um intervalo de confiança (IC) de 95%, e um erro associado (p) de 5%, a amostra a estudar teria de ter 139 animais (138,3) para ser representativa da população, por aplicação da fórmula $p \pm 1,96 \sqrt{[p(1-p)]/n}$, em que 1,96 corresponde a um IC de 95% na tabela da distribuição normal.

A área metropolitana do Porto tem sede no Porto e agrupa 16 concelhos, que em 2007 totalizavam 1.679.854 habitantes em 2.089 km² de área: Arouca, Espinho, Gondomar, Maia, Matosinhos, Oliveira de Azeméis, Porto, Póvoa de Varzim, Santa Maria da Feira, Santo Tirso, São João da Madeira, Trofa, Vale de Cambra, Valongo, Vila do Conde e Vila Nova de Gaia, correspondendo à área abrangida pelo Grande Porto e Entre-Douro e Vouga, pelo que se procedeu a recolhas em toda esta área. Para melhor registar os animais amostrados por freguesia, cada morada recebeu o código correspondente ao distrito, concelho e freguesia (DTCCFR), conforme consta na base de dados do Instituto Nacional de Estatística (INE, 2007).

RESULTADOS

Durante o período entre Setembro a Dezembro de 2009 foram recolhidas 142 amostras de sangue de canídeos das quais 45,1% pertenciam a animais do sexo feminino e os restantes 54,9% do sexo masculino. Da distribuição das amostras por grupos etários, o grupo dos 3 aos 7 anos foi o que apresentou maior número de indivíduos, 49 (34,5%) animais (Quadro I). Fez-se ainda um novo agrupamento dos dados em animais jovens (até 3 anos, inclusivé) e animais adultos (mais de 3 anos), para diminuir as classes de variáveis, de forma a aumentar a significância, observando-se que 83 (58,5%) animais pertencem a grupo dos adultos.

Quadro I: Distribuição da amostra por grupos etários.

	Frequência	Percentagem
≤1ano	21	14,8
1 a 3 anos	38	26,8
≥3 a 7 anos	49	34,5
≥7 a 10 anos	18	12,7
>10 anos	16	11,3
Total	142	100,0

Foram cruzados os resultados obtidos pela serologia com o agrupamento em jovens e adultos, e calculadas as frequências (Quadro II) e os testes do qui-quadrado para os agentes em estudo (Quadro III).

Quadro II: Frequências de seropositivos e negativos, por idades, para cada um dos agentes.

Freq.	<i>A. phagocytophilum</i>		Total	Freq.	<i>E. canis</i>		Total	Freq.	<i>R. conorii</i>		Total
	+	-			+	-			+	-	
Jovens	7	50	57	Jovens	7	50	57	Jovens	13	44	57
Adultos	7	76	83	Adultos	9	74	83	Adultos	39	44	83
Total	14	126	140	Total	16	124	140	Total	52	88	140

Assim, os jovens apresentaram uma seroprevalência de 12,3% para *A. phagocytophilum* e para *E. canis* e de 22,8% para *R. conorii* enquanto que os adultos apresentaram valores de 8,4% para *A. phagocytophilum*, 10,8% para *E. canis* e 47% para o último agente em estudo.

Quadro III: Teste do qui-quadrado (idade *versus* serologia) para cada um dos agentes.

Chi-Square Tests (<i>A. phagocitophylum</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,556 ^a	1	,456		
Fisher's Exact Test				,569	,320
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,70. b. Computed only for a 2x2 table.					
Chi-Square Tests (<i>E. canis</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,069 ^a	1	,793		
Fisher's Exact Test				,793	,498
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,51. b. Computed only for a 2x2 table.					
Chi-Square Tests (<i>R. conorii</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8,463	1	,004		
Fisher's Exact Test				,004	,003
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,70. b. Computed only for a 2x2 table.					

Dos dados apresentados (Quadro III) conclui-se que apenas relativamente ao agente *R. conorii* existe uma correlação significativa entre a idade dos animais (conforme agrupados) e o resultado da serologia ($p=0,04$, ou seja, $<0,05$).

Foi também estudada a relação entre o porte dos animais e a seroprevalência encontrada para os diferentes agentes. Do total da amostra estudada e dos 4 grupos estabelecidos de acordo com a tabela, o maior número de animais, 64 (45,1%) correspondia a animais de porte médio (10 a 20Kg) (Quadro IV). Fez-se novo agrupamento apenas com dois grupos, cães de pequeno e médio porte (até 20Kg) e cães de grande porte (acima de 20Kg), e verificou-se que 84 (59,2%) dos cães amostrados pertencem a cães até 20 kg.

Quadro IV: Distribuição da amostra por porte.

PORTE	Frequência	Porcentagem
Mini e pequeno ($\leq 10\text{Kg}$)	20	14,1
Médio (10 a 20Kg)	64	45,1
Grande (20 a 40Kg)	52	36,6
Gigante (+ de 40Kg)	6	4,2
Total	142	100,0

PORTE	Frequência	Porcentagem
Até (\leq)20Kg	84	59,2
Mais de ($>$)20Kg	58	40,8
Total	142	100,0

De novo, foram cruzados os resultados obtidos pela serologia com o agrupamento em animais com peso inferior e superior a 20Kg, obtendo-se as frequências (Quadro V) e realizando-se o teste do qui-quadrado (Quadro VI).

Quadro V: Frequências de seropositivos e negativos, por porte, para cada um dos agentes.

Freq.	<i>A. phagocytophilum</i>		Total
	+	-	
$\leq 20\text{Kg}$	5	78	83
$>20\text{Kg}$	9	48	57
Total	14	126	140

Freq.	<i>E. canis</i>		Total
	+	-	
$\leq 20\text{Kg}$	6	77	83
$>20\text{Kg}$	10	47	57
Total	16	124	140

Freq.	<i>R. conorii</i>		Total
	+	-	
$\leq 20\text{Kg}$	32	51	83
$>20\text{Kg}$	20	37	57
Total	52	88	140

Verifica-se que 6,0%, 7,2% e 38,6% são as frequências (em porcentagem) obtidas para os animais do primeiro grupo ($\leq 20\text{Kg}$) e 15,8%, 17,5% e 35,1% para o segundo grupo ($>20\text{Kg}$), para *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii*, respectivamente.

Dos dados a seguir apresentados (no Quadro VI) conclui-se que não existe nenhuma correlação significativa entre o porte dos animais e a seroprevalência encontrada ($p > 0,05$).

Quadro VI: Teste do qui-quadrado (porte *versus* serologia) para cada um dos agentes.

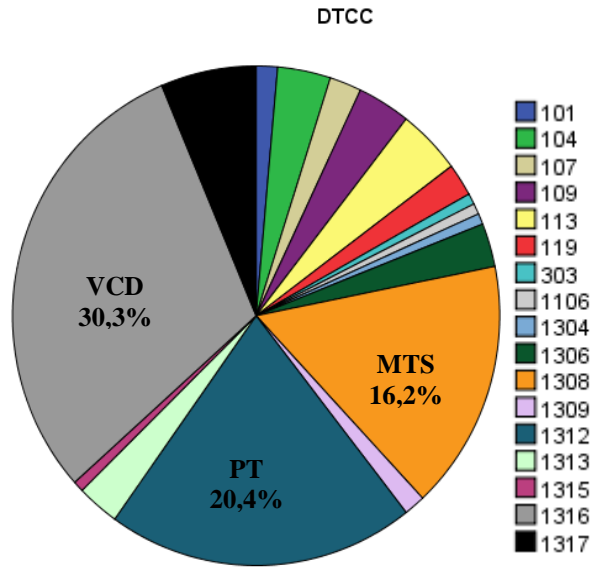
Chi-Square Tests (<i>A. phagocitophilum</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,581 ^a	1	,058		
Fisher's Exact Test				,084	,055
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,70. b. Computed only for a 2x2 table.					
Chi-Square Tests (<i>E. canis</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,552 ^a	1	,059		
Fisher's Exact Test				,102	,054
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,51. b. Computed only for a 2x2 table.					
Chi-Square Tests (<i>R. conorii</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	0,174 ^a	1	,677		
Fisher's Exact Test				,724	,407
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,70. b. Computed only for a 2x2 table.					

