



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Estudo nosoparasitológico em carnívoros silvestres na região de Évora**

**Mónica Ribeiro**

Orientação: Ludovina Neto Padre

**Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

Dissertação de natureza científica

Évora, 2016

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos, sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais me sinto grata.

À Professora Ludovina Neto Padre, do departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, pela sua orientação, compreensão, apoio, paciência, conselhos, disponibilidade e palavras de incentivo, dentro e fora do estágio.

À Professora Ana Duarte, do departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade, apoio, supervisão, conhecimento partilhado e paciência, desde o primeiro contato, para a realização dos testes de qPCR, e após a conclusão dos mesmos.

À Professora Isabel Fonseca, do departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade e apoio durante e após o período de estágio em Lisboa, e por todo o cuidado, atenção e conhecimento partilhado.

A toda equipa do projeto MOVE, liderada pelo Professor António Mira, do departamento de Biologia da Universidade de Évora, com especial agradecimento a Denis Medina, Pedro Costa e Sara Santos, pela disponibilidade, simpatia e apoio na recolha dos animais e amostras necessárias para a realização desta dissertação, assim como o conhecimento partilhado, nomeadamente no tratamento dos dados estatísticos.

À Técnica Superior Maria João Vila-Viçosa, do departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, pelo apoio, disponibilidade, simpatia, incentivo e pelo imenso conhecimento e experiência partilhada, tanto a nível prático como teórico.

À Técnica Superior Clara Cartaxeiro, do departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pelo apoio, carinho, supervisão e partilha de conhecimentos ao longo do meu período em Lisboa.

Ao Professor Fernando Capela e Silva, por todo o cuidado, atenção e simpatia em tudo o que faz.

To my fiancé Clovis Connelly, for all the love, kindness and caring words throughout the whole internship, writing and presentation of this thesis dissertation. Thank you for always believing in me, especially when I didn't myself. I love you.

Ao meu irmão João Ribeiro, por confiastes em mim e sempre acreditares que chegaria aqui, pelo apoio incondicional e por saberes sempre exatamente o que me dizer naqueles dias de desespero e dúvida. Sem ti, não era só esta tese que não se realizaria... Amo-te.

Aos meus amigos, por acreditarem em mim, pelas palavras de incentivo e partilha de experiências, pelas gargalhadas e desabafos, por existirem e ficarem. Amo-vos.

Aos meus amigos e colegas do Coaching, pelas nossas sessões, conversas e partilhas, pelo apoio e incentivo, por acreditarem em mim assim como eu acredito em vós, por termos escolhido estarmos juntos nesta linda viagem que é a Vida, por me mostrarem que, embora em caminhos diferentes, juntos vamos mais longe; que embora sejamos todos diferentes, em essência somos todos iguais. Obrigada por me fazerem sentir em casa. Amo-vos.

Aos meus pais, por entre tudo o que fizeram por mim, terem incentivado a minha curiosidade perante a vida. Foi essa curiosidade que me permitiu seguir em frente e chegar aqui.

**Resumo** Estudo nosoparasitológico em carnívoros silvestres na região de Évora

O objetivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento dos parasitas presentes nos carnívoros silvestres da região de Évora em Portugal.

Foram executadas 30 necropsias parasitárias a animais mortos por atropelamento num raio de 104 km, entre Évora, Estremoz e Montemor-O-Novo. Foi colhido material para pesquisa parasitológica, paralelamente foram colhidas e conservadas por congelação 38 amostras de tecido de pavilhões auriculares para pesquisa de *Leishmania infantum* por qPCR, das cinco principais espécies de carnívoros silvestres em Portugal: *Meles meles* (texugo euroasiático), *Martes foina* (fuiinha), *Genetta genetta* (gineta), *Herpestes ichneumon* (sacarrabos) e *Vulpes vulpes* (raposa-vermelha).

Dos animais necropsiados 73,33% encontravam-se parasitados, 50% com ectoparasitas, 63,33% com parasitas gastrointestinais e 13,33% com parasitas pulmonares.

Nas amostras para a pesquisa de *L. infantum* não foram observados resultados positivos.

Concluiu-se serem necessários mais estudos aumentando o volume de amostras de forma a oferecer resultados estatisticamente representativos da diversidade parasitológica nos carnívoros silvestres da região.

**Palavras-chave:** Carnívoros, Évora, Necrópsia, *Leishmania infantum*.

**Abstract**

Nosoparasitologic study in wild carnivores in the region of Evora

The aim of this study was to increase knowledge of parasites present in wild carnivores of the Evora region in Portugal.

Thirty parasitic necropsies were executed on roadkill animals over a distance of 104 km between Évora, Estremoz Montemor-O-Novo. Material for parasitological research was collected, as well as 38 tissue samples from ear tissue, preserved by freezing for *Leishmania infantum* research by qPCR, from the five main species of wild carnivores in Portugal: *Meles meles* (Eurasian badger), *Martes foina* (beech marten), *Genetta genetta* (genet), *Herpestes ichneumon* (Egyptian mongoose) and *Vulpes vulpes* (red fox).

73.33% of the animals necropsied were parasitized, 50% with ectoparasites, 63.33% with gastrointestinal parasites and 13.33% with lung parasites.

Positive results were not observed on the samples for *L. infantum* research.

The study found the need for larger samples volumes in order to provide statistically representative results of the parasitological diversity in wild carnivores in the region.

**Keywords:** Carnivores, Évora, Necropsy, *Leishmania infantum*.

**Índice geral:**

1. Introdução.....	1
1.1 A Importância do estudo de parasitas em carnívoros silvestres.....	1
1.1.1. Papel na avaliação da homeostase dos ecossistemas.....	1
1.1.2. Agentes transmissíveis por vetores.....	1
1.1.2.1. Leishmaniose.....	2
1.1.2.1.1. Vetor biológico.....	3
1.1.2.1.2. Hospedeiros vertebrados.....	3
1.1.2.1.3. Formas de leishmaniose.....	3
1.1.2.1.4. Leishmaniose em Évora.....	4
1.1.2.1.5. Diagnóstico.....	5
1.1.2.1.5.1. Serologia.....	5
1.1.2.1.5.2. Citologia, histopatologia e cultura.....	5
1.1.2.1.5.3. PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	5
1.2. Carnívoros silvestres da região de Évora.....	6
1.3. Os parasitas dos carnívoros silvestres.....	11
1.3.1. Filo Nematelminthes.....	11
1.3.1.1. Classe Nematoda.....	11
1.3.1.1. Subclasse Secernentea.....	12
1.3.1.1.1. Ordem Strongylida.....	12
1.3.1.1.1.1. Superfamília Ancylostomatoidea/ Strongyloidea.....	13
1.3.1.1.1.1.1. Família Ancylostomatidae.....	13
1.3.1.1.1.2. Superfamília Metastrongyloidea.....	13
1.3.1.1.1.3. Superfamília Trichostrongyloidea.....	14
1.3.1.1.2. Ordem Rhabditida.....	15

1.3.1.1.2.1. Superfamília Rhabditoidea.....	15
1.3.1.1.2.1.1. Família Strongyloididae.....	15
1.3.1.1.2.1.1.1. Género <i>Strongyloides</i> .....	15
1.3.1.1.3. Ordem Spirurida.....	16
1.3.1.1.3.1. Superfamília Spiruroidea.....	16
1.3.1.1.3.1.1. Família Physalopteridae.....	16
1.3.1.1.3.1.1.1. Género <i>Physaloptera</i> .....	16
1.3.1.1.3.1.2. Família Spiruridae.....	16
1.3.1.1.3.1.2.1. Género <i>Spirura</i> .....	17
1.3.1.1.3.2. Superfamília Filarioidea.....	17
1.3.1.1.3.2.1. Família Onchocercidae.....	17
1.3.1.1.3.2.1.1. Género <i>Dirofilaria</i> .....	17
1.3.1.1. Subclasse Adenophorea.....	18
1.3.1.1.1. Superfamília Trichuroidea.....	18
1.3.2. Filo Platyhelminthes.....	19
1.3.2.1. Classe Cestoda.....	19
1.3.2.1.1. Ordem Cyclophyllidea.....	19
1.3.3. Filo Arthropoda.....	20
1.3.3.1. Classe Insecta.....	20
1.3.3.1.1. Ordem Phthiraptera.....	20
1.3.3.1.1.1. Subordem Malophaga.....	20
1.3.3.1.2. Ordem Siphonaptera.....	20
1.3.3.2. Classe Arachnida.....	21
1.3.3.2.1. Família Ixodidae.....	21

1.3.3.2.2. Família Psoroptidae.....	22
1.3.3.2.2.1. <i>Otodectes</i> .....	22
2. Objetivos .....	22
3. Materiais e métodos.....	22
3.1. Projeto MOVE.....	22
3.2. Necrópsia parasitária.....	23
3.2.1. Material.....	23
3.2.2. Técnica.....	24
3.3. Análise das amostras.....	25
3.3.1. Técnicas de coprologia.....	25
3.3.1.1. Método de flutuação espontânea de <i>Willis</i> .....	25
3.3.1.2. Sedimentação espontânea <i>Hoffman-Pons-Janer</i> .....	27
3.3.2. Técnica de esfregaços.....	27
3.3.2.1. Coloração de <i>Giemsa</i> .....	27
3.3.3. Técnica de PCR <i>real time</i> .....	29
4. Resultados e discussão.....	30
4.1. Necropsias.....	30
4.1.2. Ectoparasitas.....	34
4.1.2.1. Classe Arachnida.....	34
4.1.2.1.1. Família Ixodidae.....	34
4.1.2.1.1.1. Género <i>Rhipicephalus</i> .....	34
4.1.2.1.1.2. Género <i>Ixodes</i> .....	34
4.1.2.1.1.3. Género <i>Dermacentor</i> .....	35
4.1.2.1.2. Família Psoroptidae.....	35
4.1.2.2. Classe Insecta.....	35
4.1.2.2.1. Ordem Diptera.....	35

4.1.2.2.2. Ordem Siphnaptera.....	35
4.1.2.2.3. Ordem Phthiraptera.....	37
4.1.3. Endoparasitas.....	42
4.1.3.1. Nematodas pulmonares.....	43
4.1.3.2. Parasitas gastrointestinais.....	45
4.1.3.2.1. Nematoda.....	46
4.1.3.2.2. Cestoda.....	48
4.1.3.2.2.1. Género <i>Taenia</i> .....	49
4.1.3.2.2.2. Género <i>Mesocostoides</i> .....	49
4.1.3.2.3. Apicomplexa.....	49
4.2. Técnicas de coprologia.....	50
4.3. Esfregaços de medula óssea para pesquisa de <i>Leishmania infantum</i> .....	50
4.4. PCR <i>real-time</i> .....	51
5. Conclusões.....	55
6. Bibliografia.....	56
7. Anexos.....	a



**Índice de gráficos e tabelas:**

Gráfico 1: Número de animais recolhidos para necropsia parasitária, por estação do ano.

Gráfico 2: Número de animais parasitados por estação do ano.

Gráfico 3: Resultados das necropsias parasitárias realizadas durante a estação da Primavera.

Gráfico 4: Resultados das necropsias parasitárias realizadas durante a estação de Verão.

Gráfico 5: Resultados das necropsias parasitárias realizadas durante a estação de Outono.

Gráfico 6: Resultados das necropsias parasitárias realizadas durante a estação de Inverno.

Gráfico 7: Espécie de ectoparasitas por número total de animais.

Gráfico 8: Diversidade de endoparasitas.

Gráfico 9: Nematodas pulmonares.

Gráfico 10: Presença de parasitas gastrointestinais.

Gráfico 11: Análises parasitológicas positivas para parasitas gastrointestinais.

Gráfico 12: Formas parasitárias gastrointestinais identificadas nos animais necropsiados.

Tabela 1: Nematodas identificados no texugo Euroasiático, segundo Torres *et al.*, 2001.

Tabela 2: Helmintes identificados na fuinha, segundo Ribas *et al.*, 2004.

Tabela 3: Helmintes identificados na lontra, segundo Torres *et al.*, 2004.

Tabela 4: Frequência de animais parasitados por estação do ano e grupo de parasitas.

Tabela 5: Frequência de animais com ectoparasitas.

Tabela 6: Número absoluto e relativo de hospedeiros com ectoparasitas, por espécie de carnívoro silvestre.

Tabela 7: Comparação de resultados entre o presente trabalho com outros estudos realizados.

Tabela 8: Comparação de resultados entre o presente trabalho com outros estudos realizados, relativamente aos hospedeiros.

Tabela 9: Comparação de resultados entre o presente trabalho com outros estudos realizados, relativamente aos endoparasitas.

Tabela 10: Comparação de resultados entre o presente trabalho com outros estudos realizados, relativamente aos nematodas pulmonares.

Tabela 11: Resultados referentes aos Nematoda gastrointestinais. GI: gastrointestinais.

Tabela 12: Resultados referentes aos Cestoda. GI: gastrointestinais.

## Índice de figuras

Figura 1: Mapa da prevalência da leishmaniose canina em Portugal.

Figura 2: Distribuição geográfica dos cadáveres de carnívoros silvestres recolhidos e cedidos pelo projeto MOVE.

Figura 3: Flutuação espontânea *Willis* – a amostra de fezes emulsionada com a solução saturada é colocada num tudo de ensaio até formar um menisco, o qual é coberto com uma lamela (10-15min).

Figura 4: Flutuação espontânea *Willis* – lamela colocada sobre lâmina para observação ao microscópio ótico.

Figura 5: Coloração de *Giemsa* – fixação com álcool metílico (5min).

Figura 6: Coloração de *Giemsa* – aplicação da solução de *Giemsa* diluída (15-30min).

Figura 7: Coloração de *Giemsa* – secagem das preparações, depois de lavadas, à temperatura ambiente.

Figura 8: *Pulex irritans*.

Figura 9: *Ctenocephalides canis*.

Figura 10: *Trichodectes canis*.

Figura 11: Ovo tipo estrangilo em raposa, com uma ampliação de 100X.

Figura 12: Ovo *Trichuris* sp. em texugo, com uma ampliação de 100X.

Figura 13: Oocisto em lontra, com uma ampliação de 1000X.

Figura 14: Resultados do PCR real time de 38 amostras de tecido do pavilhão auricular de carnívoros silvestres.

Figura 15: Curva *standard* de amplificação.

Figura 16: Controlos positivos do qPCR.

Figura 17: Controlos negativos do qPCR.

## 1. Introdução

### 1.1. A Importância do estudo de parasitas em carnívoros silvestres:

#### 1.1.1. Papel na avaliação da homeostase dos ecossistemas:

Devido, direta ou indiretamente a atividades humanas, a biodiversidade do nosso planeta é cada vez menor, a fragmentação e destruição de habitats maior (Aguirre 2009a, Aguirre AA & Tabor GM 2008), assim como as alterações climáticas e os níveis de intoxicação ambiental por acumulação de poluentes (Aguirre 2009a, Aguirre AA & Tabor GM 2008), que, em conjunto com o rápido processo de globalização, contribuem para a diminuição da funcionalidade dos ecossistemas. Em consequência, hoje estamos perante níveis de doenças emergentes sem precedentes (Aguirre 2009a), devido a alterações na sua forma de transmissão ou à invasão de novas espécies e agentes patogénicos (Aguirre AA & Tabor GM 2008), as quais representam uma ameaça para a sobrevivência e prosperidade da biodiversidade (Aguirre 2009a).

Sob *stress*, a resiliência natural de um dado ecossistema é prejudicada e as barreiras à transmissão de doenças são reduzidas (Aguirre 2009a). Assim, segundo Aguirre (2009a), a emergência, reemergência e redistribuição de doenças infecciosas são sinais óbvios de um planeta em deterioração, sendo as alterações antropogénicas (aquecimento global, crescimento populacional, deflorestação, globalização, comércio de espécies selvagens, poluição dos oceanos e fontes de água doce) o fator primário. Enquanto estas alterações antropogénicas continuarem a crescer, a pressão que exercem sobre os ecossistemas também continuará a aumentar (Aguirre 2002, Tabor GM *et al.* 2001). O resultado será a continuação do aparecimento de novos agentes patogénicos, partilhados entre os animais silvestres, domésticos e humanos (Aguirre 2002, Tabor GM *et al.* 2001).

#### 1.1.2. Agentes transmissíveis por vetores:

Entre os agentes patogénicos, os transmissíveis por vetores requerem uma atenção especial, uma vez que, segundo Aguirre (2009a), seres oportunistas com rápida taxa de reprodução, tais como insetos, roedores e microrganismos, têm o poder de colonizar os ecossistemas sob *stress* mais rapidamente. Otranto *et al.* (2009a), referem mesmo que não há limites para a distribuição de artrópodes e outros vetores de doenças caninas, em termos geográficos, devido aos variados fatores mencionados. Por estes vetores serem sensíveis às alterações climáticas, a distribuição e o número de vetores também é afetado, no entanto, Aguirre (2009a) lembra que este não é o único fator. Como exemplo, Aguirre (2009a) refere a Leishmaniose no continente americano, cujo agente, *Leishmania braziliensis*, tem sido altamente correlacionada com a deflorestação e aumento da “invasão” humana no terreno.

Otranto *et al.* (2009a), reforçam esta ideia, referindo que as alterações climáticas e ecológicas assim como a globalização, com a consequente movimentação de pessoas e aumento das trocas

comerciais de diversos produtos (Shaw 2005 referido em Otranto *et al.* 2009a) e dinâmica das populações animais (migrações) estão entre os diversos fatores que favoreceram a distribuição, introdução ou reintrodução e estabelecimento de “novas” espécies de vetores e agentes patogénicos em áreas geográficas anteriormente livres de doença (não endémicas). Como exemplos da mudança dos padrões de distribuição de doenças caninas transmitidas por vetores, Otranto *et al.* (2009a), referem a presente distribuição da leishmaniose canina e dirofilariose em Itália. Com base em estudos retrospectivos até ao ano de 1989 e mais recentemente de 1999 a 2009, os autores demonstraram que a espécie *Dirofilaria immitis*, anteriormente localizada principalmente no Norte de Itália, ao longo do vale do rio Po, e a espécie *Leishmania infantum*, anteriormente localizada principalmente no centro e sul de Itália e na Ilha Sicília e Sardenha, têm alterado os seus padrões de distribuição, aparecendo em áreas anteriormente não-endémicas (Otranto *et al.* 2009a, Cassini 2008 referido por Otranto *et al.* 2009a). De tal forma foram os seus padrões de distribuição alterados, que esta anterior divisão entre Itália norte (endémica para a dirofilariose) e Itália centro-sul (endémica para a leishmaniose) praticamente desapareceu (Otranto *et al.* 2009a). Os autores deste estudo defendem que a causa desta alteração na distribuição destes dois parasitas se deve a variados fatores biológicos e ecológicos, incluindo fatores relacionados com a distribuição e introdução de novas espécies de vetores, tal como o mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*), um competente vetor para *Dirofilaria immitis*.

Um outro fator a ter em conta, são os cães asilvestrados que, segundo Brickner (2002) e Green & Gibson (1994), são os canídeos “selvagens” mais dispersos geograficamente. São cães que fugiram ou foram abandonados muito jovens ou são cães anteriormente vadios que se deslocaram para um habitat selvagem. Estes cães podem ter um impacto significativo sobre o ambiente natural nas proximidades.

Ainda acerca da distribuição de doenças transmitidas por vetores, os autores Otranto *et al.* (2009a), Root *et al.* (2003), Khasnis & Nettleman (2005) e Purse *et al.* (2005), referidos por Otranto *et al.* (2009a), afirmam que a distribuição de vetores, e os agentes patogénicos que estes transmitem, para áreas anteriormente não-endémicas, pode ser favorecida e facilitada pela preferência de hospedeiros não-específica por parte dos artrópodes. Assim como pelo seu ciclo de vida no hospedeiro e no ambiente, pelos seus hábitos alimentares, pela presença de hospedeiros competentes e adaptabilidade a diferentes condições ambientais.

#### 1.1.2.1. Leishmaniose:

A leishmaniose é causada por protozoários bifásicos do género *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*, classe *Kinetoplasta*. Estes parasitas afetam tanto o Homem, como os animais domésticos e silvestres, com uma distribuição cosmopolita (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

#### 1.1.2.1.1. Vetor biológico:

Este género de protozoários é transmitido através de um vetor díptera da subfamília Phlebotominae (família Psychodidae) do género *Phlebotomus* sp. no Velho Mundo (Europa, Médio Oriente e Ásia) e do género *Lutzomyia* sp. no Novo Mundo (continentes americanos). Estes vetores são de pequenas dimensões, geralmente não excedendo os 3mm de comprimento, e raramente se movimentando em raios superiores a 1km do seu local de emergência. Na região mediterrânica e na Ásia os vetores encontram-se em maior atividade nos meses mais quentes, desde a Primavera a finais de Outono, nomeadamente durante as horas crepusculares e noturnas. Os vetores infetam-se através da ingestão de formas amastigotas de *Leishmania* spp., na sua alimentação telofágica a partir de um hospedeiro vertebrado infetado. No vetor, as formas amastigotas do protozoário libertam-se das células do hospedeiro e sofrem uma série de alterações morfológicas, no intestino do flebotomíneo, até adquirirem a sua forma promastigota (forma extracelular, flagelada e procíclica), a qual é replicada. Estas formas realizam uma migração anterior até às glândulas salivares do vetor, onde chegam sob a forma (metacíclica) infecciosa. Quando o flebotomíneo (fêmea) realiza uma nova alimentação num hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são inoculadas conjuntamente com os componentes salivares do vetor. Após esta inoculação os protozoários são fagocitados pelos macrófagos do hospedeiro vertebrado, onde perdem o seu flagelo e readquirem a sua forma amastigota (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

#### 1.1.2.1.2. Hospedeiros vertebrados:

Teoricamente, qualquer mamífero pode ser incluído no ciclo de vida deste protozoário, desde que este seja inoculado através de um vetor infetado. Nestes hospedeiros, as formas amastigotas do protozoário podem ser observadas em células fagocitárias, nomeadamente em macrófagos. São formas não flageladas, ovóides com dimensões de 2,5 a 5µm de comprimento e 1,5 a 2µm de largura. São formas onde é observável um núcleo basofílico, após uma coloração *Giemsa*, e uma pequena forma redonda mais escura, o cinetoplasto. Nos macrófagos, as formas amastigotas replicam-se por fissão binária continuamente, até à rutura da célula do hospedeiro. Uma vez no espaço extracelular, as formas amastigotas livres infetam outras células, onde continuam a sua replicação, disseminando-se desta forma a partir do seu local de inoculação. As formas livres amastigotas viajam por todo o corpo do hospedeiro, mas a sua migração ocorre principalmente através do sistema hemolinfático (linfonodos, baço, medula óssea e fígado) (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

Os hospedeiros reservatório variam de acordo com a região geográfica e podem incluir animais domésticos (cães) ou silvestres (lobos e raposas). Estes podem permanecer subclínicos por períodos extensos de tempo, durante o qual permanecem como fontes de infeção para os vetores (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

Outras vias de infeção, menos comuns, entre estes hospedeiros, são a via transplacentária (Boggiatto *et al.*, 2011; Dey & Singh, 2006; CAPC, 2014), venérea (Silva *et al.*, 2009; Dey & Singh,

2006; CAPC, 2014), por transfusão sanguínea (Dey & Singh, 2006; Freitas *et al.*, 2006; CAPC, 2014) e por contato direto entre lesões (CAPC, 2014).