Relativamente à distribuição da amostra pela área estudada (área metropolitana do Porto), observa-se que o maior nº de indivíduos amostrados pertence aos concelhos de Vila do Conde (30,3%), Porto (20,4%) e Matosinhos (23%) como pode ver-se na tabela seguinte e no respectivo gráfico (Quadro VII). Seis dos animais (2 de Águeda, 1 de Braga, 1 de Lisboa e 2 de Paços de Ferreira), que representam 4,2%, foram inseridos na amostra (apesar de não possuírem a residência principal na área definida para amostrar), pois são habitualmente atendidos em clínicas veterinárias que pertenciam à área em estudo.

Para uma menor dispersão dos dados estes foram reagrupados em 2 categorias: animais geograficamente provenientes da área a norte do Concelho do Porto e os provenientes do Concelho do Porto e a sul do Concelho do Porto (Quadro VIII).

Quadro VII: Distribuição da amostra por concelho (tabela e gráfico).

CÓDIGOS INE (DTCC)	CONCELHO	Freq.	%
0101	Águeda	2	1,4
0104	Arouca	5	3,5
0107	Espinho	3	2,1
0109	Feira	5	3,5
0113	Ol. Azeméis	6	4,2
0119	V.de Cambra	3	2,1
0303	Braga	1	0,7
1106	Lisboa	1	0,7
1304	Gondomar	1	0,7
1306	Maia	4	2,8
1308	Matosinhos	23	16,2
1309	P. de Ferreira	2	1,4
1312	Porto	29	20,4
1313	P. de Varzim	4	2,8
1315	Valongo	1	0,7
1316	V. do Conde	43	30,3
1317	V. N. de Gaia	9	6,3
Total		142	10



LEGENDA:

DTCC = Distrito e Concelho (código associado)

VCD = Vila do Conde

PT = Porto

MTS = Matosinhos

Quadro VIII: Distribuição da amostra por local de amostragem.

LOCAL	Frequência	Percentagem
A Norte do Porto (A)	77	54,2
Porto e Sul do Porto (B)	65	45,8
TOTAL	142	100,0

Quadro IX: Frequências de seropositivos e negativos, por local, para cada um dos agentes.

Freq.	<i>A. phagocytophilum</i>		Total
	+	-	
A	9	68	77
B	5	58	63
Total	14	126	140

Freq.	<i>E. canis</i>		Total
	+	-	
A	9	68	77
B	7	56	63
Total	16	124	140

Freq.	<i>R. conorii</i>		Total
	+	-	
A	32	45	77
B	20	43	63
Total	52	88	140

Como anteriormente, realizou-se o teste do qui-quadrado (Quadro X) para verificar uma possível influência da localização dos animais sobre os resultados da serologia, não se tendo confirmado a sua existência ($p > 0,05$).

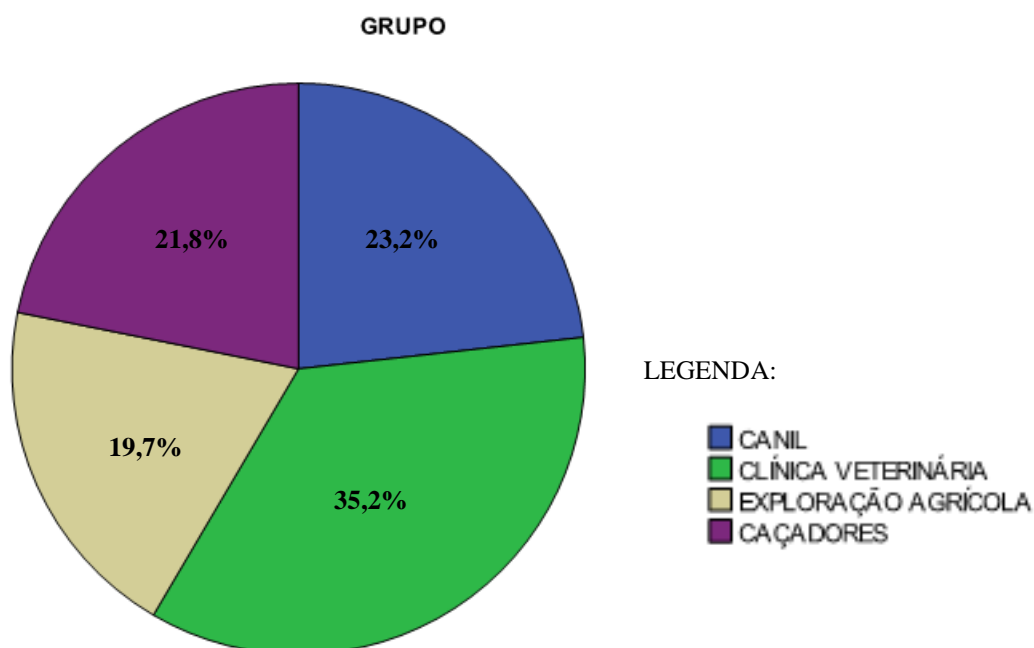
Quadro X: Teste do qui-quadrado (local *versus* serologia) para cada um dos agentes.

Chi-Square Tests (<i>A. phagocitophilum</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	0,542 ^a	1	,462		
Fisher's Exact Test				,576	,328
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,30. b. Computed only for a 2x2 table.					
Chi-Square Tests (<i>E. canis</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	0,011 ^a	1	,915		
Fisher's Exact Test				1,000	,566
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,20. b. Computed only for a 2x2 table.					
Chi-Square Tests (<i>R. conorii</i>)	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,429 ^a	1	,232		
Fisher's Exact Test				,292	,154
N of Valid Cases	140				
a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 23,40. b. Computed only for a 2x2 table.					

Quanto aos grupos de sub-população que se estudaram, pode ver-se a distribuição das amostras no gráfico seguinte (Quadro XI) assim como as frequências da serologia e os respectivos testes de qui-quadrado.

A distribuição da população amostrada pelos grupos de sub-população mostra que a maioria (35,2%) pertenceu aos animais atendidos em clínicas veterinárias e a minoria aos cães de explorações agrícolas (19,7%).

Quadro XI: Gráfico da distribuição da amostra por grupo.



Quadro XII: Frequências de seropositivos e negativos, por grupo, para cada um dos agentes.

Freq.	<i>A. phagocytophilum</i>		Total
	+	-	
Canil	4	28	32
Cl. Vet.	3	46	49
Exp. Agr.	5	23	28
Caçadores	2	29	31
Total	14	126	140

Freq.	<i>E. canis</i>		Total
	+	-	
Canil	2	30	32
Cl. Vet.	7	42	49
Exp. Agr.	4	24	28
Caçadores	3	28	31
Total	16	124	140

Freq.	<i>R. conorii</i>		Total
	+	-	
Canil	11	21	32
Cl. Vet.	17	32	49
Exp. Agr.	10	18	28
Caçadores	14	17	31
Total	52	88	140

Relativamente aos resultados da serologia verifica-se uma prevalência de 12,5%, 6,25% e 34,38% para os animais de canil, 6,12%, 14,29% e 34,69% para os cães de clínicas veterinárias, 17,86%, 14,29% e 35,71% para os cães de explorações agrícolas e finalmente, 6,45%, 9,68% e 45,16% para os cães de caçadores, quanto aos agentes *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii*, respectivamente.

No entanto, o teste do qui-quadrado (Quadro XIII) revelou não se observarem diferenças significativas nos resultados da serologia relacionadas com o grupo em estudo, ressalvando que o

número de animais amostrados para cada grupo era insuficiente para um resultado fiável relativamente aos agentes *A. phagocytophilum* e *E. canis*.

Quadro XIII: Teste do qui-quadrado (grupo *versus* serologia) para cada um dos agentes.

Chi-Square Tests

<i>A. phagocytophilum</i>	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3,395 ^a	3	,335
Likelihood Ratio	3,230	3	,357
Linear-by-Linear Association	,044	1	,834
N of Valid Cases	140		

a. 4 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,80.

Chi-Square Tests

<i>E. canis</i>	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1,563 ^a	3	,668
Likelihood Ratio	1,675	3	,643
Linear-by-Linear Association	,115	1	,734
N of Valid Cases	140		

a. 3 cells (37,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,20.