#### 1.1.2.1.3. Formas de leishmaniose:

Existem cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania*. por todo o mundo, das quais 20 são responsáveis pela leishmaniose humana. A maioria das espécies são zoonóticas, com apenas algumas exceções estritamente antropogénicas (ex.: *Leishmania donovani*). A leishmaniose humana é endémica em 88 países, afetando principalmente populações residentes em áreas rurais e suburbanas, com poucos meios de subsistência. Esta é dividida em três formas, de acordo com as manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

A leishmaniose causada pela espécie *L. infantum* origina formas da doença mais graves, sendo frequente em cães domésticos (leishmaniose canina) e menos comum em gatos. O cão doméstico é também o principal hospedeiro reservatório para a leishmaniose canina e LV humana em todo o mundo. Tal é facilitado através do turismo internacional, imigração e importação destes animais, os quais podem originar focos da doença em zonas não endémicas. Os principais hospedeiros reservatório para a LC e LMC em humanos são os roedores e outras espécies de animais silvestres (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

#### 1.1.2.1.4. Leishmaniose em Évora:

Évora é uma região endémica para a leishmaniose canina, com uma prevalência de 9,4% em 1999/2000 (figura 1) (Semião-Santos *et al.*, 1995; ONLeish). Segundo os dados da ONLeish, a prevalência da leishmaniose canina tem vindo a aumentar ao longo dos anos em Portugal continental, havendo alguns focos endémicos com prevalências de 20% e seroprevalências de 60 a 80%. No entanto, segundo os autores Schallig *et al.* (2013), Évora tem apresentado uma diminuição dos valores de seroprevalência de leishmaniose canina. Este estudo retrospectivo (1990-2010) revela que entre 1990 e 1999 houve um aumento nos valores de seroprevalência, de 3,9% (4,9% nas áreas urbanas e 3,2% nas áreas rurais) para 9,4% (10,1% nas áreas urbanas e 8,8% nas áreas rurais). Contudo, em 2010 o estudo revelou uma diminuição significativa, para o valor de 5,6% (3,3% nas áreas urbanas e 7,6% nas áreas rurais).

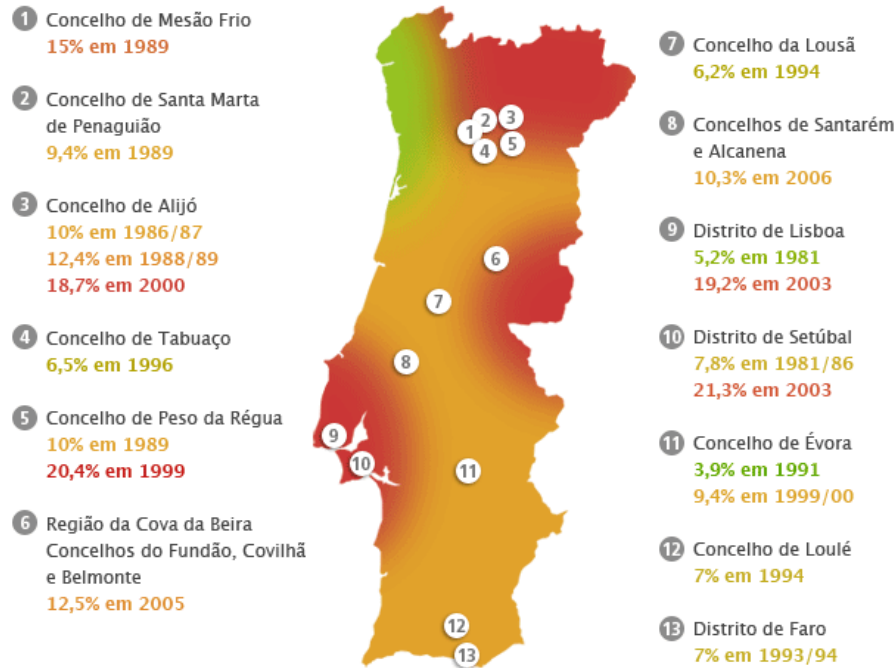


Figura 1: Mapa da prevalência da leishmaniose canina em Portugal.

Fonte: ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses.

#### 1.1.2.1.5. Diagnóstico:

Geralmente o diagnóstico para a leishmaniose, em veterinária, realiza-se em cães que demonstrem sinais clínicos e/ou alterações nas análises de rotina (hemograma e bioquímicas) compatíveis com a doença, em cães aparentemente saudáveis de regiões endémicas como medida de rastreio, como medida de prevenção na transmissão da doença por transfusão de sangue e importação de cães para regiões não endémicas, ou no âmbito de estudos de investigação da doença. De acordo com o objetivo do diagnóstico diferentes métodos podem ser utilizados como preparações citológicas ou histopatológicas, serologia, cultura do protozoário em meio próprio, ou deteção do parasita por pesquisa de ADN (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

##### 1.1.2.1.5.1. Serologia:

O objetivo deste tipo de análise é a deteção de anticorpos anti-*Leishmania*. Nesta categoria incluem-se os testes por imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), imunocromatografia (testes-rápidos), aglutinação direta e *Western blotting*. Em termos gerais, a maioria destes testes apresenta uma boa sensibilidade e especificidade para a leishmaniose clínica (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

##### 1.1.2.1.5.2. Citologia, histopatologia e cultura:

As análises citológicas e histopatológicas baseiam-se na deteção de formas amastigotas livres ou em macrófagos, a partir de esfregaços corados. Os protozoários podem ser encontrados em



linfonodos, esfregaços por aspiração de baço, esfregaços por aposição de lesões cutâneas, esfregaços de medula óssea ou a partir de outros tecidos e fluidos corporais. A especificidade deste tipo de diagnóstico é virtualmente de 100%, dependendo do tempo despendido na análise de cada esfregaço; e a sensibilidade é de aproximadamente 80% em cães com sinais clínicos, e menor quando se tratam de cães seropositivos mas subclínicos. A identificação de formas amastigotas em seções histopatológicas de pele ou órgãos, fixadas em formol ou embebidas em parafina, é facilitada através do emprego de métodos imunohistoquímicos, como a coloração por imunoperoxidase. A cultura de *Leishmania* spp. pode ser realizada a partir de amostras de tecido, em meio *Novy-MacNeal-Nicolle* ou *Schneider's Drosophila*; ou através da inoculação em *hamsters* (Baneth & Solano-Gallego, 2012).

#### 1.1.2.1.5.3. PCR (Polymerase Chain Reaction):

Segundo Mary *et al.* (2004), em adição aos métodos convencionais microscópicos, culturais e serológicos, inúmeros testes baseados em ADN têm sido descritos, particularmente o PCR, para a identificação de *Leishmania* spp. No entanto, a sensibilidade destes testes é variável e depende da sequência escolhida e objetivo do estudo. Estas técnicas melhoraram a sensibilidade dos testes, nomeadamente em amostras sanguíneas, porém, não têm poder de aferir quantitativamente a carga parasitária. O PCR *real-time* foi desenvolvido para a quantificação da sequência-alvo, contudo, os testes realizados não possuíam sensibilidade suficiente para estes terem aplicação clínica, exceto na fase aguda da doença e sob condições experimentais. Mary *et al.* (2004), no entanto, descrevem que no seu estudo de quantificação de *Leishmania infantum*, através de PCR *real-time*, utilizou como sequência-alvo ADN cinetoplástico. Segundo os mesmos autores e segundo Baneth & Solano-Gallego (2012), estudos anteriores mostraram que métodos baseados na amplificação de ADN cinetoplástico têm maior sensibilidade, uma vez que este ADN está presente em  $10^4$  cópias por célula. A quantificação comparativa neste estudo foi realizada em amostras de tecido e de medula-óssea. Os seus resultados, embora mostrassem grande variação, tiveram uma boa correlação com o estado clínico dos pacientes, permitindo assim discriminar entre pacientes sintomáticos, não infetados e os pacientes assintomáticos. Baneth & Solano-Gallego (2012) referem ainda que, para o diagnóstico específico de leishmaniose, um PCR realizado a partir de uma extração de ADN de medula óssea, pele, linfonodos ou baço, é mais sensível e mais específico do que a partir de outro tipo de amostras.

#### 1.2. Carnívoros silvestres da região de Évora:

Os carnívoros (ordem Carnivora) que podemos encontrar em Évora são a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), pertencente à família Canidae, o sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) da família Herpestidae, gineta (*Genetta genetta*) da família Viverridae, e da família Mustelidae o texugo (*Meles meles*), lontra (*Lutra lutra*), fuinha (*Martes foina*), a doninha (*Mustela nivalis*) e o tourão (*Mustela putorius*) (Ascensão & Mira, 2006).

Segundo Aguirre (2009a), os canídeos silvestres são ótimas espécies-sentinela. Nos seus artigos, Aguirre & Tabor (2004) e Tabor & Aguirre (2004), descrevem que uma espécie-sentinela deve ser selecionada tendo em conta a sua habilidade para refletir as perturbações do ecossistema que habita. De acordo com os autores, a escolha deve basear-se na história evolutiva da espécie e nos seus atributos fisiológicos, de forma que as espécies selecionadas possam providenciar informações relevantes sobre as alterações ambientais a nível espacial, temporal e trófico. Dada a complexidade dos ecossistemas, as espécies-sentinela devem ser selecionadas de acordo e especificamente para um dado ecossistema, aquando a ocorrência de uma pandemia (Aguirre & Tabor 2004, Tabor & Aguirre 2004). Em certas situações, uma única espécie não será suficiente, tendo de se selecionar várias espécies-sentinela de modo a obter informação sobre o total impacto de uma dada doença transmitida por vectores que esteja emergente, numa dada região (Aguirre & Tabor 2004, Tabor & Aguirre 2004).

A família *Canidae*, onde se inclui a raposa, encontra-se largamente distribuída por todo o mundo e enquanto algumas espécies se encontram em risco de extinção, outras são muito comuns, como é o caso do coioite (Aguirre, 2009a). Assim sendo, espécies como o coioite desempenham um papel muito importante na gestão ambiental, em questões como a transmissão de doenças, predação de animais de produção (ex.: ovinos), caça desportiva e comércio de peles (Aguirre, 2009a). Estas espécies podem servir de sentinela para questões de saúde ambiental, no que toca à monitorização do ecossistema, mas também podem desempenhar um papel proactivo crucial na identificação de agentes patogénicos, de doenças caninas parasitárias transmitidas por vectores, potencialmente emergentes, ou ainda proporcionar uma rápida avaliação do risco após a emergência de uma doença parasitária numa dada região. O autor refere, a leishmaniose visceral, a doença de *Lyme*, a dirofilariose, hepatozoonose e anaplasiose, como exemplos de doenças transmitidas por vectores em canídeos, em que já foram identificados os agentes ou os anticorpos para esses mesmos agentes em canídeos silvestres. O autor acrescenta ainda que doenças dos carnívoros, transmitidas por vectores, têm vindo a emergir e reemergir mundialmente. Como exemplo, o autor refere novamente a Leishmaniose canina, em como esta, causada pelo agente *Leishmania infantum*, foi recentemente identificada em populações de raposas nos Estados Unidos e partes do Canadá, regiões do globo onde é considerada uma doença exótica. No mesmo artigo, Aguirre (2009a) alerta que o crescente contacto entre os animais silvestres e o Homem e seus animais domésticos, potencia a infeção de animais silvestres com novos agentes patogénicos resultando em elevada mortalidade nessas espécies, redução da sua população e até mesmo extinção das espécies silvestres locais, ao mesmo tempo que aumenta o potencial de distribuição de doenças das populações silvestres para as populações de cães domésticos (Brickner 2002, Aguirre 2009b). Além disso, carnívoros silvestres adaptados a ambientes urbanos (ex.: raposa), são hospedeiros de inúmeros parasitas, bactérias e vírus, que por sua vez podem contribuir para mortalidade dependente da densidade populacional (Brickner

2002, Aguirre 2009b). Aguirre (2009a) acrescenta que, em alguns casos estas espécies silvestres podem sobreviver à infeção e tornar-se espécies reservatório de diversas doenças, zoonóticas ou dos nossos animais domésticos, tais como a raiva, a parvovirose, a esgana canina e as sarnas (Brickner 2002, Aguirre 2009b). Estas espécies são ideais para monitorizar doenças transmissíveis por vetores (Brickner 2002, Aguirre 2009b).

Na família dos mustelídeos, o texugo euroasiático (*Meles meles*) é a espécie com maior referência bibliográfica. À semelhança da raposa-vermelha, é um dos carnívoros ibéricos passível de funcionar como reservatório de algumas doenças que podem afetar tanto animais domésticos, como outros animais silvestres ou o Homem (Rosalino, 2008). Da família *Mustelidae*, é o único predador ibérico que apresenta uma estrutura social bem definida, com a formação de grupos familiares ou clãs, que podem ter até 35 animais (Neal *et al.*, 1996; Rosalino *et al.*, 2004), facilitando o contágio inter e intra-grupos por agentes patogénicos (Rosalino, 2008). A importância do conhecimento das espécies parasitárias, que afetam as espécies silvestres, é ampliada pelo facto de alguns carnívoros, como o texugo, poderem funcionar como reservatórios de espécies que podem afetar os animais domésticos (ex. *Molineus patens* – cão, *Mastophorus muris* – gato) (Durette-Desset *et al.*, 1987 e Zajiček, 1987 ambos referidos por Rosalino, 2008), ou mesmo o Homem (ex. tuberculose bovina, *Mycobacterium bovis*) (Cosivi *et al.*, 1995 referido por Rosalino, 2008). Segundo Torres *et al.* (2001), em Espanha, num estudo a 85 animais mortos, foram identificadas 17 espécies de helmintes, incluindo três géneros cuja identificação específica não foi possível. Todos os animais estavam parasitados por, pelo menos, um helminte que, na maioria dos casos (em 12 animais), era um nematoda pertencente a uma das seguintes espécies/géneros:

<i>Aelurostrongylus pridhami</i>	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	<i>Aonchotheca putorii</i>
<i>Crenosoma melesi</i>	<i>Mastophorus muris</i>	<i>Molineus patens</i>
<i>Capillaria plica</i>	<i>Physaloptera sibirica</i>	<i>Strongyloides</i> sp.
<i>Trichinella</i> sp.	<i>Uncinaria criniformis</i>	<i>Vigisospirura potekhina hugoti</i>

Tabela 1: Nematodas identificados no texugo euroasiático em Espanha, segundo Torres *et al.*, 2001.

De entre estas espécies, *U. criniformis* foi a espécie com maior prevalência no material analisado (62%), e *Aonchotheca putorii*, com uma distribuição geográfica de parasitismo de texugos, mais ampla. Inversamente, apenas duas espécies de cestodes foram detetadas (*Atrioaenia incisa* e *Mesocestoides* sp.). O trabalho efetuado em Portugal, por Rosalino *et al.* em 2006 (referido por Rosalino *et al.*, 2008) para analisar a relação texugos/helmintos, baseado na pesquisa coprológica, identificou um cestode (*Atrioaenia incisa* - ovos) e quatro nematodas (*Mastophorus muris* – ovos e adultos; *Molineus patens* – ovos; *Uncinaria criniformis* - ovos; e *Strongyloides* sp. - larvas) como parasitas de uma população de texugos residente na Serra de Grândola (Sudoeste de Portugal). A prevalência não foi muito elevada (62%) e as espécies do género *Strongyloides*

foram aquelas cuja deteção nos dejetos foi mais frequente. A integração destes dados, com a informação ecológica recolhida paralelamente (ex. dieta), permitiu aos autores (Rosalino *et al.*, 2005) inferir que a dieta (baseada essencialmente em insetos), o comportamento trófico (fossorial) e social (marcação olfativa dos membros do grupo social com as secreções da glândula anal) facilitam a contaminação pelos helmintes detetados. O texugo, sendo uma espécie social, vive em tocas onde o grupo familiar se junta para descansar durante o dia e onde os nascimentos ocorrem, sendo por isso facilmente afetado por alguns ectoparasitas (Rosalino, 2008). Os ectoparasitas que mais comumente afetam as populações ibéricas são pulgas (Ordem Siphonaptera), carraças (Ordem Acarina) e piolhos (Ordem Phthiraptera) (Domínguez, 2003; Pérez-Jiménez *et al.*, 1989). Para além de terem um efeito deletério direto na saúde do hospedeiro, estes parasitas podem ainda funcionar como vetores de uma variedade de endoparasitas, nomeadamente hemoparasitas (*Trypanosoma pestanae* ou *Theileria meles*) (Rosalino, 2008).

Ainda na família dos mustelídeos, um estudo realizado no sul de Itália em fuinha da espécie *Martes foina*, (Ribas *et al.*, 2004), foram identificadas 10 espécies de helmintes:

<i>Capillaria plica</i>	<i>Capillaria aerophilus</i>
<i>Aonchotheca putorii</i>	<i>Crenosoma petrowi</i>
<i>Sobolevinygylus petrowi</i>	<i>Taenia martis</i>
<i>Molineus patens</i>	<i>Oochoristica</i> sp
<i>Mesocestoides</i> sp	<i>Brachylaima</i> sp

Tabela 2: Helmintes identificados na fuinha, segundo Ribas *et al.*, 2004.

Destas, metade foram identificadas pela primeira vez nesta zona geográfica, nomeadamente os nematoda *Capillaria plica*, *Capillaria aerophilus*, *Aonchotheca putorii*, *Crenosoma petrowi* e *Sobolevinygylus petrowi*. A maioria destas espécies, incluindo o cestode *Taenia martis* e o nematoda *Molineus patens*, identificadas neste estudo, foram também identificadas noutras regiões paleoárticas (onde Portugal se inclui). O cestode *Oochoristica* sp., foi também identificado neste estudo e pela primeira vez neste carnívoro.

Um outro mustelídeo encontrado em Évora é a lontra (*Lutra lutra*). Torres *et al.*, 2004 avaliaram a fauna helmíntica de 109 lontras de França, Portugal e Espanha, incluindo 56 amostras fecais coletadas em Portugal e 23 amostras de fezes frescas de lontras em programas de reintrodução. O estudo encontrou sete espécies de helmintes:

<i>Phagicola</i> sp.	<i>Aonchotheca putorii</i>	<i>Eucoleus schvalovoj</i>
<i>Strongyloides lutrae</i>	<i>Anisakis</i> (larvas em estadio 3)	<i>Dirofilaria immitis</i>
<i>Gigantorhynchus</i> sp		

Tabela 3: Helmintes identificados na lontra, segundo Torres *et al.*, 2004.

*Eucoleus schvalovoj* foi a espécie mais frequentemente encontrada, sendo que *Strongyloides lutrae* foi a espécie com maior prevalência na península ibérica. A fauna helmíntica da lontra é geralmente menor no sudoeste europeu que na Europa de leste e, menor do que em outros mustelídeos aquáticos. O trematoda *Phagicola* sp. foi reportado pela primeira vez na Europa e neste hospedeiro. As prevalências de *E. schvalovoj* e *S. lutrae* obtidas por necrópsia foram mais elevadas que aquelas observadas através de análises coprológicas. Contudo, a cultura a partir de fezes frescas foi considerada a melhor técnica para deteção de infeção por *Strongyloides* sp. neste mustelídeo.

A gineta (*Genetta genetta*) da família dos viverrídeos, o sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) dos herpestídeos e o tourão (*Mustela putorius*) dos mustelídeos, contêm pouca informação bibliográfica específica para a espécie. No entanto, estas espécies estão geralmente incluídas em estudos semelhantes e que envolvem a ordem Carnívora, nomeadamente na Península Ibérica (Colonnello, 2010; Simões, 2009; Domínguez, 2003; Pérez-Jiménez *et al.*, 1989).

Um estudo realizado na Flórida, nos Estados Unidos da América, por Forrester (1992) e citado por Aguirre (2009a), reforça a importância dos parasitas dos animais silvestres e a sua associação com os animais domésticos e o Homem. Este estudo revelou que entre as doenças parasitárias e infecciosas identificadas, 119 eram comuns entre animais domésticos e silvestres, dessas mais de 46% eram helmintoses e 10% outras zoonoses.

É certo que os parasitas fazem parte da biodiversidade dos ecossistemas, no entanto as espécies patogénicas podem ser uma ameaça à conservação dos seus hospedeiros naturais ou novas espécies de hospedeiros (Aguirre, 2009a). É o que ocorre quando animais são retirados dos seus habitats naturais e colocados em outros habitats ou mesmo numa região diferente do mundo. A sua fauna natural é exposta a novos ambientes e hospedeiros e o seu efeito em termos de patogenicidade e epidemiologia torna-se imprevisível (Aguirre, 2009a). Um outro artigo, por Chowdhury & Aguirre (2001), complementa esta informação, referindo que quando uma população de animais silvestres é exposta a uma doença infecciosa ou parasitária emergente, a resposta por parte da espécie hospedeira pode ser a de a) resistir ao parasita, b) desenvolver sintomatologia severa de parasitismo e/ou c) adaptar-se ao novo parasita tornando-se espécie-reservatório. Quanto à fonte de exposição, Chowdhury & Aguirre (2001) referem três, 1) animais domésticos, nomeadamente o cão, sendo, segundo Pain (1997) referido por Aguirre (2009a), o principal reservatório de doenças infecciosas para os carnívoros silvestres, representando um risco significativo para estes animais e para o ser humano (Brickner 2002); Otranto *et al.* (2009b) também defendem esta ideia, uma vez que muitos artrópodes infestam cães tanto em áreas urbanas como em áreas rurais, estando adaptados a sobreviver tanto em ambientes interiores como exteriores, aumentando assim o risco de emergência e reemergência de certas doenças metazoonóticas; 2) reintrodução de animais silvestres (programas de reintrodução de espécies silvestres)

em que as possibilidades de transmissão são especialmente elevadas durante a captura, transporte e libertação desses animais e, 3) expansão de espécies de grupos taxonómicos próximos para novos habitats. No mesmo artigo, os autores explicam também que as migrações dos próprios animais silvestres podem originar a introdução de doenças exóticas nas populações animais locais, ao mesmo tempo que estas populações locais lhes podem transmitir agentes para os quais não desenvolveram resistência.