Chi-Square Tests

<i>R. conorii</i>	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1,109 ^a	3	,775
Likelihood Ratio	1,091	3	,779
Linear-by-Linear Association	,792	1	,374
N of Valid Cases	140		

a. 0 cells (0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,40.

Assim, em 140 animais (do total de 142) testados pela técnica de IFI, obteve-se uma seroprevalência de 10% para *A. phagocytophilum*, de 11,4% para *E. canis* e de 37,1% para *R. conorii*. Das amostras que deram positivo para *A. phagocytophilum*, 8,6% apresentaram titulações máximas de 1:128 e 1,4% de 1:512, sendo os restantes 90% negativos. Em relação ao agente *E. canis*, 5,7% apresentavam titulações máximas de 1:128, 5% de 1:256 e 0,7% de 1:512. Para *R. conorii* os resultados obtidos foram de 5% para a titulação de 1:64, 12,1% para 1:128, 10,7% para

1:256, 5,7% para 1:512, 2,1% para 1:1024, 0,7% para 1:2048 e, finalmente, 0,7% para 1:4096, como se pode observar no Quadro XIV.

Quadro XIV: Percentagem de animais por titulação máxima, para cada um dos agentes.

Titulação máxima	<i>A. phagocytophilum</i> (%)	<i>E. canis</i> (%)	<i>R. conorii</i> (%)
1:64	-	-	5
1:128	8,6	5,7	12,1
1:256	-	5	10,7
1:512	1,4	0,7	5,7
1:1024	-	-	2,1
1:2048	-	-	0,7
1:4096	-	-	0,7

No total da amostra, 10 animais (7%) deram positivo a mais de um agente, sendo que um deles (0,7%) deu positivo para *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii*.

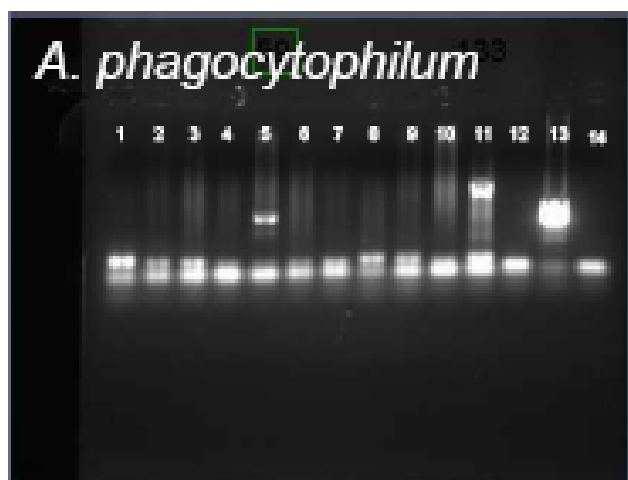
Nestes casos pesquisou-se por biologia molecular a existência dos agentes em estudo, para averiguar se, em alguma situação, era possível identificar uma infecção activa. Também se testou uma amostra que deu serologicamente negativa a todos os agentes (que corresponde ao animal nº 122).

Na tabela do Quadro XV podem ser observadas as titulações máximas obtidas para cada um dos agentes em estudo, nas amostras que foram testadas por biologia molecular.

Quadro XV: Titulações máximas para as amostras testadas por PCR, para os agentes *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii*.

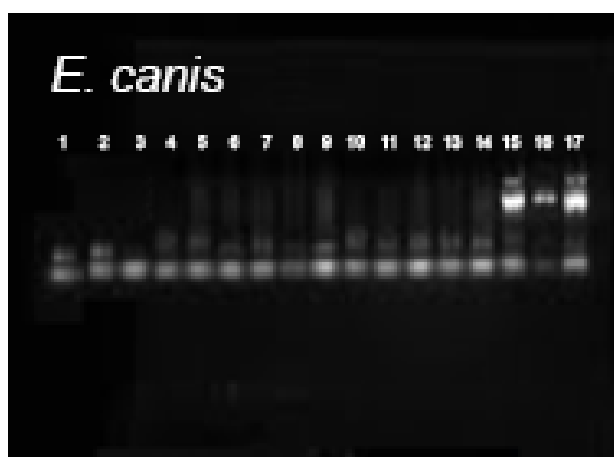
Nº da amostra	Titulação máxima		
	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. canis</i>	<i>R. conorii</i>
1	-	1:128	1:128
2	1:128	-	1:128
27	-	1:256	1:128
55	-	1:128	1:1024
59	1:512	1:512	1:128
79	1:512	1:256	-
88	1:128	-	1:64
113	1:128	-	1:128
121	1:128	-	1:128
122	-	-	-
133	-	1:256	1:128

Como algumas bandas (pertencentes às amostras 59 e 133, conforme numeradas na imagem do gel de *A. phagocytophilum* da Fig. XV) eram sugestivas da presença do agente, foram realizadas sequenciações, mas não foi possível confirmar a sua identidade.



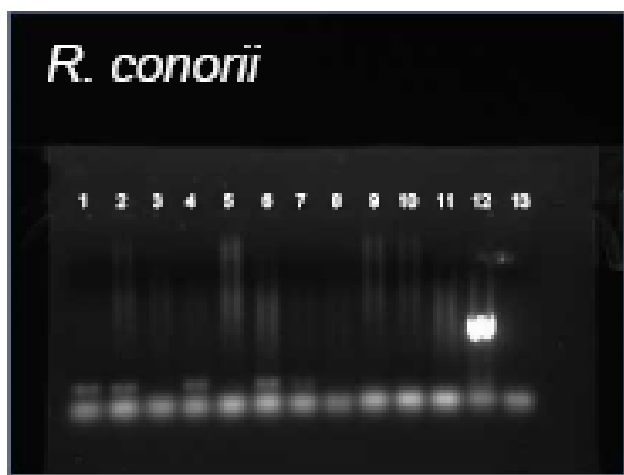
***A. phagocytophilum*:**

- 1: cão 1 (nested)
- 2: cão 2 (nested)
- 3: cão 27 (nested)
- 4: cão 55 (nested)
- 5: cão 59 (nested)
- 6: cão 79 (nested)
- 7: cão 88 (nested)
- 8: cão 113 (nested)
- 9: cão 121 (nested)
- 10: cão 122 (nested)
- 11: cão 133 (nested)
- 12: Branco
- 13: *A. phagocytophilum* Webster
- 14: Branco (nested)



***E. canis*:**

- 1: cão 1 (nested)
- 2: cão 2 (nested)
- 3: cão 27 (nested)
- 4: cão 55 (nested)
- 5: cão 59 (nested)
- 6: cão 79 (nested)
- 7: cão 88 (nested)
- 8: cão 113 (nested)
- 9: cão 121 (nested)
- 10: cão 122 (nested)
- 11: cão 133 (nested)
- 12: Branco 1
- 13: Branco 2
- 14: Branco 1 (nested)
- 15: *E. canis* estirpe espanhola 1
- 16: *E. canis* estirpe espanhola 2
- 17: *E. canis* estirpe espanhola 1 (nested)



***R. conorii*:**

- 1: cão 1 (nested)
- 2: cão 2 (nested)
- 3: cão 27 (nested)
- 4: cão 55 (nested)
- 5: cão 59 (nested)
- 6: cão 79 (nested)
- 7: cão 88 (nested)
- 8: cão 113 (nested)
- 9: cão 121 (nested)
- 10: cão 122 (nested)
- 11: cão 133 (nested)
- 12: *R. parkeri*
- 13: Branco

Fig. XV: Visualização da electroforese em gel de agarose (resultados obtidos pelo método PCR “nested” para os agentes *A. phagocytophilum*, *R. conorii* e *E. canis*).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A época do ano (Outono/Inverno) em que a amostragem foi realizada está associada a uma menor prevalência e actividade dos ixodídeos, pelo que os resultados da biologia molecular se esperavam baixos ou nulos, como efectivamente aconteceu. Apenas duas das amostras analisadas (n=11) apresentaram uma banda sugestiva no PCR realizado com os primers específicos para *A. phagocytophilum*, mas esse resultado não se confirmou na sequenciação, concluindo-se que foi um falso positivo.

O total da amostra recolhida é composto por 142 animais, dos quais 2 não foi possível estudar por serologia, pelo que se cumpriu o mínimo estabelecido de 139 animais que se estimou inicialmente para uma prevalência de 10%, um intervalo de confiança de 95% e um erro associado de 5%.

Os valores de seroprevalência obtidos foram de 10% para *A. phagocytophilum*, 11,4% para *E. canis* e 37,1% para *R. conorii*, considerando um valor de *cut off* de 1:64. Se o *cut off* for assumido em 1:128, apenas a prevalência de *R. conorii* se altera para 31,7%.

Estes resultados, associados aos da biologia molecular e ao facto de os animais não apresentarem sintomatologia compatível com qualquer uma das doenças, levam à conclusão que os animais seropositivos tiveram contacto prévio com os agentes, tendo conseguido recuperar da infecção, com excepção de um animal cuja serologia deu positiva para os três agentes em estudo e tinha sinais clínicos compatíveis com hemoparasitoses, além de apresentar concomitantemente sarna demodécica generalizada.

A prevalência destes agentes, em Portugal, ainda é desconhecida em grande parte do país, havendo resultados muito díspares nos diversos estudos realizados, mas que se mostram difíceis de comparar pois o valor de *cut off* (limiar de positividade) definido é muito diferente, influenciando os resultados.

Em estudos realizados em Portugal (já anteriormente referidos) obtiveram-se resultados de prevalência para *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *R. conorii* de 17,6%, 14,8% e 55,3% respectivamente (Figueiredo, 2007), ou ainda de 5,25% para *E. canis* e 38,5% para *R. conorii* (Alexandre, 2005), utilizando o mesmo valor de *cut off* (1:128).

É muito importante que toda a comunidade científica (incluindo os diversos laboratórios) utilize um limiar de positividade *standard* para a serologia (por exemplo *cut off* de 1:128) por forma a se poder comparar correcta e facilmente todos os estudos similares em diversas regiões do mundo, permitindo conhecer as reais prevalências.

Avaliou-se também a relação entre vários factores de risco (sexo, idade, porte, localização geográfica e grupo de estudo) e a seropositividade. Apenas para *R. conorii* a idade dos animais possui uma influência significativa (segundo resultados obtidos pelo teste do qui-quadrado), observando-se prevalências de 22,81% para os jovens (n=59) e de 46,99% para os adultos (n=83). Conclui-se, assim, que os animais com mais de 3 anos podem ser utilizados como bioindicadores de rickettsioses.

Nas prevalências obtidas para os grupos definidos (cães provenientes de canis, de explorações agrícolas, atendidos em clínicas veterinárias e de caçadores), apesar de existirem resultados diferentes, essa diferença não é significativa.

Este estudo leva à reflexão sobre algumas questões:

- Qual a necessidade de efectuar tratamento em cães saudáveis quando se detecta por biologia molecular a presença do agente das três patologias estudadas? Ou seja, até que ponto um animal saudável não possui defesas suficientes para combater por si só a patologia?

- Poderemos usar a idade como factor a considerar para a decisão terapêutica?

- Quais serão os factores de risco associados à seropositividade para estas doenças?

- Quantos animais passam por infecção activa sem que esta seja diagnosticada?

Os DNAs extraídos das amostras recolhidas foram conservados a -20°C para que este estudo possa ser continuado, pretendendo-se testá-las todas por biologia molecular.

Pretende-se continuar este estudo, alargando a recolha de amostras para as quatro estações do ano, assim como efectuar a pesquisa para outros agentes (como por exemplo *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Borrelia burgdorferi*, etc.).

BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, D. M. et al. (2007) Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis* Ciência Rural, Santa Maria, v.37, n.3, p.796-802.
- Aguiar, D. M. et al. (2007) Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. Journal of Medical Entomology, v. 44, n. 1, p. 126-132.
- Alleman, Rick & Heather L. Wamsley (2008) An update on anaplasmosis in dogs, Veterinary Medicine
- Alexandre, N (2005). Estudo clínico e epidemiológico da febre botonosa, ehrlichiose canina e borreliose de Lyme numa população de canídeos domésticos do Algarve. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (Portugal): 147 pp.
- Alexandre, N; Santos, A; Nuncio, M; Sousa, R; Boinas, F; Bacellar, F (2008). Detection of *Ehrlichia canis* by polimerase chain reaction in dogs from Portugal. The Veterinary Journal.
- Amaro, M., Bacellar, F. & França, A. (2003) Report of eight cases of fatal and severe Mediterranean Spotted Fever in Portugal. *Annals New York Academy of Sciences*, 990, 331-343.
- André, Marcos Rogério (2008) Detecção Molecular e sorológica de *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em felídeos selvagens brasileiros mantidos em cativeiro. Universidade Estadual Paulista, Faculdade das Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal.
- Blanco, J.R. & Oteo, J.A. (2006) Rickettsioses in Europe. *Annals New York Academy of Sciences*, 1078, 26-33.
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*. 152, 173-185.
- Dawson JE, Biggie KL, Warner CK, Cookson K, Jenkins S, Levine JF, Olson JG. (1996) Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am J Vet Res*. 57(8):1175-9.
- Donatien, A., Lestoquard, F. (1937) “État Actuel des Connaissances sur les Rickettsioses Animales”, *Archives de l’Institut Pasteur d’Algérie*, t. XV, no. 2, pp. 162-177.
- Donatien, A., Lestoquard, F. (1937) “Existence en Algérie d’une *Rickettsia* du chien”, *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, t. XXVII, pp. 418-419.

- Donatien, A., Lestoquard, F. (1937) “État Actuel des Connaissances sur les Rickettsioses Animales”, *Archives de l’Institut Pasteur d’Algérie*, t. XV, no. 2, pp. 162-177.
- Duarte, Maria Teresa Teodoro Rocha (2008) Riquetsioses do grupo das febres exantémicas em canídeos domésticos em Portugal: revisão bibliográfica e estudo retrospectivo. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 71.
- Ferreira, Marisa da Fonseca (2008) Parasitoses transmitidas por ixodídeos. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 99.
- Figueiredo, Teresa Catarina Dias (2007) Estudo da Prevalência de Doenças Associadas a Vectores em Canídeos Domésticos do Distrito de Bragança. Mestrado em Microbiologia Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, 183.
- Galvão, M.A.M. et. al (2005) Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico; *Revista Saúde Pública*, 39(5), 850-856.
- Goddard, J. (1989) Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 26:628-629.
- Hechemy, K.E., Oteo, J.A., Raoult, D., Silverman, D.J. & Blanco, J.R. (2006) A century of rickettsiology: emerging, reemerging, and molecular diagnostic aspects and emerging veterinary rickettsioses - an overview. *Annals New York Academy of Sciences*, 1078, 1-14.
- Jensen, J., D. Simon, H. M. Escobar, J. T. Soller, J. Bullerdiek, P. Beelitz, K. Pfister, I. Nolte (2006) *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Blackwell Verlag, Berlin. *Zoonoses and Public Health*, 54: 99-101.
- Kidd, L.B. (2006) *Molecular characterization of rickettsial diseases in dogs*. Ph.D. in immunology. College of Veterinary Medicine - North Carolina State University.
- Labruna, M. B. et al. (2007) A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 143, n. 2, p. 189-95.
- Louro, Emília et. al (2006), Febre escaro-nodular: uma zoonose benigna? *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*, vol.13 (1), 14-18
- López, J., Abarca K.V. & Azócar A.T. (2007) Evidencia clínica y serológica de rickettsiosis canina en Chile. *Rev. Chil. Infect.*, 24(3), 189-193.
- Nakaghi, A. C. H. et al. (2008) Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural*, v. 38, n. 3, p. 766-770.