É tomando como base estes estudos que o presente projeto ganhou forma. O estudo pretende contribuir para o conhecimento dos agentes parasitários presentes nos carnívoros silvestres, as espécies-sentinela que, se encontram cada vez mais próximas dos nossos animais domésticos e do Homem, devido à pressão antropogénica sobre os ecossistemas destes animais. Este estudo irá focar-se apenas nos agentes parasitários devido à enorme diversidade de agentes patogénicos envolvidos, e porque, segundo Cunningham *et al.* (2003), os parasitas eucariotas estão entre os agentes de doenças emergentes, em animais silvestres e domésticos, mais significativos.

Em 2001, Chowdhury & Aguirre, referem que a emergência de parasitas em novos hospedeiros está a tornar-se cada vez mais evidente à medida que as técnicas de diagnóstico são melhoradas, que as interações entre humanos, vida selvagem e animais domésticos aumenta e que novos agentes são identificados.

### 1.3. Os parasitas dos carnívoros silvestres:

#### 1.3.1. Filo Nematelminthes:

##### 1.3.1.1. Classe Nematoda:

A classe inclui na sua maioria helmintes de forma tubular ou cilíndrica (Urquhart *et al.*, 1996; IASZoology.com) que são tanto de vida livre como parasitários, contendo cerca de 28000 espécies, das quais 16000 são parasitas. Estes helmintes são delgados e não-segmentados, tendo uma simetria bilateral e, a sua pele consiste num sincício coberto por uma espessa e translúcida camada, a cutícula (Urquhart *et al.*, 1996; IASZoology.com). Os nematodos possuem apenas músculos longitudinais, que se encontram entre a hipoderme e a cavidade corporal (Urquhart *et al.*, 1996; IASZoology.com). Esta última, contém líquido sobre elevada pressão, de modo a manter a forma e consistência do corpo do parasita (Urquhart *et al.*, 1996). Os órgãos são geralmente filamentosos e encontram-se em suspensão no seu interior. A locomoção é realizada através de contrações musculares alternadas entre a porção dorsal e ventral do parasita (Urquhart *et al.*, 1996). A maioria das espécies são dioicas (Urquhart *et al.*, 1996; IASZoology.com), sendo que as fêmeas são geralmente maiores que os machos, podendo libertar ovos ou larvas (Urquhart *et al.*, 1996). Nos parasitas fêmea, o intestino termina num ânus, enquanto que nos machos termina numa cloaca que

funciona como ânus, sendo também o local onde os vasos deferentes terminam e onde podem ser vivíveis as espículas copulatórias. A boca, assim como a forma do esófago, a presença ou ausência de bursa copulatória e a forma das espículas e gubernáculo no macho auxiliam na identificação do parasita. Alguns nematodas, certas espécies mais do que outras, estão propensas a entrar em hipobiose, interrupção temporária do desenvolvimento do parasita, face a determinados fatores ambientais exteriores. No hemisfério norte, a hipobiose geralmente coincide com o Outono/Inverno, quando as temperaturas são mais desfavoráveis ao desenvolvimento do parasita; ou com os períodos de seca nos climas tropicais e subtropicais. Uma vez retomadas as condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do parasita, este retoma o seu desenvolvimento. Esta é uma característica facultativa que apenas afeta uma proporção da população de parasitas. A interrupção do desenvolvimento do parasita também pode ocorrer devido à ação do sistema imunitário do hospedeiro, contudo, nesta situação, o número de parasitas afetados é muito menor. A retoma do seu desenvolvimento geralmente ocorre no período peri-parto quando a resposta imune específica contra agentes parasitários diminui. Isto parece estar associado ao aumento da hormona prolactina, pois uma vez que os níveis séricos da hormona lactogénica retomam os seus valores normais, após o período de lactação ou desmame, a resposta imunitária específica contra agentes parasitários, por parte do animal hospedeiro também retoma à normalidade. Esta relação prolactina-resposta imunitária é relevante em termos epidemiológicos, uma vez que ocorre quando há mais hospedeiros disponíveis e suscetíveis a infeção por estes nematodas e, dependendo do grau de infeção e contaminação ambiental, o número de animais clinicamente doentes, nomeadamente jovens, aumenta também (Urquhart *et. al*, 1996).

#### 1.3.1.1. Subclasse Secernentea:

Phasmids (*sensilia* unicelular na região lateral da cauda) estão presentes, geralmente posteriormente. Amphids (invaginações enervadas (sensoriais) da cutícula, geralmente na região anterior, na base dos lábios) com aberturas tipo-poro ou tipo-fenda e sempre labiais. Deirids (par de papilas sensoriais lateralmente na região cervical) presentes perto do anel nervoso. Não há glândulas hipodérmicas. Sistema excretor tubular. Não há glândulas adesivas caudais. Macho geralmente com um único testículo. Asas caudais são comuns. Papilas sensoriais cefálicas apenas e papilas caudais presentes nos machos. Quase exclusivamente nematodes terrestres, raramente presentes em água doce ou marinha (IASZoology.com).

#### 1.3.1.1.1. Ordem Strongylida:

Grupo de parasitas cujos machos se caracterizam por possuir uma bolsa copulatória. Geralmente apresentam um esófago muscular. As fêmeas tendem a libertar ovos com 4 a 8 células nas fezes do hospedeiro, embora algumas libertem ovos embrionados. Os músculos

longitudinais, que aparecem debaixo da hipoderme dos parasitas, tendem a ser poucos em número em cada quadrante. A vulva pode aparecer em qualquer local desde a área imediatamente anterior ao ânus até a meio do corpo do parasita. A parte anterior do parasita é o que o distingue entre as quatro superfamílias que constituem a ordem Strongylida (AAVP, 2014a).

#### 1.3.1.1.1.1. Superfamília Ancylostomatoidea/ Strongyloidea:

Morfologia: os parasitas desta superfamília apresentam bursa, uma grande cápsula bucal que tipicamente apresenta dentes na parte anterior ou placas cortantes e um esófago do tipo filariforme, simples e ligeiramente mais espesso posteriormente (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a). Estes parasitas podem compreender entre 1 a 3cm de comprimento (AAVP, 2014a).

Ciclo de vida: geralmente, o ciclo de vida destes parasitas é direto, ou seja, sem o envolvimento de um hospedeiro intermediário (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a). Os ovos são libertados nas fezes e desenvolvem-se e eclodem no solo, produzindo uma larva. A larva então desenvolve-se até à sua forma infetante, larva em estadio 3 (L3), que usualmente mantém a cutícula do estadio 2 (L2) como forma de proteção (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a). A infeção do hospedeiro geralmente ocorre através da pele (AAVP, 2014a). As larvas têm também a capacidade de utilizar pequenos animais vertebrados como hospedeiros paraténicos. A infeção transmamária é bastante comum na espécie *Ancylostoma caninum*, mas não se sabe até que ponto é também importante noutras espécies desta superfamília (AAVP, 2014b).

Localização no hospedeiro definitivo: os adultos são tipicamente parasitas do intestino delgado (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a).

#### 1.3.1.1.1.1.1. Família Ancylostomatidae:

Nematodas hematófagos, responsáveis por patologias significativas em mamíferos. Estes parasitas desenvolvem-se até ao estado adulto no intestino delgado do seu hospedeiro onde, com a ajuda dos seus ganchos na cápsula bucal, se fixam à mucosa e submucosa intestinal (The Free Dictionary by Farlex, 2003-2012; Catalano *et al.*, 2015).

Género mais relevante: *Uncinaria*.

#### 1.3.1.1.1.2. Superfamília Metastrongyloidea:

Morfologia: Este grupo de parasitas tende a possuir uma cápsula bucal pequena (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a) e o esófago é do tipo filariforme (Urquhart *et. al*, 1996). A bursa ou bolsa copulatória também tende a ser reduzida, por vezes a ponto de ser difícil a sua identificação (Carreno e Nadler, 2003; AAVP, 2014a).



Localização no hospedeiro definitivo: a maioria dos parasitas adultos pertencentes a esta superfamília localizam-se nas zonas adjacentes ou nos pulmões de mamíferos (Urquhart *et. al*, 1996; Carreno & Nadler, 2003). Contudo, certas espécies tomam outras localizações, tais como o sistema vascular (AAVP, 2014a), o sistema nervoso central, a musculatura de cervídeos e os seios nasais frontais (Carreno & Nadler, 2003).

Ciclo de vida: os parasitas desta superfamília apresentam, tipicamente, um ciclo de vida indireto (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a) ou heteroxeno (Carreno & Nadler, 2003). Nas fezes do hospedeiro estão presentes larvas no seu primeiro estadio de desenvolvimento (L1) que, uma vez no solo, necessitam de um gastrópode como hospedeiro intermediário (Urquhart *et. al*, 1996; Carreno & Adler, 2003; AAVP, 2014a), onde a larva continua o seu desenvolvimento até ao seu estadio infetante (L3) (AAVP, 2014a). No caso particular dos parasitas dos carnívoros, pertencentes a esta superfamília, a larva presente no molusco, pode infetar um hospedeiro paraténico, geralmente um pequeno animal vertebrado, permanecendo nos seus tecidos até que este hospedeiro (presa) seja ingerido por um carnívoro (predador). Existe ainda a possibilidade de as larvas serem capazes de infetar o seu próximo hospedeiro ainda em L1 (AAVP, 2014a).

Géneros relevantes: *Angiostrongylus*, *Aelurostrongylus*, *Sobolevingylus*, *Crenosoma*.

#### 1.3.1.1.1.3. Superfamília Trichostrongyloidea:

Morfologia: os parasitas constituintes desta superfamília são de reduzidas dimensões, com a espessura de um fio de cabelo (Urquhart *et. al*, 1996; Taylor *et. al*, 2016). Tendem a ter poucos apêndices cuticulares (Taylor *et. al*, 2016) e uma cápsula bucal muito pequena, vestigial, geralmente sem coroa ou dentes (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a; Taylor *et. al*, 2016). No entanto, certas espécies podem conter um só dente (*lancet*) (AAVP, 2014a.). O esófago é filariforme (Urquhart *et. al*, 1996). Os machos possuem uma bursa copulatória bem desenvolvida com duas espículas, as quais são utilizadas na identificação da espécie (Urquhart *et. al*, 1996; Taylor *et. al*, 2016).

Localização no hospedeiro definitivo: os adultos são tipicamente parasitas do trato alimentar (Taylor *et. al*, 2016), nomeadamente estômago e intestino delgado (AAVP, 2014a).

Ciclo de vida: à semelhança da superfamília Ancylostomatidae, o ciclo de vida destes parasitas é geralmente direto (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a; Taylor *et. al*, 2016) e não realizam migrações (Taylor *et. al*, 2016). Os ovos são libertados nas fezes e desenvolvem-se e eclodem no solo, produzindo uma larva. A larva então desenvolve-se até à sua forma infetante, larva em estadio 3 (L3), que usualmente mantém a cutícula do estadio 2 (L2) como forma de proteção (Urquhart *et. al*, 1996; AAVP, 2014a; Taylor *et. al*, 2016). A infeção do

hospedeiro geralmente ocorre através da ingestão das larvas L3 (Urquhart *et al.*, 1996; AAVP, 2014a).

Género mais relevante: *Molineus*

1.3.1.1.2. Ordem Rhabditida:

1.3.1.1.2.1. Superfamília Rhabditoidea:

A maioria dos nematodas deste grupo são de vida livre ou nematodas parasitas de pequenos vertebrados e invertebrados. Embora alguns destes nematodas de vida livre possam ocasionalmente originar problemas nos animais, apenas o género *Strongyloides* possui interesse do ponto de vista veterinário (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016).

1.3.1.1.2.1.1. Família Strongyloididae:

1.3.1.1.2.1.1.1. Género *Strongyloides*:

Morfologia: Nematodas delgados, da espessura de um cabelo, nunca ultrapassando 10 mm de comprimento. Possuem um esófago rhabditiforme (a porção anterior e posterior do esófago são mais largas) longo, que pode chegar a ocupar um terço do seu comprimento total. O útero, filamentososo, e os intestinos encontram-se enrolados um sobre o outro, lembrando uma linha de costura. A extremidade posterior possui uma ponta arredondada. Os ovos são ovais, finos e pequenos, possuindo metade do tamanho normal de um típico ovo strongilídeo (ovo de *S. westeri*, por exemplo, possui as dimensões de 35 µm x 45 µm) (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016).

Distribuição geográfica: cosmopolita (Urquhart *et al.*, 1996).

Localização no hospedeiro definitivo: intestino delgado em animais muito jovens e, no caso das aves, no ceco também (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016).

Ciclo de vida: este género é capaz de se reproduzir tanto num ciclo de vida parasitário como num ciclo de vida livre. A fase parasitária é composta apenas por fêmeas no intestino delgado do hospedeiro definitivo, onde produzem ovos embrionados por partenogénese. Em herbívoros, estes ovos embrionados são expulsos com as fezes, mas noutras espécies os ovos eclodem ainda dentro do intestino e são expulsas larvas L1. Uma vez no meio ambiente, as larvas continuam o seu desenvolvimento até à fase adulta, onde se podem seguir várias gerações de vida livre. Contudo, em certos casos, provavelmente relacionado com fatores ambientais tais como temperatura e humidade, as L3 podem tornar-se parasitárias, infetando o hospedeiro definitivo por ingestão ou penetração cutânea. Realizam uma migração via sistema circulatório venoso, passando pelos pulmões e traqueia, chegando ao intestino delgado por deglutição e onde realizam

a sua última muda para o estado adulto. Em equinos, suínos e ovinos, a infeção por via transmamária é possível. Em trabalhos experimentais, a infeção pré-natal em suínos e bovinos também foi demonstrada. O período pré-patente é de 8 a 14 dias (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016).

Epidemiologia: as larvas infetantes (L3) não apresentam cutícula e por isso encontram-se suscetíveis a condições ambientais mais extremas. Contudo, temperaturas amenas e humidade favorecem o seu desenvolvimento e a acumulação de elevados números de foras infetantes. Medidas de controlo raramente são necessárias e implicam o uso de lactonas macrocíclicas 4 a 16 dias antes do parto de forma a eliminar a transmissão transmamária (equinos, suínos e ovinos) e/ou anti-helmínticos nas duas primeiras semanas de vida como tratamento preventivo (em equídeos) (Urquhart *et al.*, 1996).

#### 1.3.1.1.3. Ordem Spirurida

##### 1.3.1.1.3.1. Superfamília Spiruroidea

Uma característica principal deste grupo é a cauda enrolada em espiral do macho. Os ciclos de vida são indiretos envolvendo artrópodes como hospedeiros intermediários (Urquhart *et al.*, 1996).

##### 1.3.1.1.3.1.1. Família Physalopteridae:

##### 1.3.1.1.3.1.1.1. Género *Physaloptera*:

Morfologia: são maiores do que a maioria dos spiruróides, atingindo 4-6 cm de comprimento. Os ovos são alongados e espessos ao nível dos pólos (Urquhart *et al.*, 1996).

Distribuição geográfica: cosmopolita (Urquhart *et al.*, 1996).

Localização no hospedeiro definitivo: estômago mamíferos e outros vertebrados (Taylor *et al.*, 2016), incluindo carnívoros (Urquhart *et al.*, 1996).

Ciclo de vida: o ciclo é típico de spiruróides, onde os ovos passam pelas fezes do hospedeiro definitivo (infetado) e se desenvolvem, até ao seu estado larvar infectante, nos hospedeiros intermediários, que são coprófagos como escaravelhos, baratas, grilos e outros insectos (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016). Vários hospedeiros paraténicos, de sangue-frio, podem estar envolvidos na transmissão do parasita. O período pré-patente é de 8-10 semanas (Taylor *et al.*, 2016).

Epidemiologia: não existe tratamento efetivo e com a ubiquidade dos hospedeiros intermédios, o controlo dos mesmos não é considerável (Urquhart *et al.*, 1996).

##### 1.3.1.1.3.1.2. Família Spiruridae:

Os nematodas desta família encontram-se principalmente ao nível do trato gastrointestinal superior, em mamíferos e aves (Taylor *et al.*, 2016).

#### 1.3.1.1.3.1.2.1. Género *Spirura*:

Morfologia: os parasitas deste género são grossos, curtos (Urquhart *et al.*, 1996), brancos, com a extremidade posterior mais larga que a anterior e, com a cauda em forma de espiral (Taylor *et al.*, 2016).

Distribuição geográfica: o parasita é endémico no Sul da Europa, África e Ásia (Urquhart *et al.*, 1996).

Localização no hospedeiro definitivo: habitam principalmente o estômago e ocasionalmente o esófago (Urquhart *et al.*, 1996).

Ciclo de vida: o ciclo é tipicamente spiruróide (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016). Os ovos desenvolvem-se até ao estado larval infetante dentro do hospedeiro intermediário (Taylor *et al.*, 2016). Os hospedeiros intermediários são coprófagos, como escaravelhos (Urquhart *et al.*, 1996). As larvas podem ser ingeridas por hospedeiros paraténicos como roedores e lagartos, onde permanecem encapsulados (Taylor *et al.*, 2016). O hospedeiro definitivo fica infetado através da ingestão de hospedeiros intermediários ou paraténicos infetados (Taylor *et al.*, 2016).

Outros géneros relevantes: *Mastophorus* e *Vigisospirura*

#### 1.3.1.1.3.2. Superfamília Filarioidea:

Esta superfamília é muito próxima da Spiruroidea, e nela os géneros possuem igualmente ciclos indiretos. No entanto, nenhum deles habita o trato digestivo e dependem de insetos como vetores para a sua transmissão (Urquhart *et al.*, 1996). Dentro desta superfamília existem diferenças biológicas. As formas mais primitivas libertam ovos que estão disponíveis para os vetores em exsudados dermais; e as formas mais evoluídas libertam larvas, as microfilárias. Estas últimas podem estar contidas dentro de uma bainha flexível, assemelhando-se a um ovo, as quais são ingeridas por insetos que se alimentam de sangue ou a partir de fluidos tecidulares (Urquhart *et al.*, 1996). Nalgumas espécies as microfilárias apenas aparecem no sangue periférico e tecidos em intervalos regulares, umas durante o período diurno, outras no período noturno (Urquhart *et al.*, 1996).

#### 1.3.1.1.3.2.1. Família Onchocercidae:

##### 1.3.1.1.3.2.1.1. Género *Dirofilaria*:

Morfologia: macroscopicamente são parasitas longos e delgados com 15-30 cm de comprimento. O macho tem uma cauda em espiral, comum aos filaróides (Urquhart *et al.*, 1996). Microscopicamente, as microfilárias no sangue não possuem bainha, e têm uma extremidade anterior afunilada e uma extremidade posterior romba (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016). Na fêmea, a vulva está localizada posteriormente ao esófago (Taylor *et al.*, 2016).

Distribuição geográfica: cosmopolita (Urquhart *et al.*, 1996).

Localização no hospedeiro definitivo: os adultos são encontrados no lado direito do coração e vasos sanguíneos adjacentes, em carnívoros e, raramente no Homem (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016).

Ciclo de vida: as fêmeas libertam microfilárias diretamente para a corrente sanguínea. Estas são ingeridas pelo hospedeiro intermediário, o mosquito (fêmea), durante a sua alimentação. O desenvolvimento das microfilárias até L3 no mosquito demora cerca de duas semanas. Após este período, as L3 encontram-se nas estruturas bucais do mosquito. O hospedeiro definitivo é infestado quando este mosquito realiza uma nova alimentação. As L3 migram pelos tecidos subcutâneos e subserosos, onde realizam duas mudas, num período de vários meses. Apenas após a última muda, o parasita entra na circulação venosa e chega ao coração. O período pré-patente tem a duração mínima de seis meses. Os adultos sobrevivem vários anos (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016).

Epidemiologia: os fatores relacionados com o hospedeiro definitivo incluem a elevada densidade populacional destes hospedeiros onde o vetor está presente, o longo período patente (mais de cinco anos) do parasita, e a falta de resposta imune contra os parasitas estabelecidos. Os fatores relacionados com o vetor incluem a ubiquidade do mesmo, a sua rápida e elevada taxa de reprodução, e o curto período de desenvolvimento das microfilárias em L3 (Urquhart *et al.*, 1996).

#### 1.3.1.1. Subclasse Adenophorea:

##### 1.3.1.1.1. Superfamília Trichuroidea:

Os membros desta superfamília são encontrados numa grande variedade de animais. A característica morfológica comum entre eles é o esófago, o qual é composto por um tubo capilar, rodeado por uma única fila de células (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016). O macho tem apenas uma espícula dentro de uma bainha, ou pode estar completamente ausente ( género *Trichinella*). Existem três famílias de interesse. A Trichuridae, onde o género *Trichuris* é encontrado no cólon e ceco de mamíferos (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016) e o género *Aonchoteca* no estômago e intestino delgado de mamíferos silvestres, como os mustelídeos (Butterworth &

Beverly-Burton, 1980; Campbell, 1991, referidos em AAVP, 2014c); a Capillaridae onde o género *Capillaria* (*Eucoleus*) se encontra presente no trato digestivo ou respiratório de mamíferos (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016). Os ovos dos géneros *Trichuris* e *Capillaria* são característicos por possuírem uma pequena saliência em ambos os pólos (Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016). Os ovos *Aonchoteca* contém uma camada externa mais escura e com uma superfície rugosa (AAVP, 2014c). A terceira família de interesse é a Trichinellidae, onde os adultos do género *Trichinella* podem ser encontrados no intestino delgado de mamíferos, e produzem larvas que rapidamente invadem outros tecidos (Urquhart *et al.*, 1996).

### 1.3.2. Filo Platyhelminthes:

#### 1.3.2.1. Classe Cestoda:

Os parasitas desta classe apresentam um corpo fino, plano, longo (tipo “fita”) e segmentado. Cada segmento contém um, por vezes dois, conjuntos de órgãos reprodutores femininos e masculinos (Urquhart *et al.*, 1996).

##### 1.3.2.1.1. Ordem Cyclophyllidea:

Quase todos os cestoda de interesse veterinário pertencem a esta ordem (Urquhart *et al.*, 1996).

Morfologia: um cestode adulto consiste em escólex (cabeça) com órgãos de fixação, um pescoço curto e não segmentado, e uma sequência de segmentos. Esta sequência é denominada por estróbilo, e cada segmento por proglótide (Urquhart *et al.*, 1996). Os órgãos de fixação do escólex são quatro ventosas localizadas lateralmente, e podem conter dentes ou ganchos. O escólex usualmente contém um rostro anteriormente, protraível, o qual, em algumas espécies, pode estar armado com uma ou mais filas de ganchos que auxiliam na fixação à mucosa. As proglótides são continuamente produzidas a partir do pescoço e tornam-se sexualmente maduros à medida que avançam no estróbilo. À medida que cada segmento matura, as suas estruturas internas vão desaparecendo e dando lugar aos proglótides completamente maduros ou grávidos, onde apenas permanecem os ovos e algumas estruturas remanescentes do útero. Os segmentos grávidos são libertos do estróbilo e expulsos com as vezes do hospedeiro, geralmente intactos. Uma vez fora do corpo, os ovos são libertos através da degradação do segmento, ou através do poro genital. Os ovos consistem num embrião (oncosfera) hexacanto (com seis ganchos), numa camada espessa, escura e estriada que envolve o embrião, denominada embriofera, e numa camada externa delicada que geralmente é perdida ainda dentro do útero (Urquhart *et al.*, 1996).

Ciclo de vida: tipicamente o ciclo é indireto, com um hospedeiro intermediário. Com algumas exceções, os adultos localizam-se no intestino delgado do hospedeiro final e os ovos são libertos

através das fezes do hospedeiro para o exterior. Quando os ovos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, a embriofera é digerida pelo suco gástrico, ativando a oncosfera. Usando os seus ganchos, o embrião penetra pela mucosa, atingindo a circulação sanguínea ou linfática, ou a cavidade corporal no caso dos invertebrados. Uma vez atingindo o seu local de preferência, a oncosfera perde os seus dentes e desenvolve-se, dependendo da sua espécie, num dos estados larvais, denominados metacestodes (cisticercos, cenuro, strobilocercos, quisto hidático, cisticercóide, tetratirídio). Quando o metacestode é ingerido pelo hospedeiro definitivo, o escólex fixa-se à mucosa e a restante estrutura é digerida, e a corrente de proglótides começa a crescer a partir da base do escólex (Urquhart *et al.*, 1996).

Famílias mais relevantes: Anoplocephalidae (género *Atriotaenia*), Mesocestoididae (género *Mesocestoides*), Taeniidae (género *Taenia*) e Listowiidae (género *Oochoristica*).

### 1.3.3. Filo Arthropoda:

#### 1.3.3.1. Classe Insecta:

##### 1.3.3.1.1. Ordem Phthiraptera:

Estes são os piolhos. Os insetos desta ordem são altamente específicos em relação ao hospedeiro, permanentemente ectoparasitas e não conseguem sobreviver sem o hospedeiro mais do que um ou dois dias. Apresentam vários tamanhos e cores, mas todos eles são achatados dorsoventralmente. A maioria das espécies é cega, no entanto algumas possuem olhos primitivos, fotossensíveis. As patas terminam em ganchos, sendo que os piolhos dos mamíferos possuem um gancho ou garra por pata (Urquhart *et al.*, 1996).

##### 1.3.3.1.1.1. Subordem Malophaga:

Estes são os piolhos, comumente referido como piolhos mastigadores devido à sua forma de alimentação. Medem apenas até 3mm e a cabeça, arredondada anteriormente, é relativamente maior que o resto do corpo (Urquhart *et al.*, 1996).

Géneros mais relevantes: *Felicola*, *Loriscola*, *Trichodectes* (Pérez-Jiménez *et al.*, 1989).

##### 1.3.3.1.2. Ordem Siphonaptera:

Estes são as pulgas. A sua importância deve-se não só pelos efeitos no hospedeiro, como pelos agentes patogénicos que podem transmitir. Por serem pouco específicos em relação ao hospedeiro, parasitando hospedeiros alternativos e o Homem, as pulgas adquiriram grande relevância em termos de saúde pública (Urquhart *et al.*, 1996).

Morfologia: coloração castanha escura, insetos sem asas e com os corpos comprimidos latero-lateralmente. O terceiro par de patas é mais longo que os restantes, permitindo-lhes saltar com facilidade de e para o hospedeiro. A cabeça pode conter espículas posteriormente (pronotal) ou ventralmente (genal), denominadas por ctenidia. Sendo esta uma das características importantes na identificação de espécies (Urquhart *et al.*, 1996).

Ciclo de vida: ambos os sexos se alimentam de sangue e apenas os adultos são parasitas. Os ovos (ovoides e de superfície lisa) podem ser depositados no ambiente ou no hospedeiro, caindo depois no solo. Estes eclodem dentro de 2 dias a 2 semanas, dependendo das condições ambientais. As larvas alimentam-se a partir de detritos e fezes de pulgas adultas, que contêm sangue, dando-lhes assim uma coloração avermelhada. Após duas mudas e com um tamanho de aproximadamente 5mm, a larva pupa, de onde depois irá emergir o adulto. A duração de todo o processo depende das condições ambientais, podendo todo o ciclo levar 3 semanas em ambientes mais quentes, ou até dois anos em ambientes mais frios. A maior parte do ciclo ocorre sem o hospedeiro e mesmo as formas adultas conseguem sobreviver 6 meses sem se alimentarem de um hospedeiro. No entanto, alguns géneros permanecem no hospedeiro permanentemente, em que a fêmea forma nódulos na pele do hospedeiro. Nestes nódulos, apenas a parte posterior comunica com o exterior, permitindo que os ovos ou larvas caiam para o solo, onde se dá o resto do ciclo (Urquhart *et al.*, 1996).

Géneros mais relevantes: *Ctenocephalides*, *Pulex*, *Archaeopsylla*, *Paraceras*, *Monopsyllus*, *Chaetopsylla* (Dominguez, 2003)

#### 1.3.3.2. Classe Arachnida:

##### 1.3.3.2.1. Família Ixodidae:

Os ixodídeos são vetores importantes de protozoários, bactérias, vírus e riquetsias. Como outras carraças, os ixodídeos são parasitas temporários passando, relativamente, pequenos períodos de tempo no hospedeiro. Dependendo do número de hospedeiros ao qual se fixam durante o seu ciclo de vida parasitária, os ixodídeos são classificados em carraça de um hospedeiro (onde todo o ciclo parasitário, de larva a adulto, se passa num só hospedeiro), carraça de dois hospedeiros (onde as larvas e ninfas se desenvolvem num hospedeiro, e os adultos noutra) e carração



de três hospedeiros (em que cada estado de desenvolvimento decorre num hospedeiro diferente) (Urquhart *et al.*, 1996).

Géneros mais relevantes: *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* (Urquhart *et al.*, 1996; Dominguez, 2003; Simões, 2009).

#### 1.3.3.2.2. Família Psoroptidae:

##### 1.3.3.2.2.1. Otodectes:

Este ácaro é o mais comum entre os mamíferos, incluindo a raposa-vermelha e a fuinha. Localiza-se preferencialmente no ouvido externo do hospedeiro e alimenta-se superficialmente. O seu ciclo de vida é de 3 semanas (Urquhart *et al.*, 1996).

## **2. Objetivos:**

Identificar os parasitas presentes em carnívoros silvestres atropelados, da região de Évora, através de necrópsia parasitária e exames coprológicos;

Avaliar a possibilidade dos carnívoros silvestres estudados serem hospedeiros reservatórios de *Leishmania* sp. através da observação de esfregaços de medula óssea e da análise de amostras de pele (pavilhão auricular) por qPCR.

## **3. Materiais e métodos:**

### 3.1. Projeto MOVE:

O projeto MOVE, sob direção do professor António Mira do Departamento de Biologia da Universidade de Évora, visa estudar o impacto dos animais atropelados nas populações de animais silvestres. Diariamente uma equipa percorre as estradas, num circuito com um raio de pouco mais de 100 km, entre Montemor-O-Novo, Valeira e Évora (de onde provém o acrónimo MOVE), identificando as espécies de animais atropelados (figura 2). Foi graças à colaboração desta equipa, que obtivemos as nossas amostras de tecido para PCR e cadáveres para necrópsia parasitária.

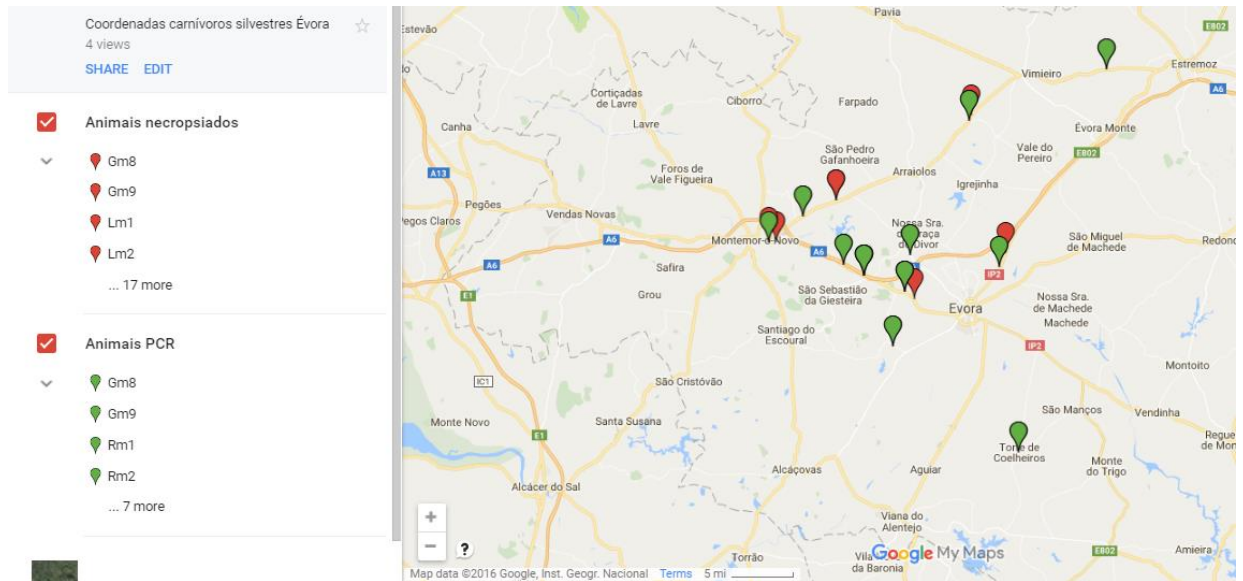


Figura 2: Distribuição geográfica dos cadáveres de carnívoros silvestres recolhidos e cedidos pelo projeto MOVE.

### 3.2. Necropsia parasitária:

Por definição, necropsia (do grego *nekros* = cadáver; *opsis* = vista) significa a abertura e a inspeção detalhada e metódica das cavidades e órgãos do animal morto com o objetivo de determinar a respetiva causa de morte (Cardoso, 2002). Contudo, neste trabalho o objetivo da necropsia não é determinar a causa de morte, mas sim a inspeção e recolha de amostras para pesquisa de parasitas (necropsia parasitária).

Foram necropsiados um total de 30 animais, entre os quais 6 sacarrabos (SRm), 5 raposas-vermelhas (Rm), 7 fuinhas (Fm), 3 texugos (Tm), 4 ginetas (Gm) e 5 lontras (Lm), entre o Outono de 2015 e o final da Primavera de 2016.

#### 3.2.1. Material:

O material necessário para as necropsias destes animais variou ligeiramente segundo o tamanho do animal. Para animais mais pequenos, utilizaram-se os seguintes materiais:

- Luvas descartáveis;
- 1 cabo de bisturi nº4;
- 1 lâmina de bisturi nº24;
- 1 pinça *Hadson* sem dentes;
- 1 pinça *Cushing* com dentes;
- 1 pinça *Cushing* sem dentes;

1 tesoura *IRIS*;

1 tesoura *Mayo*;

3 bandejas para colocar vísceras (estômago e intestinos);

1 copo cônico para colocar vísceras (pulmões);

1 tesoura para corte de osso

3 lâminas de vidro para realização de esfregaços;

1 frasco com álcool a 70°;

11 sacos de plástico pequenos para colocação de amostras para congelação;

1 recipiente pequeno com água;

1 cotonete;

1 lâmina com duas gotas de Lactofenol de Aman;

2 seringas de 2 ml;

1 agulha de 18G;

Placas de Petri;

### 3.2.2. Técnica:

A técnica de necrópsia iniciou-se com a inspeção do exterior do animal. Toda a superfície externa do animal foi inspecionada em busca de ectoparasitas que estivessem presentes. Com a ajuda de uma pinça *Hadson* sem dentes, foram colhidos os ectoparasitas encontrados e colocados num pequeno recipiente com álcool a 70°. Os pavilhões auriculares foram inspecionados e com o auxílio de um cotonete fez-se a colheita do material (cerúmen) do interior do canal auditivo. O cerúmen colhido foi colocado numa lâmina com Lactofenol de Aman e cobriu-se com uma lamela de modo a facilitar a visualização ao microscópio de ácaros que pudessem estar presentes. O próximo passo foi a abertura do cadáver. Este foi colocado em decúbito dorsal, expondo toda a superfície ventral do animal. Realizou-se uma incisão longitudinal da pele sobre a linha mediana, desde a região mandibular até a sínfise púbica (Cardoso, 2002). A pele foi rebatida e inspecionada para a presença de nódulos parasitários, assim como o tecido subjacente. Em seguida, procedeu-se à abertura da cavidade torácica, tendo sido esta promovida por secções laterais do gradil costal, sobre as articulações costochondrais e, após secção do diafragma, este corte pôde ser continuado até

à sínfise púbica, expondo assim também a cavidade abdominal, com cuidado para não perfurar os órgãos. Em seguida procedeu-se à remoção das vísceras, seccionando-se o pavimento da cavidade bucal junto da face interna da asa da mandíbula. Após desarticulação dos ossos hioides, a língua foi exposta para que, com o auxílio de uma pinça, fosse removida no conjunto língua-esófago-traqueia-pulmão-coração (Cardoso, 2002). O coração foi seccionado a meio e observado para a presença de parasitas e depois uma amostra de tecido foi retirada para congelação, assim como uma amostra de tecido pulmonar. A traqueia foi seccionada ao longo de todo o seu comprimento com uma tesoura e o seu interior foi também observado para pesquisa de parasitas. Este corte prolongou-se pelos brônquios e realizaram-se pequenos cortes nos pulmões. O conjunto traqueia e pulmões foram então colocados no copo cónico com água (40-45°C) de forma a promover a migração de larvas parasitárias que eventualmente pudessem estar presentes no pulmão (técnica Baermann-Moraes descrita em Carvalho *et al.*, 2012). Deixou-se repousar até ao final da necropsia e o sedimento foi depois observado à lupa. Nos casos em que estiveram presentes formas adultas, estas foram lavadas e colocadas num recipiente com álcool a 70°. Quando a lavagem pulmonar continha larvas pulmonares, esta era transferida para outro recipiente para congelação. Uma amostra do diafragma também foi recolhida para congelação. Em seguida procedeu-se à remoção das vísceras abdominais. Três amostras de fígado foram retiradas para congelação e realizou-se também um esfregaço por aposição de um fragmento do órgão. Realizou-se o mesmo para o baço. O esófago, estômago e intestinos foram retirados e separados por três bandejas. A primeira contendo o esófago e o estômago, a segunda contendo o intestino delgado e a terceira o intestino grosso. Antes de se proceder à lavagem dos órgãos gastrointestinais, uma amostra de fezes a nível do intestino delgado e outra a nível do intestino grosso foram recolhidas para análise coprológica. O conteúdo das lavagens destes órgãos também foi guardado para análise coprológica. De uma das coxas do animal foram também retiradas duas amostras de músculo-esquelético para congelação. Um dos fémures foi seccionado com a tesoura de corte de osso a fim de expor a medula óssea. Esta foi aspirada com uma seringa e agulha e o seu conteúdo colocado sobre uma lâmina (esfregaço de aspirado de medula óssea).

### 3.3. Análise das amostras:

#### 3.3.1. Técnicas de coprologia:

Neste trabalho foram utilizadas duas técnicas de coprologia, uma de flutuação espontânea (*Willis*) e outra de sedimentação espontânea (*Hoffman-Pons-Janer*).

##### 3.3.1.1. Método de flutuação espontânea de *Willis*:

A técnica de flutuação *Willis*, descrita por *Willis* (1921) e referida por *Carvalho et al.* (2012), baseia-se na capacidade dos ovos de helmintes flutuarem à superfície de uma solução saturada de cloreto de sódio, com uma densidade de 1,20 g/mL, assim como na sua capacidade de adesão à lamela de vidro. Nesta técnica, a amostra de fezes emulsionada com a solução saturada é colocada num tubo de ensaio até formar um menisco convexo. O tubo é depois coberto com uma lamela (figura 3), a qual, minutos depois (10-15 min), é retirada e colocada sobre uma lâmina para observação ao microscópio ótico (figura 4).



Figura 3: Flutuação espontânea *Willis* – a amostra de fezes emulsionada com a solução saturada é colocada num tubo de ensaio até formar um menisco, o qual é coberto com uma lamela (10-15min).

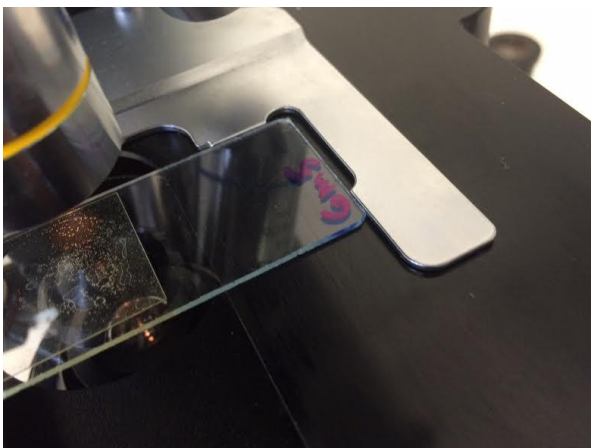


Figura 4: Flutuação espontânea *Willis* – lamela colocada sobre lâmina para observação ao microscópio ótico.

Neste trabalho, a solução saturada utilizada não foi o tradicional cloreto de sódio, mas sim sulfato de zinco numa concentração de 30%. A maior densidade do sulfato de zinco (1,18

g/mL) permite a flutuação de protozoários intestinais como *Giardia lamblia* e de formas larvares delicadas de parasitas pulmonares como *Oslerus* sp., *Filaroides* sp. e *Aleurostrongylus* sp. (Diagnostic Clinical Parasitology Service Laboratory, 2009). Para cada animal, esta técnica foi realizada duas vezes (como evidenciado na figura 3), uma utilizando uma amostra de fezes do intestino delgado e outra utilizando uma amostra de fezes do intestino grosso, de forma a aumentar a probabilidade de observar eventuais formas parasitárias, nomeadamente de protozoários intestinais.

#### 3.3.1.2. Sedimentação espontânea Hoffman-Pons-Janer.

Nesta técnica, descrita por Hoffman *et al.* (1934) e referida por Carvalho *et al.* (2012), as amostras fecais são diluídas em água e filtradas através de uma banda de gaze colocada dentro de um copo de sedimentação cónico. É uma técnica que, como a de Willis, é muito utilizada devido aos baixos custos associados. O seu objetivo foi a pesquisa de helmintes adultos. Para cada animal esta técnica foi realizada três vezes. Uma para o estômago, outra para o intestino delgado e outra para o intestino grosso. A técnica foi realizada com a água resultante da lavagem do interior dos órgãos e após a recolha das amostras fecais para a técnica Willis. A mistura resultante foi transferida para recipientes de vidro cilíndricos, não cónicos, onde se deixou repousar até sedimentar. O sobrenadante foi descartado e o sedimento transferido para uma bandeja, para a pesquisa de parasitas. Os helmintes encontrados foram depois transferidos para pequenos recipientes com álcool a 70°, para posterior identificação.

#### 3.3.2. Técnica de esfregaços:

Para cada animal realizou-se um esfregaço por aposição de fígado e outro de baço, o qual consiste apenas em imprimir uma pequena amostra de órgão contra uma lâmina; e ainda um esfregaço de aspirado de medula óssea (fémur). Após estes secarem à temperatura ambiente, procedeu-se à sua fixação e coloração através do método Giemsa.

##### 3.3.2.1. Coloração de Giemsa:

Este método de coloração foi criado por Gustav Giemsa com o objetivo de demonstrar a existência de parasitas na doença malária. Contudo, foi também empregue na histologia devido à sua superioridade na coloração da cromatina e membrana nuclear das células, à metacromasia de alguns componentes celulares e, às diferentes qualidades na coloração citoplasmática, dependendo do tipo de célula. A mistura de azure de metileno e azul de metileno, formando um eosinato, torna a coloração e os seus resultados mais estáveis. A coloração de Giemsa é considerada como técnica de diagnóstico padrão para a malária e outros protozoários e, é também a coloração de base para a classificação de linfomas na classificação Kiel (Barcia, 2007).

Devido ao elevado número de amostras, a técnica de *Giemsa* escolhida foi a lenta (Storey, 2012; WHO, 2010). Esta consiste primeiramente em desidratar (por agitação ao ar) as preparações e fixá-las com álcool metílico por cinco minutos (figura 5). Uma vez completamente secas, corar as preparações com a solução de *Giemsa* diluída (3ml de solução filtrada para 100ml de água destilada neutralizada até um pH entre 7,0 e 7,4) durante 15-30 min (figura 6). Por fim, as preparações são lavadas com água destilada e novamente secas à temperatura ambiente (Petithory *et al.*, 2005) (figura 7). Se pretendêssemos acelerar o processo, poderíamos utilizar uma solução de *Giemsa* a 10% por 8-10min, em vez da solução a 3%. No entanto, esta técnica designada por *Giemsa* rápida, envolve um custo superior por utilizar uma maior quantidade de corante. Em âmbito de clínica, onde são necessários resultados mais rápidos, a *Giemsa* rápida é a mais utilizado. No âmbito de investigação, uma vez que envolve geralmente um maior conjunto de amostras em simultâneo, a técnica mais utilizada é a *Giemsa* lenta (Storey, 2012; WHO, 2010).



Figura 5: Coloração de *Giemsa* – fixação com álcool metílico (5min).

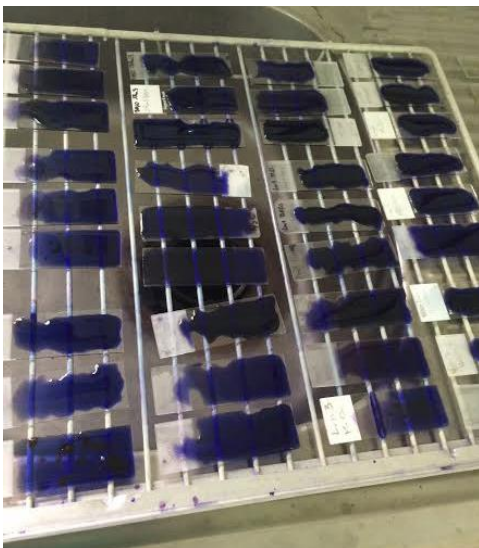


Figura 6: Coloração de *Giemsa* – aplicação da solução de *Giemsa* diluída (15-30min).