- Neer, T.M & Harrus, S. (2006) Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections) In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. (3rd ed.) (pp 203-216). Philadelphia: Saunders.
- NDIP, L. M. et al. (2005) Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. *Veterinary Microbiology*, v. 111, n. 1-2, p. 59-66.
- Pedroso, Thatianna Camilo (2006) Eficácia da doxiciclina e da combinação com o dipropionato de imidocarb no tratamento de *Ehrlichia canis* em cães. Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Basil, 65.
- PEREZ M, RIKIHISA Y, WEN B. (1996) *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J Clin Microbiol.*;34(9):2133-9.
- Pittau, Marco (2005) *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. U.S. National Center for Infectious Diseases Magazine/Journal Professional English
- Poças, J., Bacellar, F. & Filipe, A. (2002) Clínica e diagnóstico laboratorial da febre escarionodular. *Medicina Interna*, 9(1), 52-56.
- Rovey C, Brouquil P, Raoult D. (2008) Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerging Infectious Diseases*.
In "<http://www.cdc.gov/EID/content/14/9/1360.htm>" (consultado a 20/12/2009)
- Saito, Taís B. at. Al (2008) Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. *Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(1), pp. 102–108.
- Santos, A; Alexandre, N; Sousa, R; Núncio, M; Bacellar, F; Dumler, J (2009). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Veterinary Record*, 164: 168-171
- Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J. & Breitschwerdt, E.B. (2001) Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74-80.
- Silva, M.M., Santos, A.S., Formosinho, P. & Bacellar, F. (2006) Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 19, 39-48.
- Sousa, R. (2008) Mediterranean Spotted Fever and Identification of New Agents of Rickettsioses in Portugal. Doutorado em Ciências da Vida (Saúde Pública), Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, 221.
- Sousa, R., Nóbrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. (2003) Sobre a realidade da Febre Escarionodular em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 16, 429-436.

- Sousa, R. & Bacellar, F. (2004) Morbi-mortalidade por *Rickettsia conorii* em Portugal. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, 13(1), 180-184.
- Sousa, R., Santos-Silva M., Santos, A.S., Barros, S.C., Torgal, J., Walker, D.H. & Bacellar, F. (2007) *Rickettsia conorii* Israeli Tick Tiphus strain isolated from *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(3), 444-447.
- Sousa, R., Duque, L., Poças, J., Torgal, J., Bacellar, F., Olano, J.P. & Walker, D.H. (2008) Portuguese patient infected with *Rickettsia sibirica*. *Emerging infectious diseases*, 14(3), 529-531.
- Sousa, R., T. de, Luz, P. Parreira, M. Santos-Silva, and F. Bacellar (2006) Boutonneuse fever and climate variability. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078:162-169.
- Sousa Santos, Ana, M. Margarida Santos-Silva, Rita de Sousa, Fatima Bacellar, and J. Stephen Dumler (2009). PCR-Based Survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese Ticks (Acari: Ixodidae). *Vector-borne and Zoonotic diseases*; 9(1): 33-40.
- Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF. (1997) PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of Ehrlichia species. *J Clin Microbiol.*;35(8):2087-92.

ANEXO II:

TABELA DE DADOS DAS AMOSTRAS

Nº Amostra	Grupo	Distrito	Concelho	Freguesia	Sexo	Idade (anos)	RAÇA/PORTE
1	4	PORTO	VILA DO CONDE (VCD)	GUILHABREU	M	9	PODENGO /MEDIO
2	3	PORTO	MATOSINHOS (MTS)	LAVRA	M	3	SRD/GRANDE
3	2	PORTO	OL AZEMÉIS	OL AZEMÉIS	M	2	TERRANOVA
4	2	PORTO	PORTO	NEVOGILDE	M	1	LABRADOR
5	3	PORTO	VCD	FERREIRÓ	M	4	SRD/MÉDIO
6	1	PORTO	SMFEIRA	PINDELO	F	2	SRD/MÉDIO
7	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	M	7	PODENGO/ MEDIO
8	4	PORTO	VCD	VILAR	F	6	PODENGO/ MEDIO
9	3	PORTO	VCD	VILAR	M	9	SRD/MÉDIO
10	2	PORTO	VCD	MINDELO	F	10	LABRADOR
11	3	PORTO	VCD	GUILHABREU	F	1	DOBERMANN
12	3	PORTO	VCD	MOSTEIRÓ	M	7	SRD/MÉDIO
13	1	PORTO	SMFEIRA	ARGONCILHE	F	7	SRD/GRANDE
14	1	PORTO	SMFEIRA	ARRIFINA	M	4	PODENGO/ MÉDIO
15	3	PORTO	VCD	GIÃO	F	10	SRD/MÉDIO
16	4	PORTO	VCD	MALTA	F	7	PODENGO/ MEDIO
17	1	PORTO	PORTO	PARANHOS	F	0,5	PODENGO/ MÉDIO
18	2	PORTO	MTS	MTS	F	5	SRD/MÉDIA
19	4	PORTO	MTS	LAVRA	M	8	PODENGO/ MEDIO
20	1	PORTO	PORTO	BONFIM	M	9	PODENGO/ MÉDIO
21	2	PORTO	MAIA	MAIA	M	3	GOLDEN RETRIEVER
22	1	PORTO	OL AZEMÉIS	S. ROQUE	M	5	x S. BERNARDO
23	2	PORTO	PORTO	PARANHOS	M	6	LABRADOR
24	2	PORTO	PORTO	RAMALDE	M	3	SRD/ PEQUENO
25	3	PORTO	VCD	BAGUNTE	M	5	SRD/GRANDE
26	1	PORTO	PORTO	MASSARELOS	F	15	CANICHE/ PEQUENO
27	2	PORTO	MTS	S. MAMEDE INFESTA	F	8	LABRADOR
28	3	PORTO	MTS	PERAFITA	M	9	x CASTRO LABOREIRO
29	1	PORTO	PORTO	CAMPANHÃ	M	6	DOGUE ARGENTINO
30	2	PORTO	VNGAIA	VNGAIA (Sta Marinha)	F	1	SRD/MÉDIO
31	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	F	3	PODENGO/ MEDIO
32	1	PORTO	OL AZEMÉIS	UL	F	2	SRD/MÉDIO
33	1	PORTO	AROUCA	URRÔ	M	5	xDOBERMANN
34	1	PORTO	V CAMBRA	ARÔES	M	3	SRD/MÉDIO
35	2	PORTO	VNGAIA	GULPILHARES	F	3	DOGUE ALEMÃO
36	1	PORTO	PORTO	PARANHOS	M	7	CANICHE
37	4	PORTO	VCD	FAJOSZES	F	4	PODENGO/ MEDIO
38	2	PORTO	VNGAIA	GRIJÓ	F	4	DOBERMANN
39	2	PORTO	MAIA	MAIA	M	1,5	ROTTWEILLER