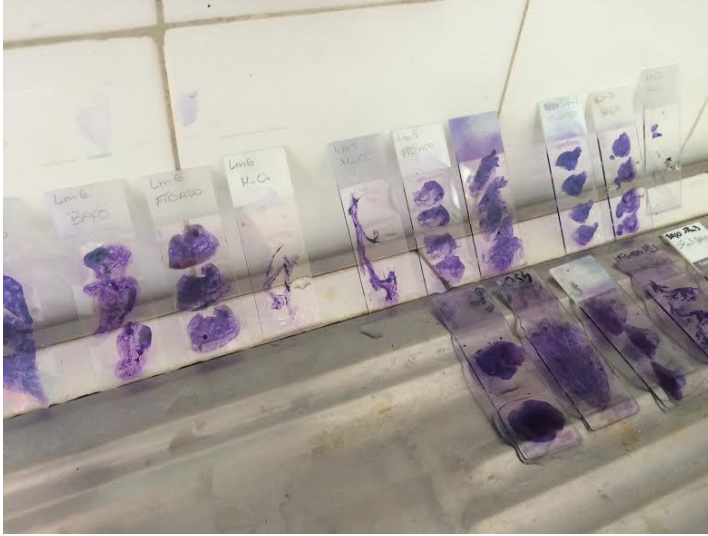


Figura 7: Coloração de *Giemsa* – secagem das preparações, depois de lavadas, à temperatura ambiente.

### 3.3.3. Técnica de PCR *real time*:

As amostras de fígado e baço, assim como os pavilhões auriculares, foram conservadas por meio de congelação para, através da técnica de PCR, se identificar a presença de *Leishmania infantum*. O objetivo seria avaliar a possibilidade de os carnívoros silvestres, capturados no MOVE, serem hospedeiros. Os pavilhões auriculares, sendo um local dos locais preferenciais de alimentação dos flebótomos e, dificilmente danificados aquando um atropelamento, seriam recolhidos para posterior pesquisa de ADN de *L. infantum* em pequenas amostras de pele deste local. E a análise do fígado e baço para identificar a sua presença nestes órgãos o que poderia sugerir uma possível infeção sistémica. Idealmente associar-se-ia um teste imunológico (IFI ou ELISA, por exemplo) para confirmar a presença de infeção através do nível de anticorpos produzidos pelo hospedeiro. No entanto, tratando-se de animais com pelo menos 24 horas de óbito, a recolha de uma amostra de sangue viável tornou-se impraticável, assim como qualquer técnica imunológica.

Para este trabalho, de entre 80 amostras de pavilhões auriculares recolhidas de diferentes animais, foram selecionadas 38 correspondentes a animais recolhidos durante os meses de maior atividade do vetor (Primavera a Outono), para a pesquisa de *Leishmania infantum* por qPCR. A amostra incluiu 8 ginetas, 10 sacarrabos, 10 raposas vermelhas e 10 fuinhas. O protocolo utilizado (Purification of total DNA from animal tissues, Spin-column protocol) seguiu as instruções do manual DNeasy Blood & Tissue Handbook® (Qiagen, Alemanha) de 2006 (disponível online), o qual foi executado com o apoio, orientação e supervisão da Professora Ana Duarte do Departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Este foi o mesmo protocolo utilizado por Helhazar *et al.* (2013) num estudo de pesquisa de *L. infantum* em pequenos roedores, e consiste na pesquisa de ADN cinetoplasmático do parasita.



#### 4. Resultados e Discussão:

##### 4.1. Necrópsias:

Das 30 necrópsias realizadas, sete ocorreram em animais capturados no Verão (Junho a Setembro), sete no Outono (Setembro a Dezembro), seis no Inverno (Dezembro a Março), cinco na Primavera (Março a Junho) e os restantes 5 animais necropsiados não tinham identificada a data de captura (gráfico 1).

##### Distribuição dos animais recolhidos para necrópsia parasitária por estação do ano

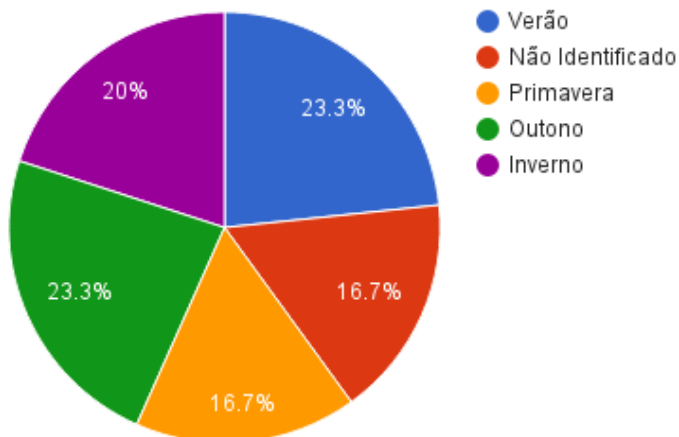


Gráfico 1: Distribuição dos animais recolhidos para necrópsia parasitária, por estação do ano.

Dos 30 animais, 22 (73,33%), encontravam-se parasitados. No Verão, em seis dos sete animais necropsiados (85,71%) foram observadas formas parasitárias, em cinco dos sete (71,43%) no Outono, em quatro dos cinco (80%) na Primavera e, por último, em três dos seis animais necropsiados (50%) no Inverno (gráfico 2).

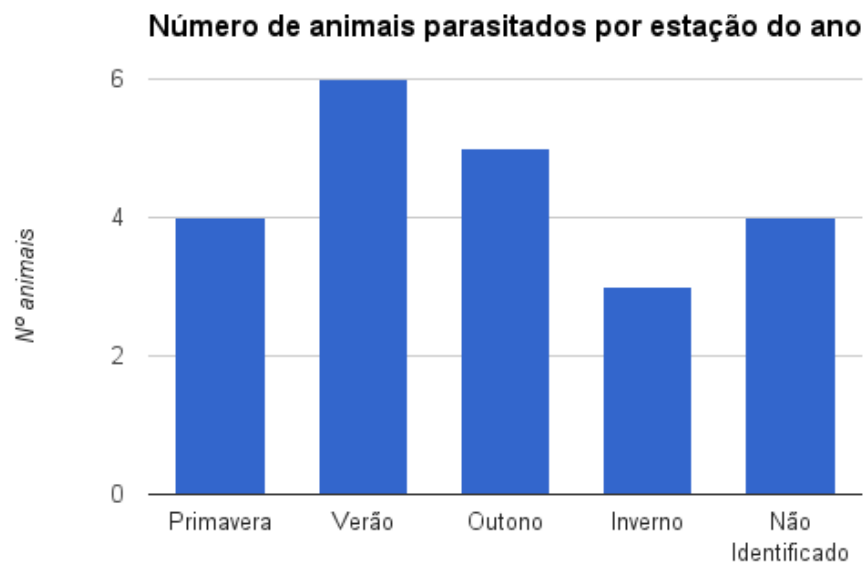


Gráfico 2: Número de animais parasitados por estação do ano.

Os parasitas gastrointestinais foram o grupo de parasitas encontrado com maior frequência (19 dos 30 animais, correspondente a 63,33%), seguindo-se o grupo dos ectoparasitas (15 dos 30 animais, correspondente a 50%) e por fim o grupo dos nematodos pulmonares, apenas observados em 4 animais (13,33%) (tabela 4). Do total de animais necropsiados, em 7 (23,33%) não foram observadas quaisquer formas parasitárias (tabela 4).

Estação:	Parasitas Gastrointestinais (%):	Parasitas Pulmonares (%):	Ectoparasitas (%):	No (%):	Total (%):
Primavera	60	0	60	20	<b>80</b>
Verão	71,43	42,86	57,14	14,29	<b>85,71</b>
Outono	71,43	14,29	42,86	28,57	<b>71,43</b>
Inverno	50	0	16,67	50	<b>50</b>
<b>Todas</b>	<b>63,33</b>	<b>13,33</b>	<b>50</b>	<b>23,33</b>	<b>73,33</b>

Tabela 4: Frequência de animais parasitados por estação do ano e grupo de parasitas. No: não observada nenhuma forma parasitária.

Os gráficos 3, 4, 5 e 6 retratam o número de animais parasitados com os diferentes grupos de parasitas, identificados nas necrópsias realizadas na Primavera, Verão, Outono e Inverno respetivamente.

Na Primavera foram observados em igual número animais com ectoparasitas (três animais) e parasitas gastrointestinais (3 animais) e em apenas um animal não foram observadas formas parasitárias (gráfico 3).

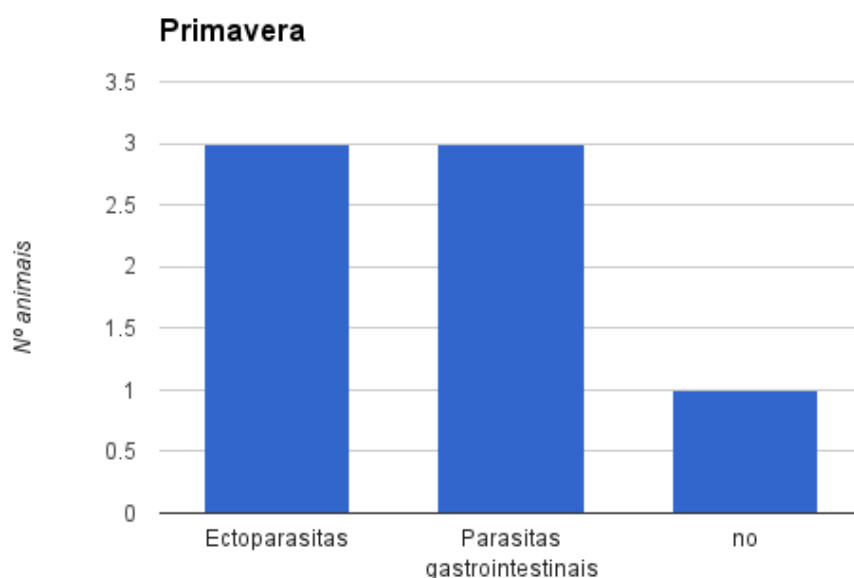


Gráfico 3: Resultados das necrópsias parasitárias realizadas durante a estação da Primavera. No: não foi observada nenhuma forma parasitária.

No Verão, os parasitas gastrointestinais foram as formas parasitárias mais frequentemente encontradas (cinco animais), seguindo-se os ectoparasitas (quatro animais ou 57,14%) e os nematodas pulmonares (três animais) (gráfico 4).

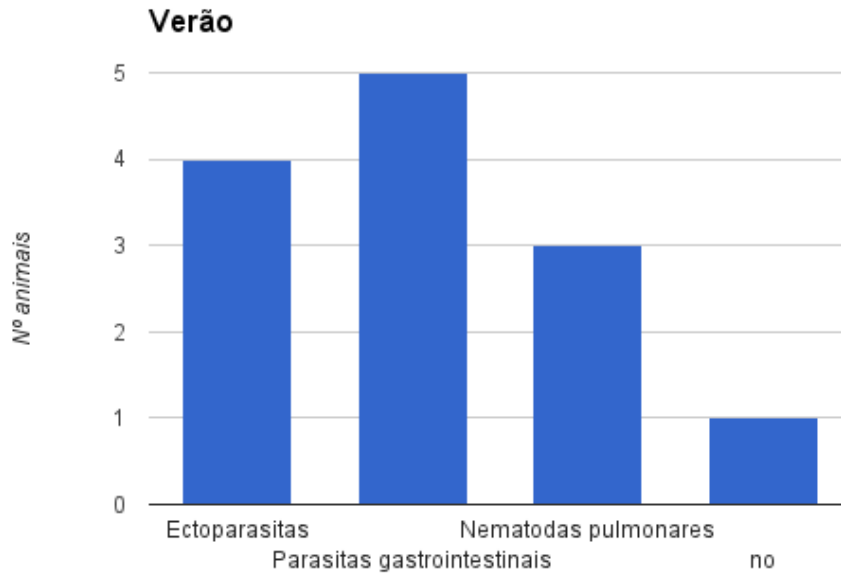


Gráfico 4: Resultados das necrópsias parasitárias realizadas durante a estação de Verão. No: não foi observada nenhuma forma parasitária.

No Outono também foram identificados com maior frequência os parasitas gastrointestinais (cinco animais), seguindo-se os ectoparasitas (três animais) e por fim os nematodas pulmonares (um animal) (gráfico 5). No entanto, o número de animais em que não foram identificadas quaisquer formas parasitárias foi superior (dois animais) (gráfico 5).

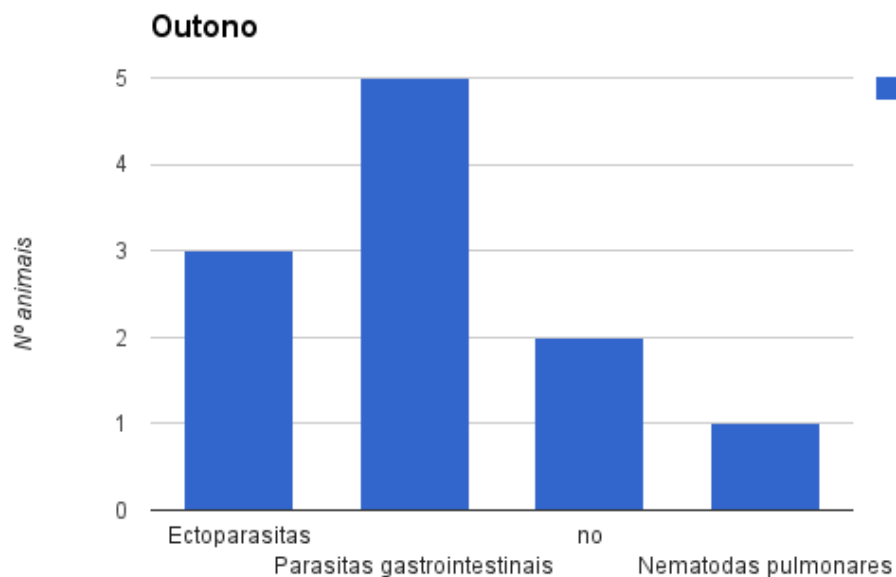


Gráfico 5: Resultados das necrópsias parasitárias realizadas durante a estação de Outono. No: não foi observada nenhuma forma parasitária.

No Inverno, a frequência de animais com parasitas gastrointestinais também foi superior (três animais), seguindo-se os ectoparasitas (um animal) e em metade dos animais necropsiados neste período (três animais) não foram identificadas quaisquer formas parasitárias (gráfico 6). Foi neste período que se registou o maior número de animais onde não foi observada qualquer forma parasitária.

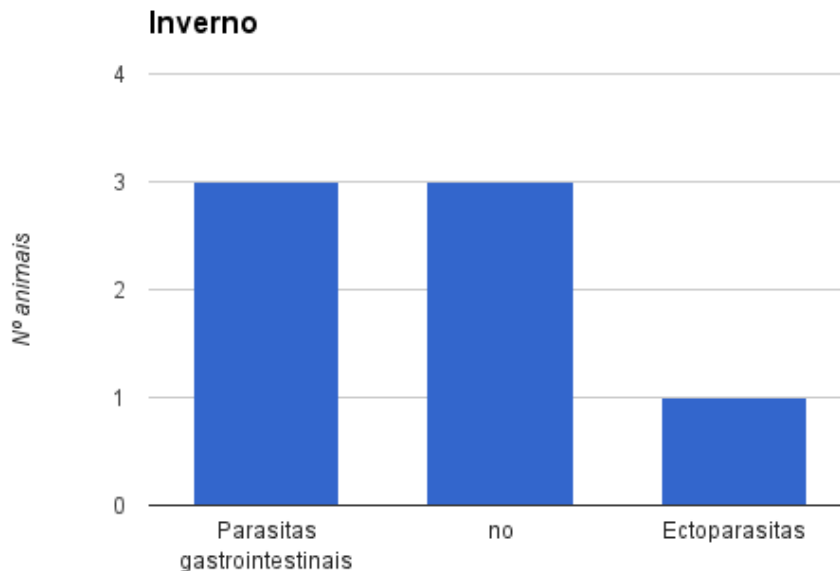


Gráfico 6: Resultados das necrópsias parasitárias realizadas durante a estação de Inverno. No: não foi observada nenhuma forma parasitária.

Uma vez que a maioria dos animais foram recolhidos durante o Verão e o Outono, seria expectável que o número de animais parasitados fosse também superior nessas estações, o que de fato se verificou. No entanto, quando os resultados são analisados por estação do ano, verificou-se uma maior percentagem de animais parasitados no Verão (85,71%), seguindo-se os meses de Primavera (80%) e Outono (71,43%) respetivamente. Para além disso, se compararmos a percentagem de animais parasitados, pelos diferentes grupos de parasitas, em cada estação, observamos que a frequência de parasitismos gastrointestinal foi superior nos meses de Verão e Outono (71,43%) e menor no Inverno (50%); que os parasitas pulmonares apenas foram observados nos meses mais quentes, sobretudo no Verão (42,86%); que os ectoparasitas foram também observados com maior frequência nos meses mais quentes, com uma percentagem de 57,14% no Verão, e menor nos meses mais frios com apenas 16,67% no Inverno; e que a frequência de animais não parasitados foi superior nos meses mais frios, atingindo os 50% no Inverno (tabela 4).

Estes resultados podem ser indicativos da presença de uma maior carga parasitária no meio ambiente, nos meses com temperaturas mais elevadas, o que vai de encontro à bibliografia consultada referente aos parasitas das espécies estudadas (anexo 1) (Torres *et al.*, 2004; Rosalino, 2008; CDC; Dawes, 1968; Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016; The Merck

Veterinary Manual; Ribas *et al.*, 2004; Kierdorf *et al.*, 2006) Isto poderá dever-se, não só a uma maior atividade e sociabilização dos animais durante os meses mais quentes, mas também à maior disponibilidade de hospedeiros intermediários.

#### 4.1.2. Ectoparasitas:

Em relação ao grupo dos ectoparasitas (anexo 2), num total de 15 animais onde foram observados ectoparasitas, foram identificados artrópodes da classe Arachnida (família *Ixodidae* e *Psoroptidae*) em 11 animais (73,33% dos animais com ectoparasitas) e da classe Insecta (ordens Diptera, Siphonaptera e Phthiraptera) em nove animais (60% dos animais com ectoparasitas) (tabela 2).

##### 4.1.2.1. Classe Arachnida:

###### 4.1.2.1.1. Família *Ixodidae*:

Na família *Ixodidae*, foram identificados três géneros (*Rhipicephalus*, *Ixodes* e *Dermacentor*), e cinco espécies (*Rhipicephalus sanguineus*; *R. bursa*, *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *Dermacentor reticulatus*), num total de 10 animais (66,67% do total de animais com ectoparasitas). Para a identificação destas espécies foram utilizadas as *Chaves para as Famílias e Géneros dos Ixodoidea representados na Península Ibérica* (Universidade de Évora) e os autores Walker *et al* (2000).

###### 4.1.2.1.1.1. Género *Rhipicephalus*:

O género *Rhipicephalus* foi observado num total de seis animais (num total de 10 animais parasitados com ixodídeos), em quatro fuinhas, duas recolhidas na Primavera e uma no Verão com *R. sanguineus*, e uma recolhida na Primavera com *R. bursa*, numa raposa recolhida no Outono (espécie não determinada) e num texugo recolhido na primavera com a espécie *R. sanguineus*. A amostra, embora reduzida, revela a tendência para uma maior prevalência do género *Rhipicephalus* durante a Primavera. De facto, a bibliografia refere que em Portugal existe uma maior prevalência deste género na Primavera e Verão, nomeadamente nos meses Julho e Agosto. Este género possui uma grande adaptabilidade ao clima, tendo preferência por temperaturas elevadas. A humidade relativa não é um fator importante, e este género sobrevive bem em climas secos (Silva *et al.*, 2006). Estas características justificam por que este foi o género de ixodídeos com maior prevalência (60% do total de ixodídeos) (tabela 5).

###### 4.1.2.1.1.2. Género *Ixodes*:

O género *Ixodes* foi observado em cinco animais (em 10 animais com ixodídeos), incluindo uma fuinha recolhida no Outono (espécie não determinada), uma raposa com *I. ricinus* recolhida no Inverno, e três texugos, um com *I. hexagonus* recolhido no Outono, na Primavera

e o terceiro, recolhido também na Primavera com *I. ricinus*. À semelhança do género anterior, embora o número da amostra seja reduzido, os resultados refletem uma maior prevalência do género *Ixodes* durante os meses de Primavera e Outono, conforme mencionado na bibliografia, nomeadamente nos meses de Março e Setembro. Este é um género que exige a existência de cobertura vegetal, associada a uma elevada humidade relativa (mais de 90%) (Silva *et al.*, 2006), existindo, por isso, uma certa sazonalidade associada a este género, nesta zona geográfica.

#### 4.1.2.1.1.3. Género *Dermacentor*:

O género *Dermacentor* foi apenas observado em um texugo adulto (em 10 dos animais com ixodídeos), capturado durante a Primavera, tendo sido a espécie identificada como *D. reticulatus*. Embora este espécimen adulto tenha sido capturado na Primavera, a bibliografia menciona o Outono e Inverno como as épocas do ano onde existe maior prevalência das formas adultas do género *Dermacentor*. Este é um género que prefere um clima seco e temperado, suportando, no entanto, temperaturas elevadas. Neste género, a temperatura relativa também não é um fator importante. (Silva *et al.*, 2006).

#### 4.1.2.1.2. Família *Psoroptidae*:

Na família *Psoroptidae* foi identificada a espécie *Otodectes cynotis* em cinco animais, representando 33,33% do total de animais com ectoparasitas. A espécie foi colhida a partir de duas fuinhas recolhidas na Primavera, uma no Verão e duas raposas recolhidas no Inverno. A amostragem, à semelhança da família anterior, é muito pequena para relacionar a época do ano com a maior ou menor presença do parasita nos animais. No entanto, os resultados parecem apontar para a inexistência de uma relação entre a presença do ácaro e a época do ano. Tal poderá ser explicado pela localização característica do ácaro no hospedeiro.

#### 4.1.2.2. Classe Insecta:

Dos quinze animais onde foi observada a presença de ectoparasitas, nove (60%) possuíam ectoparasitas pertencentes a esta classe.

##### 4.1.2.2.1. Ordem Diptera:

Na ordem Diptera foram identificados dois espécimes da família *Hyppoboscidae*, cujo género não foi determinado, um numa raposa recolhida no Verão e outro num texugo recolhido no Outono, representando uma percentagem de 13,33% no total dos animais observados com ectoparasitas. A amostra é muito reduzida para inferir sobre uma tendência anual para a sua maior ou menor presença nos animais, ou se poderá tratar-se apenas de uma contaminação accidental, uma vez que não foram identificadas larvas nos cadáveres.

##### 4.1.2.2.2. Ordem Siphonaptera:

Na ordem Siphonaptera foram identificados dois gêneros e duas espécies diferentes, *Pulex irritans* e *Ctenocephalides canis*. A espécie *Pulex irritans* (figura 8), adaptada a diferentes tipos de clima (Buckland & Sadler, 1989), foi a mais abundante, tendo sido observada nos nove hospedeiros (uma fuinha no Inverno, uma ginetta no Outono, três raposas no Verão, Outono e Inverno, um sacarrabos no Verão e em três texugos, dois na Primavera e o terceiro durante o Verão). A espécie *C. canis* (figura 9) foi observada apenas num animal, uma ginetta, capturada no Outono. A amostragem, tal como para a ordem anterior, é muito reduzida para averiguar uma maior ou menor prevalência de pulgas durante determinadas alturas do ano. No entanto, os resultados parecem apontar, à semelhança dos ácaros, para a inexistência de relação entre a presença do parasita e a época do ano. Tal poderá ser explicado pela elevada resiliência destas espécies face às adversidades ambientais. No entanto é de evidenciar a elevada frequência com que foi observada a espécie *P. irritans*.



Figura 8: *Pulex irritans*.

Fonte: Jesper Monrad, 2011 (a).

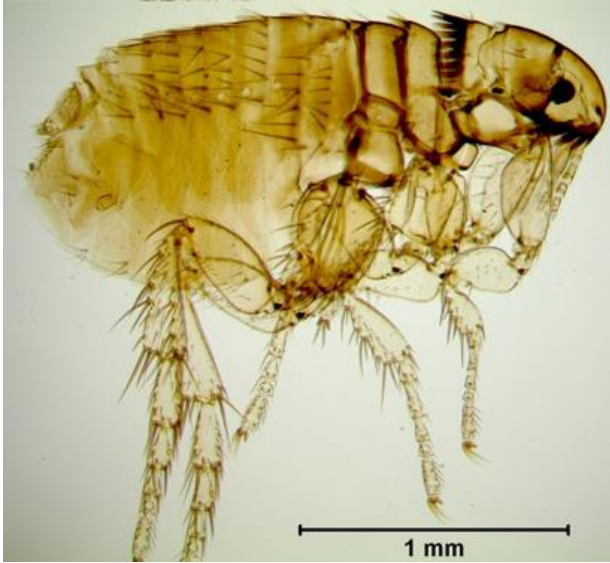


Figura 9: *Ctenocephalides canis*.

Fonte: Krista Seraydar, 2014.

#### 4.1.2.2.3. Ordem Phthiraptera:

Na ordem Phthiraptera foram identificados parasitas do género *Trichodectes* (figura 10) em um único hospedeiro na Primavera, um texugo.

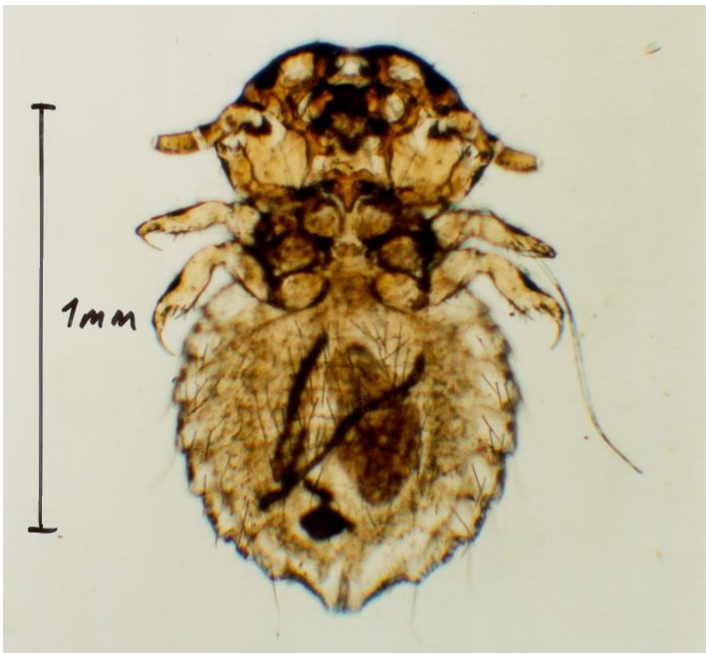


Figura 10: *Trichodectes canis*.

Fonte: Jesper Monrad, 2011 (b).



Ectoparasitas	50% (15)	Ara- chnida: 73,33% (11)	<i>Ixodidae</i> : 90,91% (10)	<i>Rhipicephalus</i> sp.: 60% (6)	<i>Ixodes</i> sp.: 50% (5)	<i>Dermacen- tor</i> sp.: 10% (1)
		<i>Psoroptidae</i> : 45,45% (5)				
Ectoparasitas	60% (9)	Sifonápte- ros: 100% (9)	<i>Pulex irritans</i> : 100% (9)		<i>Ctenocephalides canis</i> : 11,11% (1)	
		Dípteros: 22,22% (2)				
		Phthiraptera 11,11% (1)				

Tabela 5: Frequência de animais com ectoparasitas. Em numerário apresenta-se o número de animais e em percentagem as prevalências.

A espécie *Pulex irritans* foi a espécie de ectoparasitas mais frequentemente observada, tendo sido identificada em 60% do total de animais com ectoparasitas (nove em quinze animais). Seguindo-se os ixodídeos do género *Rhipicephalus* (60% do total de animais com ixodídeos, seis animais) e *Ixodes* (50% do total de animais com ixodídeos, cinco animais) e o ácaro *Otodectes cynotis* (45,45% do total de animais com ectoparasitas da classe Arachnida, cinco animais) (tabela 5, gráfico 7). Os ectoparasitas foram encontrados ao longo de todo o ano, com maior frequência no Verão e menor no Inverno (tabela 4 e gráfico 6).

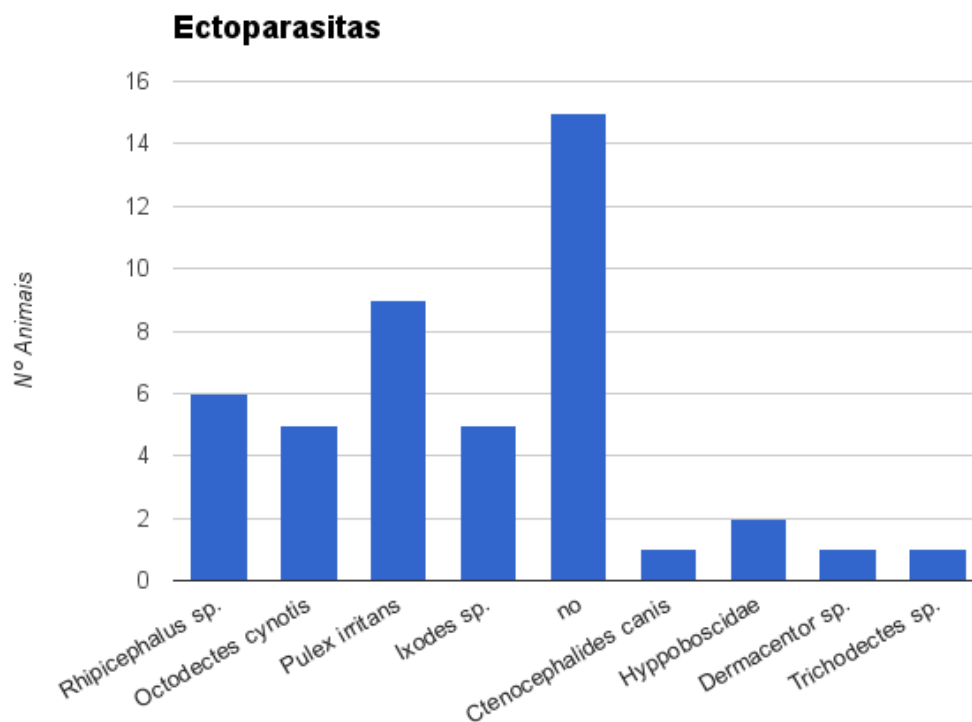


Gráfico 7. Espécie de ectoparasitas por número total de animais. No: não observado nenhum ectoparasita.

Nas cinco lontras não foram observados quaisquer ectoparasitas. Tal poderá dever-se aos hábitos semi-aquáticos desta espécie de carnívoros. Em contraste, foram observados ectoparasitas na totalidade das fuinhas (sete) e dos texugos (três) necropsiados. Das cinco raposas, foram observados ectoparasitas em três (60%). Nas espécies sacarrabos e gineta, apenas um indivíduo de cada apresentava ectoparasitas (tabela 6). Face aos resultados obtidos, a fuinha revela uma maior predisposição para a presença de ectoparasitas em relação às outras espécies de carnívoros silvestres, e a lontra, uma predisposição menor.

Hospedeiros	Nº de animais necrópsiados	Nº de animais parasitados:	% de animais parasitados:
Fuinha	7	7	100
Sacarrabos	6	1	16,67
Raposa	5	3	60
Gineta	4	1	25
Texugo	3	3	100
Lontra	5	0	0

Tabela 6: Número absoluto e relativo de hospedeiros com ectoparasitas, por espécie de carnívoro silvestre.

Comparando os nossos resultados com outros estudos (Domínguez, 2003; Simões, 2009), encontramos algumas semelhanças (tabela 7).

Ectoparasitas	Dominguez, 2003	Ribeiro, 2016	Simões, 2009
Ixodidae	60% (63)	66,67% (11)	34,04% (32)
Siphonaptera	51,4% (54)	60% (9)	21,28% (20)
Phthiraptera	3,8% (4)	6,67% (1)	5,32% (5)
Diptera e ácaros	3,8% (4)	13,33% (2) (dípteros)	0% (0)
		33,33% (5) (ácaros)	18,09% (8)
<b>Total</b>	<b>82,8% (87)</b>	<b>50% (15)</b>	<b>60,64% (57)</b>

Tabela 7: Comparação de resultados entre o presente trabalho (vermelho) com outros estudos realizados (azul). A verde apresentam-se os resultados que, entre os três estudos, mais se aproximam. Em numerário apresenta-se o número de animais e em percentagem as prevalências.

No primeiro, relativo ao Norte de Espanha, a prevalência de ectoparasitas foi superior (82,8% dos 105 animais, face aos 50% da nossa amostra de apenas 30 animais), enquanto que no segundo, relativo a Sul de Portugal, o valor foi de 60,64%, um valor ao qual os nossos resultados se aproximam mais (tabela 7). As diferenças climáticas, nomeadamente em termos de humidade

relativa, poderão estar na origem da menor prevalência de ectoparasitas em Évora. Tanto Burgos (Dominguez, 2003), como o Algarve (Simões, 2009) são zonas geográficas com níveis de humidade relativa superiores, uma condição fundamental para o desenvolvimento de muitos ectoparasitas (Halliday *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2006).

Em Dominguez (2003) foram detetadas quatro espécies de carrças (*Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus*, *Haemaphysalis punctata* e *Dermacentor reticulatus*), três das quais também identificadas no nosso estudo. Em Simões (2009), foram identificados os mesmos géneros do que no nosso estudo, assim como no estudo de Colonnello (2010) no Algarve. Dominguez (2003) calculou uma prevalência global de 60%, valor muito próximo aos 66.67% calculados para a nossa amostra, mas muito afastado dos 34, 04% calculados por Simões (2009) (tabela 7).

As espécies de ixodídeos encontradas em Portugal, com a exceção do género *Ixodes*, não dependem do teor de humidade relativa, mas sim da temperatura (elevada para os géneros *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Dermacentor* e *Hyalomma*, e baixa para *Haemaphysalis*) (Silva *et al.*, 2006). Isto explica por que no estudo realizado no Norte de Espanha, o género *Ixodes* (que necessita elevado teor de humidade) e, sobretudo o género *Haemaphysalis* (que tem preferência por temperaturas baixas) foram observados com maior frequência, do que em Portugal.

Em relação às pulgas, Dominguez (2003) identificou sete espécies diferentes (*Pulex irritans*, *Ctenocephalides canis*, *Archaeopsylla erinacei erinacei*, *Paraceras melis melis*, *Monopsyllus sciurorum sciurorum*, *Chaetopsylla trichosa*, *Ctenocephalides felis felis*), Colonnello (2010) três géneros (*Pulex*, *Ctenocephalides* e, em quatro raposas, predadores com preferência para lebres, o género *Spilopsyllus*) e Simões (2009) três espécies de dois géneros diferentes (*Pulex irritans*, *Ctenocephalides canis* e *Ctenocephalides felis*), entre as quais as duas espécies identificadas no nosso estudo. Em ambos os estudos (Dominguez 2003 e Simões, 2009) referidos na tabela 7, a pulga *Pulex irritans* foi a espécie mais frequentemente observada, indo de encontro aos nossos resultados. A prevalência de todas as espécies de pulgas foi de 51,4% em Dominguez (2003), valor próximo do calculado na nossa amostragem (60%) (tabela 4). Contudo, e à semelhança dos ixodídeos, este valor encontra-se muito afastado do valor calculado por Simões (21,28%).

Quanto aos piolhos a prevalência, calculada em Dominguez (2003), foi de 3,8% (quatro animais em 105), face aos 6,67% (dois animais em 30) do nosso estudo. Aqui, os nossos resultados aproximam-se mais dos valores de Simões (2009) (5,32%). Nestes três estudos, *Trichodectes* foi o género identificado.

Ainda relativamente a Dominguez (2003), quatro animais (3,8%) estavam parasitados com outros ectoparasitas (ácaros e dípteros *Hyppoboscidae*), valores estes muito inferiores aos nossos para os ácaros (33,33%) e dípteros *Hyppoboscidae* (13,33%), ou dos de Simões (2009) (ácaros 18,09% e dípteros 0%).

Nestes dois últimos grupos de ectoparasitas e em relação ao piolho *Trichodectes* sp., há que ter em conta o reduzido tamanho da nossa amostra, sendo essa provavelmente a origem de resultados tão díspares em relação à bibliografia. Em relação aos ixodídeos e sifonápteros, os nossos resultados revelaram grande proximidade com os resultados do estudo realizado no Norte de Espanha, mas muito diferentes do estudo realizado no Sul de Portugal, sendo o oposto do expectável, uma vez que a área geográfica deste último é mais próxima da do nosso estudo.

Quando às espécies de hospedeiros, em Dominguez (2003), 66,6% (quatro) das seis fuinhas estavam parasitadas, e apenas 30,77% em Simões (2009), valores muito inferiores aos nossos 100% (sete) para a mesma espécie. Em Dominguez (2003), 100% dos texugos encontravam-se parasitados, tal como no nosso estudo, mas em Simões (2009) este valor foi de 50%. Aqui, há que ter em conta que a nossa amostra incluía apenas três texugos, enquanto que em Simões (2009) este número foi o dobro. Em relação à raposa, 22 estavam parasitadas (84,6%) em Dominguez (2003) e 17 (89,47%) em Simões (2009), valores muito superiores aos nossos resultados (60%). Por fim, em relação à gineta apenas uma se encontrava parasitada (4%) em Dominguez (2003), tal como no nosso estudo (25%), mas em Simões este número foi muito superior (nove ginetas, ou 45%) (tabela 8).

Hospedeiros	Dominguez, 2003	Ribeiro, 2016	Simões, 2009
Fuinha	66,67% (4)	100% (7)	30,77% (4)
Sacarrabos	-	16,67% (1)	71,43% (5)
Raposa	84,6% (22)	60% (3)	89,47% (17)
Gineta	4% (1)	25% (1)	45% (9)
Texugo	100% (7)	100% (3)	50% (3)
Lontra	-	0% (0)	-

Tabela 8: comparação de resultados entre o presente trabalho (vermelho) com outros estudos realizados (azul), relativamente aos hospedeiros. A verde apresentam-se os resultados que, entre os três estudos, mais se aproximam. Em numerário apresenta-se o número de animais e em percentagem as prevalências.

Dominguez (2003) não analisou os hospedeiros lontra e sacarrabos incluídas no nosso estudo. Simões (2009), apenas não incluiu a lontra. Devido à nossa amostragem reduzida, a comparação do grau de parasitismo, por ectoparasitas, entre as diferentes espécies de hospedeiros, revela resultados díspares com a bibliografia. Outra razão, apontada por Lindenfors *et al.* (2007), para a origem de disparidades de resultados em estudos nosoparasitológicos semelhantes, é a fragmentação de habitats, a qual origina nichos de parasitas. Esta é a razão principal porque os nossos resultados são confrontados, maioritariamente, com os de Simões (2009) (Alentejo e Algarve) nesta discussão, sendo, à exceção de trabalhos com a raposa, o único outro estudo em carnívoros silvestres, que aborda uma área geográfica semelhante à estudada no nosso trabalho.

Apesar da diferença nos resultados, contudo, podemos apontar o texugo e a raposa como hospedeiros onde parece existir maior prevalência de ectoparasitas. Tal deve-se ao fato de espécies animais mais sociais, com um maior número de animais por toca, o que facilita a transmissão e desse modo entrarem em contacto com um maior número de parasitas (Lindenfors *et al.*, 2007). Na gineta parece existir a tendência inversa. Rodriguez-Refojos *et al.* (2006) explicam que a menor prevalência de ectoparasitas em ginetas, se deve ao fato de estas espécies mudarem frequentemente de tocas de repouso.

#### 4.1.3. Endoparasitas:

Em relação a este grupo de parasitas, foram identificados nematodas pulmonares (anexo 2), nematodas gastrintestinais e cestodas (anexo 3). Quanto à diversidade de espécies observadas (gráfico 8), esta é significativamente menor à descrita na bibliografia (anexo 1), tendo sido apenas identificadas oito géneros e espécies diferentes de endoparasitas (*Crenosoma vulpis*; *Trichuris sp.*, *Spirura rytipleurites rytipleurites*, *Physaloptera praeputialis*; *Pterigodermatites sp.*, *Uncinaria stenocephala*, *Taenia sp.* e *Mesocestoides sp.*). Este número poderá ser superior uma vez que não foram identificadas as espécies de parasitas em estadios larvares.

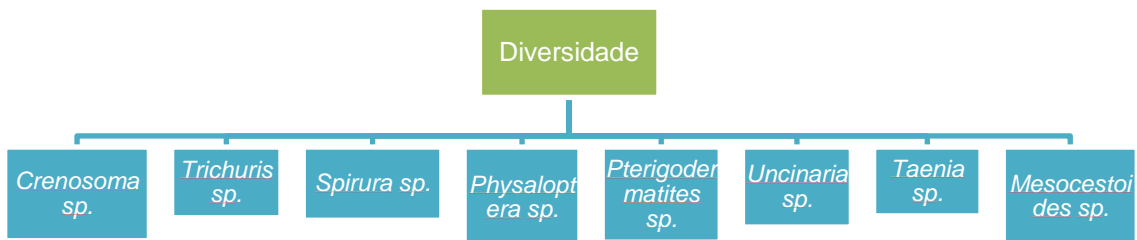


Gráfico 8: Diversidade de endoparasitas.

Contudo, comparando os nossos resultados mais uma vez com Simões (2009), estudo realizado no Alentejo e Algarve, que identificou 21 géneros diferentes, a biodiversidade encontrada é semelhante. Em termos percentuais, esta diferença é de 20,71% (tabela 9) mas há que lembrar a diferença entre o volume de cada amostra (94 animais em Simões, 2009 para 30 animais no presente estudo) e áreas geográficas abordadas (Alentejo e Algarve em Simões, e apenas a região de Évora neste estudo).

Hospedeiros	Simões, 2009	Ribeiro, 2016
Fuinha	7,45% (7)	16,67% (5)
Sacarrabos	7,45% (7)	16,67% (5)
Gineta	18,09% (17)	13,33% (4)
Raposa	47,87% (45)	13,33% (4)
Texugo	3,19% (3)	10% (3)
Lontra	-	6,67% (2)
<b>Total</b>	<b>84,04% (79)</b>	<b>63,33% (19)</b>

Tabela 9: comparação de resultados entre o presente trabalho (vermelho) com outros estudos realizados (azul), relativamente aos endoparasitas. A verde apresentam-se os resultados que, entre os dois estudos, mais se aproximam. Em numerário apresenta-se o número de animais e em percentagem as prevalências.

No que toca a cada espécie animal, a gineta foi o animal em que os valores mais se aproximaram da bibliografia, seguindo-se o texugo. Em relação a este último e ao sacarrabos, Simões (2009) refere que a sua amostra (seis texugos e sete sacarrabos) é muito reduzida para que os seus valores sejam considerados representativos da espécie. O mesmo ocorreu com as nossas amostras (três texugos, sete fuinhas, seis sacarrabos, quatro ginetas, cinco raposas e cinco lontras). Simões (2009) refere ainda que a recente colonização da Península Ibérica pelo sacarrabos, e a sua especificidade parasitária, que pensa-se ser elevada, possam estar na origem de prevalências reduzidas nesta espécie de carnívoro, em relação aos endoparasitas (Correia & Cidadão, 1991 referido por Simões, 2009). De facto, tanto num como noutro estudo, as prevalências foram baixas. No entanto, seria necessária uma amostra maior para se poder comparar os resultados com a bibliografia. Em relação às lontras, Torres *et al* (2004), referem que a fauna helmíntica deste mustelídeo nesta área geográfica é pobre em comparação com o leste europeu e igualmente muito reduzida quando em comparação com outros mustelídeos aquáticos. Isto, só por si, pode explicar os nossos resultados relativos a este hospedeiro (nenhum helminte foi observado). No entanto, os mesmos autores referem ainda que o melhor método de estudo nesta espécie, é a cultura a partir de fezes frescas, o que não se realizou no nosso trabalho

#### 4.1.3.1. Nematodas pulmonares:

No grupo dos nematodas pulmonares foi identificada apenas uma espécie (*Crenosoma vulpis*) em dois hospedeiros (uma raposa recolhida no Verão e um sacarrabos no Outono). Larvas pulmonares foram também observadas noutros dois hospedeiros (numa raposa e num texugo ambos recolhidos no Verão) mas as espécies não foram identificadas. Percentualmente, 13,33% (quatro) dos animais foram positivos para a presença deste grupo de parasitas (tabela 2). Em metade dos animais positivos (dois animais) foi observado *Crenosoma vulpis* (gráfico 9). A outra metade encontrava-se infetada com larvas pulmonares

(gráfico 9). Os parasitas pulmonares apenas foram encontrados em animais capturados no Verão e Outono (tabela 4, gráficos 3 e 4).