TABELA DE DADOS DAS AMOSTRAS

Nº Amostra	Grupo	Distrito	Concelho	Freguesia	Sexo	Idade (anos)	RAÇA/PORTE
40	3	PORTO	MTS	LAVRA	M	4	SRD/GRANDE
41	4	PORTO	MTS	LAVRA	F	1	PODENGO/ MEDIO
42	2	PORTO	VNGAIA	GRIJÓ	M	2	SRD
43	2	LISBOA	LISBOA	SÉ	F	7,5	BOXER
44	2	PORTO	PORTO	NEVOGILDE	M	6	PASTOR ALEMÃO
45	2	PORTO	STA M FEIRA	TRAVANCA	F	6	DÁLMATA
46	1	PORTO	PORTO	PARANHOS	F	2,5	DÁLMATA
47	2	PORTO	MAIA	VNTELHA	M	7	EPAGNOL BRETON
48	2	PORTO	PÓVOA VARZIM	PÓVOA	M	7	SRD/MÉDIO
49	2	PORTO	ESPINHO	ANTA	M	6	SRD/MÉDIO
50	2	PORTO	VCD	VCD	M	3	S. BERNARDO
51	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	M	3	PODENGO/ MEDIO
52	3	PORTO	MTS	LAVRA	F	1,5	x LABRADOR
53	4	PORTO	MTS	CUSTÓIAS	M	4	PODENGO/ MEDIO
54	3	PORTO	MAIA	VNTELHA	F	7	SRD/PEQUENA
55	3	PORTO	MTS	LAVRA	F	3	SRD/GRANDE
56	4	PORTO	VCD	FAJOSZES	M	5	PODENGO/ MEDIO
57	1	PORTO	SMFEIRA	ARRIFINA	F	2	SRD/MÉDIO
58	2	PORTO	VCD	AZURARA	F	14	CÃO D'ÁGUA PORTUGUÊS
59	2	PORTO	VIANA CASTELO (VC)	VC (Monserrate)	M	10	SRD
60	1	PORTO	PORTO	CAMPANHÃ	M	2	x PITT BULL/ GRANDE
61	2	PORTO	PORTO	LORDELO DO OURO	F	1	SRD/MÉDIA
62	4	PORTO	MTS	LAVRA	M	3	BEAGLE/MÉDIO
63	3	PORTO	VCD	CANIDELO	F	2	CASTRO LABOREIRO
64	2	PORTO	PORTO	FOZ DO DOURO	M	1	LABRADOR
65	3	PORTO	VCD	MOSTEIRÓ	F	4	SRD/MÉDIO
66	3	PORTO	MTS	S. MAMEDE INFESTA	M	4	DOBERMANN
67	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	F	1,5	PODENGO/ MEDIO
68	4	PORTO	MTS	LAVRA	M	1,5	PODENGO/ MEDIO
69	3	PORTO	VCD	FERREIRÓ	F	1	x BOXER
70	4	PORTO	VCD	FAJOSZES	F	3	PODENGO/ MEDIO
71	2	PORTO	PORTO	CEDOFEITA	F	5	SRD/PEQUENO
72	2	PORTO	STA M FEIRA	FEIRA	F	5	GRAND'ANOIS
73	4	PORTO	GONDOMAR	GONDOMAR (S. Cosme)	F	12	SRD/MÉDIO
74	2	PORTO	PÓVOA VARZIM	AMORIM	F	3	PODENGA/ MÉDIA
75	1	PORTO	SMFEIRA	RIO MEÃO	F	5	SRD/MÉDIO
76	1	PORTO	AROUCA	ALVARENGA	F	5	ROTTWEILLER
77	2	PORTO	VALONGO	ALFENA	F	13	SRD/PEQUENO
78	2	BRAGA	BRAGA	BRAGA	F	10,5	COCKER/ MÉDIO
79	1	PORTO	V CAMBRA	VILA CHÃ	M	5	HUSKY

TABELA DE DADOS DAS AMOSTRAS

Nº Amostra	Grupo	Distrito	Concelho	Freguesia	Sexo	Idade (anos)	RAÇA/PORTE
80	3	PORTO	MTS	LAVRA	F	8	SRD/PEQUENA
81	4	PORTO	MTS	LAVRA	M	3	PODENGO/ MEDIO
82	1	PORTO	PORTO	PARANHOS	F	0,5	PODENGO/ MÉDIO
83	2	PORTO	PORTO	NEVOGILDE	M	10	x PASTOR ALEMÃO
84	2	PORTO	VIANA CASTELO	VC (Monserrate)	M	5	LABRADOR
85	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	M	5	PODENGO/ MEDIO
86	1	PORTO	PORTO	ALDOAR	M	12	x CANICHE/ PEQUENO
87	3	PORTO	VCD	OUTEIRO MAIOR	M	7	EPAGNOL BRETON
88	4	PORTO	VCD	MALTA	M	2,5	PODENGO/ MEDIO
89	1	PORTO	PORTO	CAMPANHÃ	F	1	x PITT BULL/ GRANDE
90	1	PORTO	AROUCA	ALVARENGA	M	1	SRD/MÉDIO
91	2	PORTO	PÓVOA VARZIM	PÓVOA	F	6	LABRADOR
92	2	PORTO	PORTO	NEVOGILDE	M	8	COCKER
93	1	PORTO	PORTO	CEDOFEITA	M	11	PODENGO/ MÉDIO
94	2	PORTO	PORTO	LORDELO DO OURO	M	11	COCKER/ MÉDIO
95	3	PORTO	MTS	LAVRA	M	3	BOXER
96	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	M	4	PODENGO/ MEDIO
97	1	PORTO	PORTO	SÃO NICOLAU	F	11	x CANICHE/ PEQUENO
98	2	PORTO	PORTO	CEDOFEITA	M	17	YORKSHIRE MINI
99	4	PORTO	MTS	CUSTÓIAS	M	10	PODENGO/ MEDIO
100	3	PORTO	VCD	FERREIRÓ	M	8	x CASTRO LABOREIRO
101	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	M	7	PODENGO/ MEDIO
102	1	PORTO	PORTO	STO ILDEFONSO	F	15	PASTOR ALEMÃO
103	4	PORTO	MTS	CUSTÓIAS	M	6	PODENGO/ MEDIO
104	2	PORTO	VCD	VCD	F	4	SRD/MÉDIO
105	2	PORTO	VNGAIA	AFURADA (S. Pedro)	F	0,5	SRD/MÉDIO
106	4	PORTO	VCD	MALTA	M	13	BEAGLE/ MÉDIO
107	1	PORTO	PORTO	PARANHOS	F	0,5	PODENGO/ MÉDIO
108	2	PORTO	ESPINHO	ESPINHO	F	3	SRD/MÉDIO
109	1	PORTO	PORTO	PARANHOS	F	11	x SPITZ
110	2	PORTO	VNGAIA	MADALENA	F	1,5	BOXER
111	4	PORTO	VCD	MALTA	M	4	x GRIFFON
112	2	PORTO	VCD	CANIDELO	F	2	SRD/MÉDIA
113	3	PORTO	VCD	GIÃO	M	8	SRD/MÉDIO
114	4	PORTO	VCD	MALTA	F	2	x SABUESA(?)
115	3	PORTO	MTS	LAVRA	M	4	SRD/GRANDE
116	2	PORTO	VCD	VCD	F	10	SRD/MÉDIO
117	3	PORTO	MTS	LAVRA	M	1	PASTOR ALEMÃO
118	2	PORTO	VNGAIA	SERMONDE	F	1	SHARPEI
119	3	PORTO	VCD	CANIDELO	M	5	CASTRO LABOREIRO

TABELA DE DADOS DAS AMOSTRAS

Nº Amostra	Grupo	Distrito	Concelho	Freguesia	Sexo	Idade (anos)	RAÇA/PORTE
120	4	PORTO	VCD	MALTA	M	4	PODENGO/ MEDIO
121	2	PORTO	VNGAIA	MAFAMUDE	M	4	PERDIGUEIRO PORTUGUÊS
122	4	PORTO	MTS	LAVRA	F	8	PODENGO/ MEDIO
123	4	PORTO	VCD	MALTA	M	4	x GRIFFON
124	2	PORTO	PORTO	CEDOFEITA	F	7	SRD/ PEQUENO
125	2	PORTO	PORTO	NEVOGILDE	M	0,75	YORKSHIRE
126	1	PORTO	V CAMBRA	CASTELÕES (S. Pedro)	M	6	SRD/MÉDIO
127	2	PORTO	VCD	GUILHABREU	F	16	SRD/GRANDE
128	1	PORTO	PORTO	PARANHOS	F	0,5	PODENGO/ MÉDIO
129	2	PORTO	PÓVOA VARZIM	PÓVOA	M	5	SRD/MÉDIA
130	3	PORTO	MTS	S. MAMEDE INFESTA	F	0,7	SRD/GRANDE
131	1	PORTO	OL AZEMÉIS	MACINHATA DA SEIXA	M	2	SRD/MÉDIO
132	2	PORTO	ESPINHO	ANTA	M	1	LABRADOR
133	1	PORTO	SMFEIRA	FEIRA	M	6	x PASTOR ALEMÃO
134	3	PORTO	VCD	VILAR	M	0,5	x LABRADOR
135	2	PORTO	VNGAIA	GULPILHARES	M	5	SRD/MÉDIO
136	1	PORTO	AROUCA	STA EULÁLIA	F	3	SRD/GRANDE
137	3	PORTO	VCD	VILAR	F	0,5	x LABRADOR
138	4	PORTO	VCD	GUILHABREU	F	3	PODENGO/ MEDIO
139	3	PORTO	VCD	VILAR	M	2	SRD/GRANDE
140	4	PORTO	MTS	LAVRA	M	3	PODENGO/ MEDIO
141	2	PORTO	OL AZEMÉIS	OL AZEMÉIS	M	2	LABRADOR
142	1	PORTO	AROUCA	ALVARENGA	F	2	x COCKER