### Nematodas pulmonares

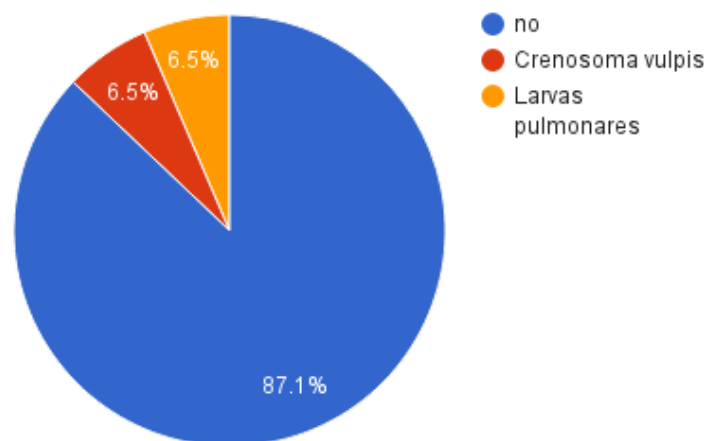


Gráfico 9: Nematodas pulmonares. No – não observada nenhuma forma parasitária pulmonar (16 animais); *Crenosoma vulpis* (2 animais); Larvas pulmonares (2 animais).

Comparando estes valores com os calculados por Simões (2009) para a mesma região, observamos que para a espécie *Crenosoma vulpis*, os valores são semelhantes (1,06%, para os nossos 3,33%), tendo sido identificada em uma raposa. Em Colonnello (2010) esta espécie foi igualmente identificada numa única raposa, tendo sido a prevalência ligeiramente superior à nossa (5,88% face aos nossos 3,33%). Simões (2009) identificou duas outras espécies, *Filaroides martis* em cinco sacarrabos (71,43%) e *Capillaria aerophila* em quatro raposas (8,33%) (tabela 10), as mesmas espécies observadas por Colonnello (2010) no Algarve, colocando a hipótese de serem espécies mais prevalentes nessa zona do país e não em Évora. O total de parasitismo por nematodas pulmonares em Simões (2009) foi de 10,64% (dez animais), valor ao qual os nossos resultados se aproximam, com 13,33% (quatro animais) (tabela 10).

Hospedeiros	Simões, 2009	Ribeiro, 2016
Fuinha	0% (0)	0% (0)
Sacarrabos	71,43% (5)	6,67% (2)
Gineta	0% (0)	0% (0)
Raposa	10,42% (5)	3,33% (1)
Texugo	0% (0)	3,33% (1)
Lontra	-	0% (0)
<b>Total</b>	<b>10,64% (10)</b>	<b>13,33% (4)</b>

Tabela 10: comparação de resultados entre o presente trabalho (vermelho) com outros estudos realizados (azul), relativamente aos nematodas pulmonares. Em numerário apresenta-se o número de animais e em percentagem as prevalências.

Os nossos resultados (tabela 10) parecem revelar uma tendência dos hospedeiros raposa e sacarrabos para apresentares este tipo de parasitismo, o que se demonstra na bibliografia consultada para a região geográfica (Simões, 2009). Torres *et al.* (2001), Milan *et al.* (2004) e Rosalino (2008) explicam que isto se deve ao fato de estas serem espécies mais sociais (maior número de animais por toca), incluindo o texugo (Simões, 2009), facilitando a transmissão oro-nasal deste tipo de parasitas.

#### 4.1.3.2. Parasitas gastrointestinais:

No grupo dos endoparasitas foram observados parasitas pertencentes ao filo Nematoda, Cestoda e Apicomplexa, em 19 animais (63,33% dos 30 animais necropsiados).

A presença de parasitas gastrointestinais foi identificada na maioria (19) dos animais necropsiados (gráfico 10), nomeadamente através da técnica coprológica de flutuação (gráfico 11). Estas foram consistentemente as formas parasitárias mais frequentemente encontradas ao longo do ano, tendo maior incidência no Verão (cinco) e Outono (cinco) (tabela 4, gráficos 4 e 5); dentro das quais as mais frequentes foram os ovos tipo estrangilo, seguindo-se os nematodas adultos e os Cestoda, respetivamente (gráfico 12).

#### **Parasitas gastrointestinais**

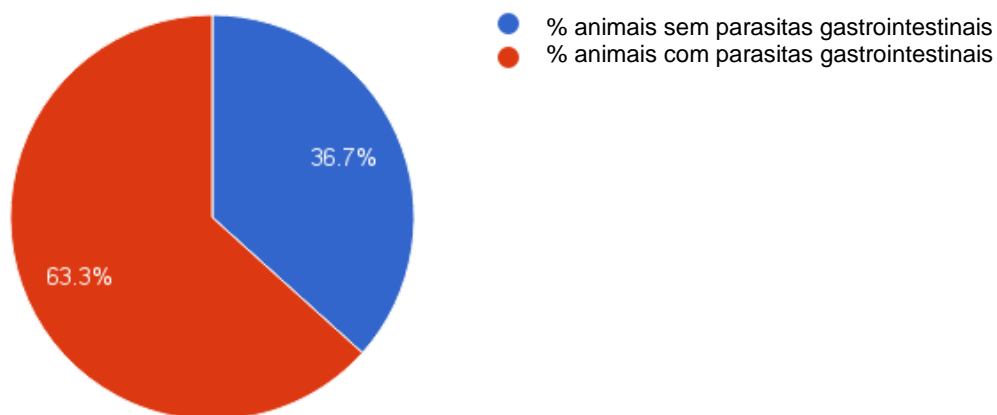


Gráfico 10: Presença de parasitas gastrointestinais.



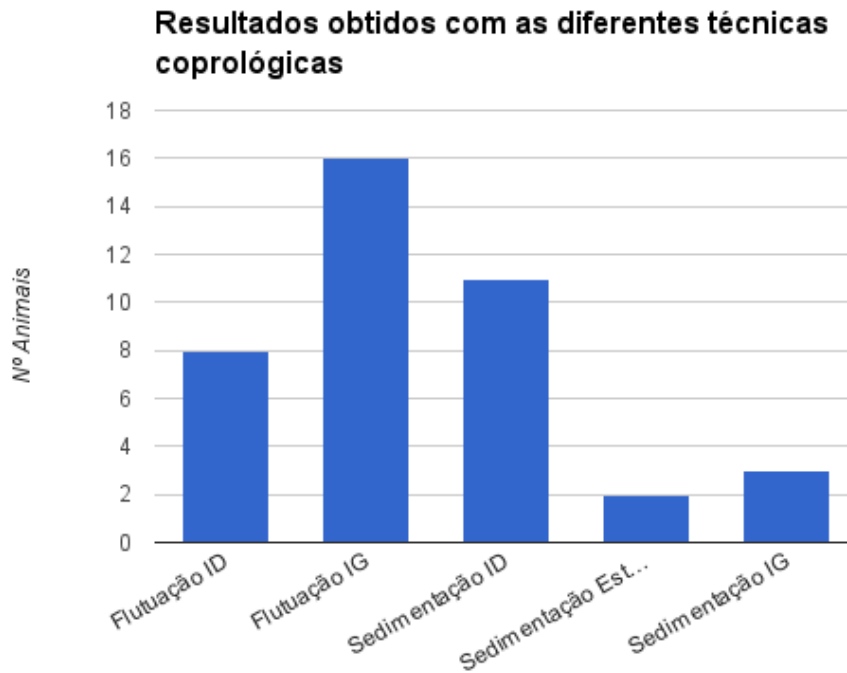


Gráfico 11: Análises parasitológicas positivas para parasitas gastrointestinais. ID: intestino delgado; IG: intestino grosso; Est.: estômago.

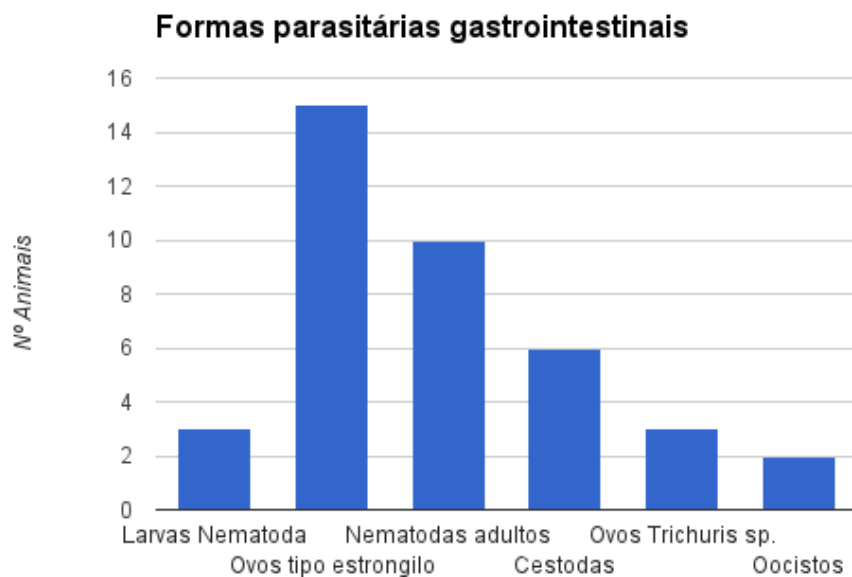


Gráfico 12: Formas parasitárias gastrointestinais identificadas nos animais necropsiados

#### 4.1.3.2.1. Nematoda;

Quanto aos nematodas gastrointestinais foram observadas quatro formas [ovos tipo estrongilo, ovos tipo *Trichuris* sp., estadios larvares (L1 a L3) e formas adultas] em 13 dos 19

animais parasitados com endoparasitas gastrointestinais (68,42%) e em cinco das seis espécies de animais necropsiadas (texugo, gineta, raposa, fuinha e sacarrabos) (tabela 11).

Endoparasitas GI: 63,33% (19)	Nematoda: 68,42% (13)	Formas larvares:	
		23,08% (3)	
		Ovos tipo estrogilo:	
		100% (13)	
		Ovos <i>Trichuris sp.</i> :	
		23,08% (3)	
		Formas adultas:	Ordem Spirurida:
		76,92% (10)	40% (4)
			<i>Uncinaria stenocephala</i> :
			30% (3)
			60% (3) do total de raposas

Tabela 11: resultados referentes aos Nematoda gastrointestinais. GI: gastrointestinais. Em numerário apresenta-se o número de animais e em percentagem as prevalências.

Em relação às formas adultas, 40% (quatro) correspondem a animais parasitados com nematodas da ordem Spirurida (espécie não identificada numa fuinha recolhida no Outono, *Spirura rytipleurites rytipleurites* num texugo recolhido durante o Verão, *Physaloptera praeputialis* numa gineta recolhida no Inverno e por fim, *Pterigodermatites sp.* numa raposa recolhida no Verão). As fezes destes animais apresentavam também ovos tipo estrogilo embrionados associados à forma adulta, assim como os hospedeiros intermediários no conteúdo estomacal (insetos como grilos no caso do texugo, raposa e fuinha, e pequenos roedores como o rato comum no caso da gineta).

Nematodas da espécie *Uncinaria stenocephala* foram também observados, no intestino de três raposas (60% do número total de raposas necropsiadas), recolhidas no Verão, Outono e Inverno. Estas apresentavam também ovos tipo estrogilo nas fezes como seria expectável (figura 11).



Figura 11: ovo tipo estrogilo em raposa, com uma ampliação de 100X.

Em Eira *et al.* (2006) o valor da prevalência deste parasita em raposas, em Dunas de Mira (Norte litoral de Portugal) foi de 88%, e no Algarve de 82,35 (Colonello, 2010) mas os valores

calculados por Simões (2009) (Alentejo e Algarve) de 77,42% são mais próximos dos nossos (60%). Assim, é presumível que os nossos valores sejam os que mais se aproximam da realidade Eborense, uma vez que zonas perto do litoral apresentam valores superiores a 80% e Simões (2009), que abrangeu tanto o Algarve como o Alentejo, apresenta valores intermédios entre os nossos e os de Eira *et al.* (2006) e Colonello (2010). No entanto, seria necessária uma amostra superior para chegar a um valor de prevalência estatisticamente representativo. Este é um parasita de interesse em Saúde Pública, uma vez que as larvas (L3) deste parasita têm a capacidade de infetar *per cutem*, causando no homem a síndrome *larvae migrans* cutânea. Nestes casos, as larvas não continuam o seu desenvolvimento, mas migram pela epiderme do homem (causando inflamação), por vezes vários centímetros por dia. Algumas larvas podem persistir em tecidos mais profundos, após a sua migração pela pele. Ocasionalmente, podem também migrar até ao intestino humano, causando enterite eosinofílica (AAVP, 2014d; CDC).

É de referir que, apesar de terem sido identificados ovos na técnica de flutuação (figura 12), não foram observadas formas adultas de *Trichuris* sp., possivelmente devido à fina espessura deste parasita, o qual não terá resistido aos processos de congelação e descongelação dos cadáveres, assim como à natural deterioração dos mesmos.



Figura 12: ovo *Trichuris* sp. em texugo, com uma ampliação de 100X.

#### 4.1.3.2.2. Cestoda:

Nos cestodes, foram observados dois géneros diferentes, *Taenia* em cinco animais (uma fuinha e um texugo na Primavera, uma gineta no Outono e duas no Inverno) e *Mesocestoides* numa raposa (Verão) (tabela 12).

Endoparasitas GI: 63,33% (19)	Cestoda: 31,56% (6)	<i>Taenia</i> sp.:
		<i>Mesocestoides</i> sp.:
		83,33% (5)
		16,67% (1)

Tabela 12: resultados referentes aos Cestoda. GI: gastrointestinais. Em numerário apresenta-se o número de animais e em percentagem as prevalências.

#### 4.1.3.2.2.1. Género *Taenia*:

Relativamente ao género *Taenia*, a prevalência em ginetas foi superior à bibliografia para uma região geográfica próxima (Simões, 2009). Em 75% das ginetas da nossa amostra foi identificado o cestode, ao passo que na bibliografia apenas 30% estavam infetadas. Colonnello (2010) apresentou prevalências de 31,58% para *Taenia* sp. e 47,37% para *Taenia taeniformis*, nesta espécie de hospedeiro na região do Algarve. Mais uma vez esta será provavelmente a razão dos valores de Simões (2009) serem inferiores aos nossos. Aqui, além das diferenças geográficas, há que lembrar também a diferença no volume de amostras. No nosso estudo apenas foram necropsiadas quatro ginetas, três das quais continham o género *Taenia* ao passo que em Simões (2009) foram necropsiadas 20 ginetas, quatro das quais continham o parasita e em Colonnello (2010) 19 ginetas, nove com *Taenia taeniformis* e seis com *Taenia* sp. cuja espécie não foi identificada. A fuinha foi o hospedeiro em que as prevalências mais se aproximaram com a bibliografia, de 14,29% na nossa amostra para 15% em Simões (2009) e 16,66% em Colonnello (2010). Outra discrepância entre os três estudos foi relativamente ao texugo. Na bibliografia referida (Simões, 2009 e Colonnello, 2010) e na compilação de artigos por Rosalino (2008), não foi referido o género *Taenia* em texugos, mas Colonnello (2010) menciona as espécies *T. hydatigena*, *T. taeniformis*, *T. crassiceps* e *T. pisiformis* tendo o texugo como um dos possíveis hospedeiros. No nosso estudo o género em questão foi observado em apenas um animal (33,33%).

#### 4.1.3.2.2.2. *Mesocestoides*:

O género *Mesocestoides* foi apenas observado numa raposa, traduzindo-se numa prevalência de 20% nesta espécie. Este valor é muito próximo do calculado em Simões (2009) para a espécie *Mesocestoides lineatus* (19%), sendo que esta foi a espécie com maior representatividade no trabalho referido, os nossos valores podem ser considerados igualmente próximos da realidade. Estes valores são igualmente próximos dos calculados por Colonnello (2010), onde a autora identificou a espécie *Mesocestoides lineatus* em três raposas, com uma prevalência de 17,64%.

Ambos os géneros de cestodes identificados são de importância em Saúde Pública, uma vez que o homem é um possível hospedeiro para estes parasitas (CDC).

#### 4.1.3.2.3. Apicomplexa:

Quanto a este filo, foram apenas identificados oocistos (figura 13) em duas lontras e em número muito reduzido (um em cada animal) através da técnica de flutuação.



Figura 13: Oocisto em lontra, com uma ampliação de 400X.

Uma vez que as espécies não foram identificadas, coloca-se a possibilidade de se tratar de um pseudo-parasitismo, procedente da alimentação piscívora deste hospedeiro. Possibilidade essa que é corroborada pela ausência de menção de parasitas Apicomplexa na bibliografia referente a este hospedeiro, na nossa zona geográfica (Simões, 2009; Torres *et al.*, 2004). Estes dois casos correspondem a 10,53% do total de animais necropsiados com endoparasitas.

#### 4.2. Técnicas de coprologia:

As técnicas *Willis* e *Hoffman-Pons-Janer* são as mais comumente utilizadas em parasitologia. No entanto, têm sido realizados estudos para identificar as técnicas mais eficazes. Coelho *et al.* (2015), realizaram um estudo comparando a eficácia de cinco técnicas diferentes para o diagnóstico de parasitas gastrointestinais em cães. As técnicas estudadas, além da *Willis* e da *Hoffman-Pons-Janer*, foram a técnica de flutuação por centrifugação com solução saturada de sulfato de zinco, a técnica de flutuação por centrifugação com solução saturada de açúcar e uma nova técnica denominada por *TFGII/dog* (método laboratorial de enriquecimento e redução de impurezas fecais para diagnóstico de enteroparasitoses humanas e animais) e descrita por Falcão *et al.* (2011). Numa amostra de 50 cães naturalmente infetados, tanto a nova técnica como a técnica *Hoffman-Pons-Janer* obtiveram um resultado de 80% de positividade, *Willis* obteve um nível de positividade mais baixo (74%) e as outras duas técnicas obtiveram 78%. Contudo, num outro estudo comparativo, realizado por Santana *et al.* (2015), entre as técnicas *Willis*, *Hoffman-Pons-Janer* e flutuação modificada por centrifugação, num total de 285 amostras fecais caninas, 56,49% foram positivas para a presença de parasitas intestinais. Deste total, 44,21% foram detetadas utilizando a técnica *Willis*, 45,14% pela técnica de centrifugação e 31,57% pela técnica *Hoffman-Pons-Janer*. Perante estes resultados os autores do estudo aconselham a utilização da técnica de flutuação modificada por centrifugação, em associação com a técnica *Willis*. No entanto, uma vez que a diferença de resultados entre a técnica de *Willis* clássica e a técnica de *Willis* com centrifugação é de apenas 0,93%, devido à sua simplicidade e praticabilidade, neste trabalho optámos pela primeira.

#### 4.3. Esfregaços de medula óssea para pesquisa de *Leishmania infantum*:

Dos 30 animais necropsiados, foram realizados esfregaços de medula óssea por aspiração a 29 animais, para pesquisa de *L. infantum* (anexo 5). Em 13 animais não foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania infantum* e 16 animais obtiveram resultados inconclusivos (anexo 5). Nestes foram observadas formas suspeitas, mas em número insuficiente para obter um diagnóstico conclusivo.

As amostras recolhidas para os esfregaços provieram, na sua grande maioria, de animais previamente congelados, numa congelação lenta a -18°C. Uma vez que este tipo de congelação danifica as células, nomeadamente através do rompimento das membranas lipídicas e das proteínas (FAO; Gava, 2007), as células presentes nos esfregaços refletiram isso. A maior parte das células encontravam-se lisadas, existindo também contaminação bacteriana, o que dificultou a análise destes esfregaços e contribuiu para um número elevado de resultados inconclusivos (53,33%). Os esfregaços de aposição de fígado e baço não foram analisados neste projeto, tendo em conta os objetivos do presente trabalho.

Os resultados obtidos nos esfregaços de medula óssea revelam a necessidade de obtenção de amostras a partir de cadáveres frescos, a fim de facilitar a observação e obter resultados mais fidedignos. O número total de animais analisados, mais uma vez, é reduzido para formar conclusões representativas da realidade populacional destes carnívoros silvestres.

#### 4.4. PCR *real time*:

As 38 amostras (8 ginetas, 10 raposas, 10 fuinhas e 10 sacarrabos) de pele (pavilhão auricular) às quais se procedeu à pesquisa de *Leishmania infantum* por PCR *real time* obtiveram todos resultados negativos (figura 14).

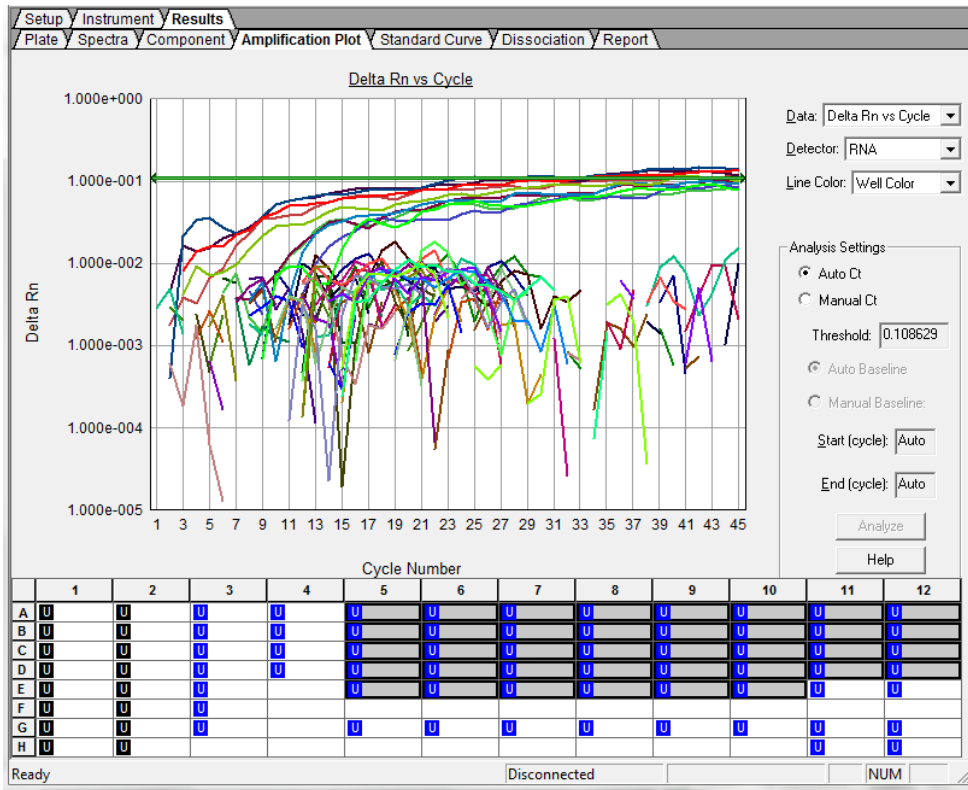


Figura 14: Resultados do PCR real time de 38 amostras de tecido do pavilhão auricular de carnívoros silvestres.