LEGENDA:

GRUPOS SUB-POPULAÇÃO (2ª COLUNA):

1=CANIS

2=CLÍNICAS VETERINÁRIAS

3=EXPLORAÇÕES AGRÍCOLAS

4=CAÇADORES

ANEXO III:

PROTOCOLO DE PESQUISA DE ANTICORPOS PELA TÉCNICA IFI (CEVDI)

1. Retirar as Lâminas do congelador, secar, e fixar em acetona 10 min e voltar a secar.
2. Preparar as diluições respectivas dos diferentes soros dos doentes em PBS. Começar por uma diluição de 1: 16 (ver esquema de diluição em anexo).
3. Colocar por cada diluição de soro do doente as diluições nos respectivos poços.
4. Incubar a 37°C em câmara húmida (placa de petri com papel higiénico humedecido) por 30min;
5. Lavar as Lâminas em PBS durante 5min, duas vezes e secar o excesso de água;
OBS: Não é aconselhável deixar as lâminas secarem demais.
6. Preparar o conjugado segundo as normas do fabricante e colocar a diluição do conjugado nos poços respectivos.
7. Incubar a 37°C em câmara húmida 30 min.
8. Lavar as Lâminas em PBS durante 5min, duas vezes e secar o excesso de água;
9. Passar as lâminas por água destilada e deixar secar ao ar.
10. Colocar com de meio de montagem uma lamela, evitando fazer bolhas de ar e excesso de meio para que a lamela não se mova.
11. Manter as lâminas em câmara húmida a 4°C até a leitura em microscópio de fluorescência.

REAGENTES :

CONTROLOS:

Controlo positivo, controlo negativo.

CONJUGADO: FICT- Conjugated produced in rabbit

FICT anti dog

Diluição 1/40 (20 µl conjugado+ 700µl PBS + 80 µl azul de Evans)

PHOSPHATE BUFFER SALINE (PBS) pH 7.6: comercial

FLUÍDO DE MONTAGEM TAMPONADO:

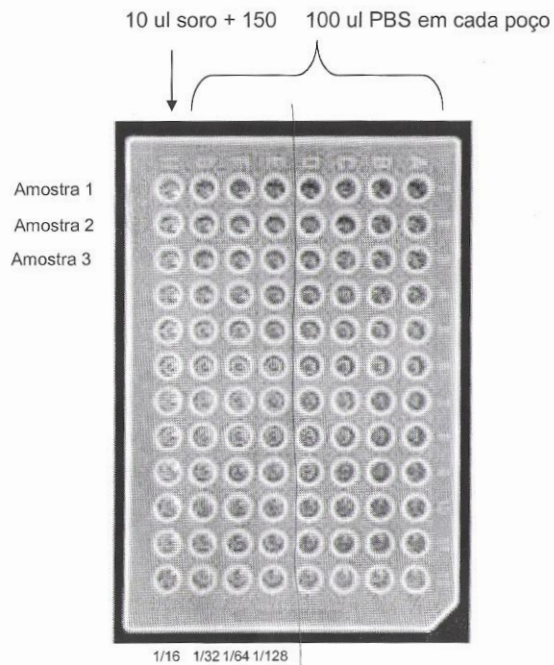
Dabco 2,5g Dabco (1,4 DIAZABICYCLO [2.2.2] Octane)

Glicerol 90ml

PBS 10 ml

PROTOCOLO DE PESQUISA DE ANTICORPOS PELA TÉCNICA IFI (CEVDI)

Diluições para Serologia



- 1 - Colocar nos poços as quantidades indicadas na figura
- 2 - Passar 100 ul do primeiro poço para o 2º e assim sucessivamente de acordo com as diluições pretendidas
- 3- Colocar as respectivas diluições nos poços correspondentes da Lâmina de imunofluorescência

ANEXO IV:

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA:



Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS)
Departamento de Patologia e Imunologia Molecular (PIML)

Laboratório de Imunogenética
Kit de extracção de DNA PUREGENE_Gentra

Rendimento esperado: 5-15ug de DNA

Para amostras de 300 μ L de sangue com EDTA

I. Antes de iniciar a extração, rotular devidamente dois tubos eppendorf de 1,5 ml para cada amostra.

Lise Celular

1. Adicionar 900ul **RBC Lysis solution** a um dos tubos eppendorf de 1,5 ml.
2. Adicionar 300uL de sangue total (tubos homogeneizados) ao eppendorf anterior e incubar 1 min á temperatura ambiente. Inverter suavemente 10 vezes durante a incubação.

Nota: Para sangue fresco, colhido em 1 h, o tempo de incubação aumenta para 3 min para assegurar a lise completa das células vermelhas do sangue.

3. Centrifugar durante 20s a 13000-16000g. Remover o máximo de sobrenadante possível com uma pipeta Pasteur, aproveitando o pelet de células vermelhas e cerca de 10-20 ul de sobrenadante residual.
4. Vortexar vigorosamente durante 10 s para ressuspensão das células no líquido residual(o pelet celular não deve ser visível após vortex).
5. Adicionar 300ul de **Solução de Lise Celular** às células ressuspendidas pipetando para cima e para vbaixo de forma a promover a lise das células.

As amostras ficam estáveis nesta solução a 4°C pelo menos por 18 meses.

Precipitação proteica

6. Adicionar 100ul de **Solução de Precipitação de Proteína** ao lisado celular
7. Vortexar vigorosamente durante 20s para misturar uniformemente a solução com o lisado celular
8. Centrifugar a 13000-16000g durante 1 min. As proteínas precipitadas formam um pelet compacto castanho escuro.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA:

Se o pelet não estiver compacto repetir o passo 6, seguindo-se uma incubação em gelo durante 5 min e repetição do passo 7.

Precipitação do DNA

8. Transferir o sobrenadante que contém o DNA, para um eppendorf 1,5 ml novo contendo 300ul de isopropanol a 100%
9. Misturar a amostra por inversão suave cerca de 50 vezes.
10. Centrifugar a 13000-16000g durante 1 min. O DNA torna-se visível como um pequeno pelet branco.
11. Desprezar o sobrenadante secando o tubo num papel absorvente limpo. Adicionar 300ul de Etanol a 70% invertendo o tubo várias vezes de forma a lavar o pelet de DNA.
12. Centrifugar a 13000-16000g durante 1 min; Desprezar o etanol por inversão (com cuidado para não perder o pelet).
13. Secar o tubo num papel absorvente limpo durante 5s.

Hidratação do DNA

14. Adicionar 100ul de **Solução de Hidratação do DNA** (corresponde a uma solução de 100 ug/ml para um rendimento for de 10ug)
15. Vortexar durante 5 s para misturar.
16. Incubar a amostra a 65°C durante 5 min de forma a acelerar a reidratação.
17. Vortexar durante 5s e fazer um “spin-down” na microcentrífuga para que toda a amostra fique no fundo do tubo
18. Armazenar a 4°C. Para um longo período de conservação, congelar a – 20°C.

Nota: O DNA pode ser usado, logo após a extracção

ANEXO V:

PROTOCOLO DE PCR PROGRAMAS DO TERMOCICLADOR (CEVDI)

- *Anaplasma phagocytophilum*

1ª reacção: primers HS1/HS6		
Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
120	95	1
60	94	3
120	48	
90	70	
60	88	37
120	52	
90	70	
300	68	1

2ª reacção: primers HS43/HS45		
Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
120	95	1
60	94	3
120	48	
90	70	
60	88	37
120	55	
90	70	
300	68	1

- *Ehrlichia canis*

1ª reacção: primers ECC/ECB		
Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
180	94	1
60	94	40
120	45	
30	72	
300	72	1

2ª reacção: primers HE3/HCS		
Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
180	94	1
60	94	40
120	55	
15	72	
300	72	1

PROGRAMAS DO TERMOCICLADOR (CEVDI)

- *Rickettsia conorii*

1ª reacção: primers Omp B OR/Omp B OF		
Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
180	94	1
30	94	34
30	54	
90	72	
42	72	1

2ª reacção: primers Omp B IF/Omp B IR		
Tempo (segundos)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
180	94	1
30	94	34
30	56	
90	72	
42	72	1

ANEXO VI:

PROTÓCOLO DE PURIFICAÇÃO DE PRODUTO DE PCR (JetQuick, Genomed)

1. A garrafa da solução H2 contém uma solução concentrada de tampão. Antes de começar o procedimento, adicionar 140ml de etanol (96-100%) à solução H2, por forma a reconstituí-la conforme indicado na garrafa.
2. Adicionar 200µl da solução H1 a 50µl do produto de PCR e misturar bem. É importante que o volume do produto de PCR não exceda 100µl. Fazer a mistura, em caso de várias amostras, 1 a 1.
3. Colocar uma coluna Jetquick® spin num tubo de 2ml.
4. Colocar a mistura da etapa 1 na coluna preparada. Centrifugar a mais de 12000g durante 1 minuto.
5. Descartar o sobrenadante.
6. Re-inserir a coluna no tubo vazio e adicionar 250µl da solução H2 reconstituída. Centrifugar a mais de 12000g durante 1 minuto.
7. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna Jetquick® novamente no tubo vazio. Centrifugar na velocidade máxima durante 1 minuto. A solução residual H2 não será completamente removida a menos que o sobrenadante seja descartado antes desta centrifugação adicional. A solução H2 contém etanol, e o etanol residual pode interferir com as reacções subsequentes. A centrifugação adicional assegura que nenhum etanol residual é transportado para a próxima etapa do protocolo.
8. Colocar a coluna Jetquick® spin num novo tubo “eppendorf” de 1,5ml e adicionar 25µl de água estéril (ou tampão TE ou 10mM Tris/HCl, pH 8,0) directamente no centro da matriz de sílica da coluna Jequick® spin. Centrifugar a mais de 12000g durante 2 minutos. Importante: podem-se obter maiores concentrações de DNA na eluição se a mesma se fizer com apenas 30µl de tampão de eluição. Neste caso, pré-aquecer o tampão a 65-70°C, adicioná-lo directamente no centro da matriz de sílica da coluna e deixar repousar durante 1 minuto antes da centrifugação. Assegurar que o tampão de eluição é dispensado directamente na membrana de sílica. O préaquecimento do tampão é recomendado quando os fragmentos de PCR a eluir, são maiores que 5kb.
9. O DNA eluído em água deverá ser armazenado a -20°C.

ANEXO VII:
PROTOCOLO DE SEQUENCIAÇÃO (CEVDI)

1- Em sala própria, preparar uma master mix para cada primer do par a usar na sequenciação atendendo às seguintes proporções e sabendo que o volume total da solução representa a multiplicação dos constituintes pelo número total e amostras:

Reagentes:	Volume (μ l):
Água estéril	4
Tampão do Big dye	3,3
Big dye	0,7
Primer (a 3,2 pmol/ μ l)	1

2- Distribuir 9 μ l da solução de cada primer pelos tubos de PCR.

3- Fora da sala de preparação da master mix, caso necessário, acertar a concentração DNA alvo para o valor ideal de 12 ng / μ l usando água estéril.

4- Aplicar a 1 μ l do DNA alvo em cada um dos dois tubos que contêm a solução de cada primer do par.

5- Colocar os tubos no termociclador e programar a reação de sequenciação:

25x 96°C 10 sec

50°C 5 sec

60°C 4min

6- Após a reação de sequenciação as amostras são encaminhadas para a Unidade Laboratorial de Utilização Comum no INS.

ANEXO VIII:

PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE ANAPLASMA (*A. phagocytophilum*), EHRLICHIA (*E. canis*) E RIQUETTIA (*R. conorii*) (CEVDI)

NOTA: Todo o processo é feito em câmara de fluxo laminar.

A. Preparação de tubos Shell-vial com células DH82 para isolamento de *Ehrlichia canis* e com células Vero E6 para isolamento de *Rickettsia conorii*.

- Preparar os tubos de shell-vial com a linha celular desejada

1 Dia antes da realização do isolamento.

Inoculação dos frascos de Shell Vial

- 1- Colocar o Buffy Coat (glóbulos brancos) no frasco de shell-vial com ajuda de uma pipeta estéril e sempre com o cuidado extremo para evitar contaminações.
- 2- Centrifugar os tubos 45 min a 5000 rpm
- 3- Descartar o sobrenadante, vertendo o frasco directamente num recipiente e caso fiquem muitos glóbulos vermelhos no fundo do frasco, lavar com 2 ml de meio e descartar novamente.
- 4- Colocar 2 ml de meio MEM (**SEM** antibiótico) em cada frasco.
- 5- Colocar na estufa 32°C durante 5 dias
- 6- Ao 5º dia com a ajuda de esferas de vidro ou de uma pipeta raspar as células do shell-vial e passar todo o conteúdo para frascos de células de 25cm³ (Estes frascos são preparados 24 a 48h antes).
- 7- Deixar adsorver 20 min na estufa e colocar 3-5ml meio novo.
- 8- Incubar a 32°C durante 5-6 dias.
- 9- Fazer o controlo da infecção do frasco pela técnica de coloração de Giménez ou imunofluorescência indirecta.
- 10- Se o isolamento for positivo, devem ser feitos 2 inóculos congelados a – 80°C e uma nova propagação do isolado num frasco novo.
- 11- Posteriormente, e do novo frasco de inóculo crescido deve ser retirada uma aliqota para extracção de DNA e caracterização da estirpe.

B. Isolamento de *Anaplasma phagocytophilum*

Inocular 0,1 a 0,5 ml de sangue total ou buffy-coat anticoagulado directamente numa cultura de células HL60. A cultura deve ser mantida a 37°C com uma atmosfera de 5% CO₂ e ser avaliada cada 2 a 4 dias para confirmar o isolamento do agente (observação das células após coloração com Giemsa) e manter a concentração celular ideal de 2 a 4 x10⁵ células/ml.

ANEXO IX:

PROTÓCOLOS DE COLORAÇÕES E SOLUÇÕES

Coloração de Gimenez (visualização de rickettsias)

1. Raspar com uma ansa a camada do frasco de células e colocar num poço de Lâmina de Teflon.
2. Deixar secar a Lâmina.
3. Fixar a lâmina à chama e corar com a solução de coloração (Fucsina Básica e Tampão fosfato).
4. Cobrir os poços com a solução de coloração durante 3-5 min.
5. Lavar em água corrente.
6. Colocar o verde de malaquite durante 30s e lavar em água corrente
7. Repetir o último passo.
8. Deixar secar
9. Ver ao microscópio com lente de imersão.

Solução de FUCSINA

Fucsina básica	10g
Etanol al 95%	100ml
Fenol, solución acuosa al 4%	250ml
Agua destilada	650ml

Incubar esta solução durante 48h a 37°C antes de usar. Conserva-se a 37°C por mais de 10 meses.

Solução TAMPÃO FOSFATO 0.2 M

- a. Na_2HPO_4 2.84g em 100ml de água destilada.
- b. NaH_2PO_4 2.76g em 100ml de água destilada.

Solução de Trabalho TAMPÃO FOSFATO 0.1 M pH 7.45

NaH_2PO_4 0.2 M	3.5ml
Na_2HPO_4 0.2 M.	15.5ml
Agua destilada	19ml

PROCOLOS DE COLORAÇÕES E SOLUCÕES

Solução de Coloração

Solução de Fucsina 3ml
Solução de Tampão fosfato 0.1M 10.5ml

NOTA: Esta Solução deve ser filtrada (papel filtro Whatman nº2 ou filtro 0.45 µm) antes de usar

Solução de Verde Malaquite

Verde malaquite oxalato....0.8g
Água destilada.....100ml

Coloração de Giemsa (visualização de ehrlichias em esfregaço sanguíneo e culturas)

Coloração realizada com corante rápido Diff-Quick (Medion Diagnostics GmbH, segundo as instruções do fornecedor.

Este kit é composto por três corantes.

- 1 - Fixar a lâmina 30 s em metanol
- 2 – Mergulhar a lâmina 5x no corante eosina
- 3 – Mergulhar a lâmina 5x no corante Tiazina