Uma vez que o coeficiente de extração de ADN se encontrou dentro dos valores padrão 1,80 e 2,00, que a curva *standard* apresentou um coeficiente de reta R próximo de 1,0 e que o valor de slope se encontrou entre -3,6 e -3,4 (figura 15) (Helhazar *et al.*, 2013), considera-se que a extração de ADN foi realizada com sucesso e em quantidade suficiente. Assim, estes resultados negativos do teste de PCR são confiáveis.

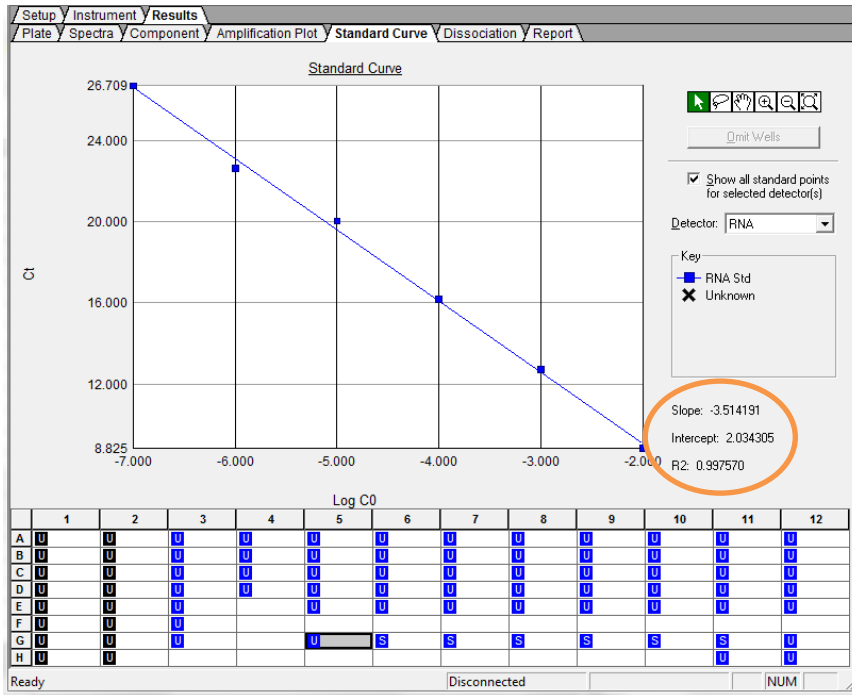


Figura 15: Curva *standard* de amplificação.

Os controlos positivos (figura 16) e negativos (figura 17) resultaram em curvas de amplificação esperadas, o que suporta a fiabilidade dos resultados obtidos.

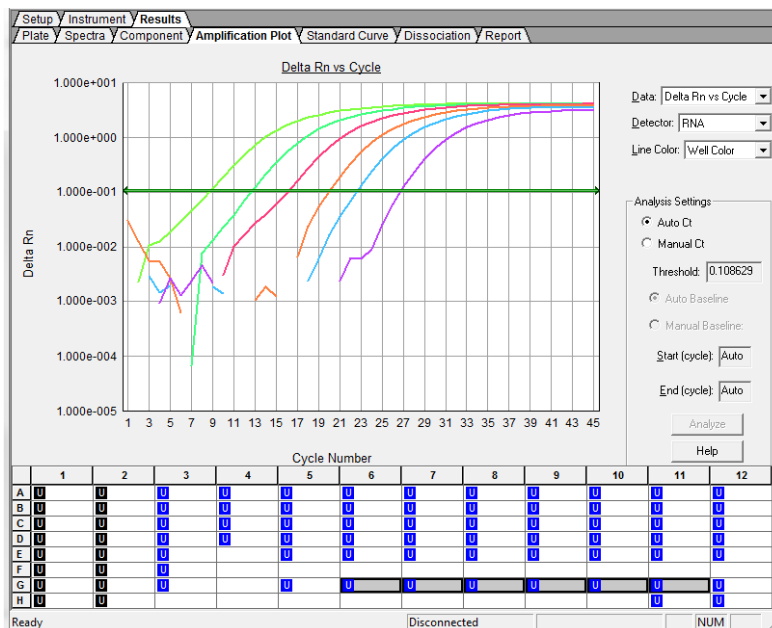


Figura 16: Controlos positivos do qPCR.



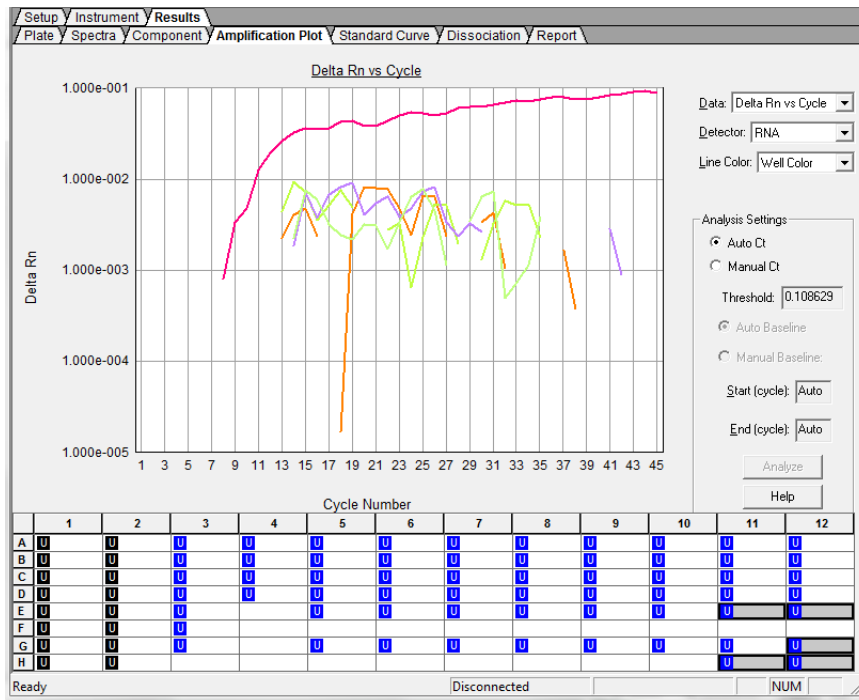


Figura 17: Controlos negativos do qPCR.

Os resultados negativos para a presença de ADN de *L. infantum*, nas amostras analisadas, podem ser indicativos de uma inexistência ou fraca inoculação do parasita pelos flebótomos, nos pavilhões auriculares. Contudo, o número das amostras analisado é pequeno para avaliar se a escolha desta amostra de tecido para a pesquisa de *L. infantum* é a mais indicada em carnívoros silvestres e, idealmente, estes resultados seriam comparados com resultados de qPCR a partir de outros tecidos, como baço ou fígado à semelhança de outros trabalhos (Helhazar *et al.*, 2013; Sobrino *et al.*, 2008).

Sobrino *et al.* realizaram um estudo em 2008 para determinar a prevalência de infeção por *Leishmania infantum* em carnívoros silvestres em Espanha, analisando 217 amostras por PCR e *western blotting*, e polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) para comparar os padrões presentes nos carnívoros silvestres com os presentes nos cães domésticos da mesma área. O ADN do parasita foi detetado em amostras de baço e de sangue, de 35 (16,12%) carnívoros analisados, incluindo 8 de 39 (20,5%) lobos (*Canis lupus*), 23 de 162 (14,1%) raposas, 2 de 7 (28,6%) sacarrabos, 1 de 4 ginetas e 1 de 4 lincos ibéricos (*Lynx pardinus*). Neste estudo não foram identificadas diferenças significativas entre sexo e idades nos hospedeiros lobo ou raposa ( $P > 0,05$ ), mas foi registada uma diferença significativa entre regiões geográficas nas raposas ( $P < 0,05$ ). Este foi o primeiro estudo sobre *Leishmania sp.* em carnívoros silvestres em diferentes regiões de Espanha por PCR e, nele, a prevalência de infeção indicou a existência de infeção natural em populações de carnívoros silvestres sem sinais clínicos, sugerindo assim a existência de um ciclo silvático independente do doméstico.

## 5. Conclusões:

Um problema identificado ao longo de todo o trabalho foi o número reduzido de animais avaliados. Durante os meses mais frios e de chuva os animais apresentaram pouca atividade. Uma vez que apenas trabalhámos com cadáveres provenientes de acidentes de viação na região de Évora, o nosso número total de animais foi reduzido. Adiciona-se ainda o fato de muitos dos cadáveres encontrados na estrada se apresentarem em péssimas condições, inviabilizando a prática de necrópsia.

Neste estudo foi clara a tendência para uma maior prevalência do parasitismo durante os meses mais quentes do ano, nomeadamente por ixodídeos no grupo dos ectoparasitas e por nematodas no grupo dos endoparasitas. Foi interessante, observar a maior prevalência da espécie *Pulex irritans* face a outras espécies de pulgas e artrópodes no geral, mencionadas na bibliografia; e a maior prevalência de *Uncinaria stenocephala* na classe dos nematoda, nomeadamente nas raposas. Foi também curioso o fato de nenhum dos animais necropsiados apresentar lesões parasitárias.

Este foi o primeiro estudo onde a lontra foi incluída entre os outros carnívoros da Península Ibérica. A diferença na sua alimentação, maioritariamente piscívora, e *habitat* semi-aquático, foi evidente nos resultados obtidos.

Consideramos ser de interesse veterinário avaliar um maior número de animais ao longo do ano por necrópsia, assim como analisar também amostras de pele e baço por qPCR, a fim de perceber se o parasita *Leishmania infantum*, após inoculação, persiste no sistema destes animais. O objetivo seria clarificar se estes animais silvestres desempenham algum papel importante no ciclo de vida do parasita e se poderão ser considerados hospedeiros reservatório, numa zona que não só é endémica para a Leishmaniose canina, como possui uma forte ligação com o meio rural e vida silvestre.

## 6. Bibliografia:

AAVP (American Association of Veterinary Parasitologists) (2014c) – *Aonchotheca putorii*, acedido através da ligação <http://www.aavp.org/wiki/nematodes/aphasmidida/aonchotheca-putorii/> no dia 23/01/2017 às 16h43.

AAVP (American Association of Veterinary Parasitologists) (2014b) – *Ancylostomatoidea*, acedido através da ligação <http://www.aavp.org/wiki/nematodes/strongylida/ancylostomatoidea/> no dia 18/01/2016 às 16h14.

AAVP (American Association of Veterinary Parasitologists) (2014a) – *Strongylida*, acedido através da ligação <http://www.aavp.org/wiki/nematodes/strongylida/> no dia 18/01/2016 às 15h13.

AAVP (American Association of Veterinary Parasitologist) (2014d) – *Uncinaria stenocephala*, acedido através da ligação <http://www.aavp.org/wiki/nematodes/strongylida/ancylostomatoidea/uncinaria-stenocephala/> no dia 18/01/2016 às 16h37.

Aguirre AA (Eds): *Conservation medicine: ecological health in practice*. New York: Oxford University Press; 2002:8-16.

Aguirre AA (2009b) Parasitic diseases in wildlife and domestic animals: new trends of disease emergence. In *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*. Edited by Lefèvre P-C, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G, France: Lavosier, in press.

Aguirre AA (2009a) Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective, 1-7, doi 10.1186/1756-3305-2-S1-S7.

Aguirre AA, Starkey EE, Hansen DE (1995) Wildlife diseases in national park ecosystems. *Wildl Soc Bull*, 23:415-419.

Aguirre AA, Tabor GM (2008) Global factors driving emerging infectious diseases: Impact on wildlife populations. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149:1-3.

Aguirre AA, Tabor GM (2004) Marine vertebrates as sentinels of marine ecosystem health. *EcoHealth*, 1:236-238.

Ascensão F, Mira A (2006) Impactes das Vias Rodoviárias na Fauna Silvestre – Relatório Final. pp: 36. Acedido através da ligação: [http://www.infraestruturasdeportugal.pt/sites/default/files/miraascensao\\_impactes\\_das\\_vias\\_rodoviaras\\_n.pdf](http://www.infraestruturasdeportugal.pt/sites/default/files/miraascensao_impactes_das_vias_rodoviaras_n.pdf), no dia 05/01/2017 às 00:59.

Baneth G, Solano-Gallego L (2012) Leishmaniasis. In *Infections Diseases of the Dog and Cat* ed. Greene CE, Elsevier, EUA, pp. 734-743.

- Barcia JJ (2007) The Giemsa stain: its history and applications. doi: PMID:17652540.
- Beck A, Beck R, Kusak J, Gudán A, Martinkovic F, Artukovic B, Hohsteter M, Huber D, Marinculic A, Grabar Z (2008) A case of visceral leishmaniasis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *J Wildl Diseases*, 44(2):451-456.
- Bhide MR, Travnicek M, Levkutova M, Culik J, Revajova V, Levkut M (2005) Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 43(2): 165-172.
- Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Petersen CA (2011) Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. doi: 10.1371/journal.pntd.0001019.
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M (2001) Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice. doi: 10.1128/CDLI.8.4.828-831.2001.
- Brickner I (2002) The impact of domestic dogs (*Canis familiaris*) on wildlife welfare and conservation. Revisão bibliográfica submetida para Prof. Yoram Yom-Tov, Israel, 1-25. Acedido através da ligação <http://www.tau.ac.il/lifesci/zoology/members/yom-tov/inbal/dogs.pdf> no dia 02/12/2015 às 20h43.
- Bronson E, Emmons LH, Murray S, Dubovi EJ, Deem SL (2008) Serosurvey of pathogens in domestic dogs on the border of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia. *J Zoo Wildl Med*, 39(1), pp. 28-36.
- Buckland PC; Sadler JP (1989) A biogeography of the human flea, *Pulex irritans* L. (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Biogeography*. 16 (2): 115–120. doi:10.2307/2845085.
- CAPC (Companion Animal Parasite Council), Vector-borne diseases – canine leishmaniasis (canine leishmaniosis) (2014). Acedido através da ligação <https://www.capcvet.org/capc-recommendations/canine-leishmaniasis>, no dia 04/01/2017 às 23h43.
- Cardoso CVP (2002) Técnica de necrópsia. In *Animais de laboratório: criação e experimentação* ed. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, Editora Fio Cruz, Rio de Janeiro, ISBN: 85-7541-015-6, pp. 331-335.
- Carreno RA, Nadler SA (2003) Phylogenetic Analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) Inferred from Ribosomal RNA Gene Sequences. *J. Parasitol.*, 89 (5), pp. 967-973.
- Carvalho GLX, Moreira LE, Pena JL, Marinho CC, Bahia MT, Machado-Coelho JLL (2012) A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-

Moraes coprologic methods for the detection of human parasitoses. doi: 10.1590/S0074-02762012000100011

Cassini R (2008) Aspetti epidemiologici e rischi zoonosici delle malattie trasmesse da vettori: babesiosi e leishmaniosi in Italia nord-orientale. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Padua. URL: <http://paduaresearch.cab.unipd.it/794/>.

Catalano S, Lejeune M, Paridon B, Pagan C, Wasmuth J, Tizzani P, Duignan P, Nadler S (2015) Morphological variability and molecular identification of *Uncinaria* spp. (nematoda: *Ancylostomatidae*) from grizzly and black bears: new species or phenotypic plasticity?, *J. Parasitol.*, 101(2), 2015, pp. 182–192, *American Society of Parasitologists*. doi: 10.1645/14-621.1.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/parasites>, USA Government.

Chowdhury N, Aguirre AA (2001) Helminths of wildlife: a global perspective. Enfield, NH, USA: Science Publishers, Inc.

Coelho WMD, Gomes JF, Falcão AX, Santos BM, Soares FA, Suzuki CTN, Amarante AFT, Bresciani KDS (2015) Comparative study of five techniques for the diagnosis of canine gastrointestinal parasites. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015032>.

Colonnello S (2010) Carnívori selvatici del Portogallo: indagine parassitologica ed identificazione molecolare di nematode respiratori. Tesi di Laurea in Parassitologia degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Itália. pp. 2-77.

Correia CP, Cidadão AJ (1991) Portugal Animal. *Círculo de Leitores/Publicações Dom Quixote*, Portugal. pp. 106-255.

Cosivi O, Meslin FX, Daborn CJ, Grange JM (1995) Epidemiology of Mycobacterium bovis infection in animals and humans, with particular reference to Africa. *Rev Sci Tech* 14: 733-746.

Criado-Fornelio A, Gutierrez-Garcia L, Rodriguez-Caabeiro F, Reus-Garcia E, Roldan-Soriano MA, Diaz-Sanchez MA (2000) A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol*, 92(4), pp. 245-251.

Cunningham AA, Daszak P, Rodriguez JP (2003) Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *J. Parasitol*, 89(Suppl.), pp. S78-S83.

Davidson WR, Lockhart JM, Stallknecht DE, Howerth EW (1999) Susceptibility of red and grey foxes to infection by *Ehrlichia chaffeensis*. *J Wildl Diseases*, 35(4), pp. 696-702.

Dawes B (1968) Some trematodes of mammals. In *The Trematoda with special reference to British and other European forms*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo, Delhi, Tokyo, Mexico City. 11 – pp.395; 400.

Dey A, Singh S (2006) Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J Med Microbiol*. 24(3):165-70. PMID:16912434

Diagnostic Clinical Parasitology Service Laboratory (2009) University of Tennessee College of Veterinary Medicine Knoxville, Tennessee 37996-4543

Domínguez G (2003) Ectoparasitos de los Mamíferos silvestres del Norte de Burgos (España). *Galemys* 15: 47-60.

Durette-Desset MC, Pesson B (1987) *Molineus patens* (Dujardin, 1845) (Nematoda, Trichostrogylidae) et autres espèces décrites sous ce nom. *Ann Parasitol Hum Comp* 62: 326-344

Eira C, Vingada J, Torres J, Miquel J (2006) The helminth community of red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effects on host condition. *Wildl. Biol. Pract.* 2 (1), pp-26-36.

Evers HV, Kocan AA, Reichard MV, Meinkot JH (2003) Experimental *Babesia gibsoni* infection in coyotes (*Canis latrans*). *J Wildl Diseases*, 39(4), pp. 904-908.

Falcão AX, Gomes JF, Hoshino-Shimizu S, Suzuki CTN. (2014) Método de preparação de amostra coproparasitológica fecal e composição clarificante. doi: <http://www.google.com/patents/WO2011044649A1?cl=pt&hl=pt-BR>.

FAO (Food and Animal Organization), Basic Principles of Cryopreservation (Section 7), pp. 85-86. Disponível *online* em: <http://www.fao.org/docrep/016/i3017e/i3017e04.pdf>

Fauna Europaea - Fauna Europaea, All European Animal Species Online: <http://www.fauna-eur.org/> (museum für naturkunde berlin).

Fishman Z, Gonen L, Harrus S, Strauss-Ayali D, King R, Baneth G (2004) A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. *Veterinary Parasitology*, 119(1), pp. 21-26.

Forrester DJ (1992) Parasites and diseases of wild mammals in Florida. Gainesville, USA: *University Press of Florida*.

Freitas E, Melo MN, Costa-Val AP, Michalik MSM (2006) Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Elsevier. Veterinary Parasitology*. Volume 137, 1–2, pp. 159–167.

Gava AJ (2007) Métodos de congelação. In Princípios de tecnologia de alimentos. Ed. Nobel, AMPUB Comercial Ltda, São Paulo, Brasil, pp: 225 e 231.

Green JS, Gibson PS (1994) Feral Dogs: The Handbook: Prevention and Control of Wildlife Damage. Paper 35. doi: <http://digitalcommons.unl.edu/icwdmhandbook/35>

Halliday RB, OConnor BM, Baker AS (2000) Global Diversity of Mites. In Raven PH; Williams T. *Nature and human society: the quest for a sustainable world: proceedings of the 1997 Forum on Biodiversity*. National Academies. pp. 192–212.

Hancox M (1980) Parasites and infectious diseases of the Eurasian badger (*Meles meles* L.): a review. *Mamm Rev* 10: 151-162.

Heidrich J, Schonberg A, Steuber S (1999) Investigation of skin samples from red foxes (*Vulpes vulpes*) in eastern Brandenburg (Germany) for the detection of *Borrelia burgdorferi* s. l. *Zbl Bakt-Int J Med Microbiol*, pp. 289, 666-672.

Helhazar M, Leitão J, Duarte A, Tavares L, Fonseca IP (2013) Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra -Portugal. doi: 10.1186/1756-3305-6-88.

IASZoology.com - Nematelminthes classification, acedido através da ligação <http://www.iaszoology.com/nematelminthes-classification/>\_no dia 13/01/2016 às 15h06.

Khasnis AA, Nettleman MD (2005) Global warming and infectious disease. *Arch Med Res*, 36, pp. 689-696.

Kierdorf U, Kierdorf H, Konjević D, Lazar P (2006) Remarks on cranial lesions in the European polecat (*Mustela putorius*) caused by helminth parasites. *Veterinarski Arhiv* 76 (Suppl.), S101-S109.

Lin T, Gao LH, Seyfang A, Oliver Jr JH (2005) *Candidatus Borrelia texasensis*, from the American dog tick *Dermacentor variabilis*. *Int J Syst Evolut Microbiol*, 55, pp. 685-693.

Lindenfors P, Nunn CL, Jones KE, Cunningham A, Sechrest W, Gittleman JL (2007) Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. *Global Ecol. Biogeogr.*, pp. 1-14.

Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, Ecco R, Santos RL (2008) Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitol*, 155(1-2), pp. 146-151.

Majláthová V, Hurníková Z, Majláth I, Pe ko B (2007) *Hepatozoon canis* infection in Slovakia: Imported or autochthonous? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(2), pp. 199-202.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H (2004) Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. doi: 10.1128/JCM.42.11.5249–5255.2004.

Mohebbali M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhari M (2005) Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology*, 129(3-4), pp. 243-251.

Monrad, J (2011a) *Pulex irritans*. Departamento de Biologia de Doenças Veterinárias. Faculdade de Saúde e Ciências Médicas, Universidade de Copenhaga, Dinamarca.

Monrad, J (2011b) *Trichodectes canis*. Departamento de Biologia de Doenças Veterinárias. Faculdade de Saúde e Ciências Médicas, Universidade de Copenhaga, Dinamarca.

Neal E, Cheeseman C. *Badgers* (1996) London: T & A Poyser Ltd.

Nelson TA, Gregory DG, Laursen JR (2003) Canine heartworms in coyotes in Illinois. *J Wildl Diseases*, 39(3), pp. 593-599.

Olson PE, Kallen AJ, Bjorneby JM, Creek JG (2000) Canines as sentinels for Lyme disease in San Diego County, California. *J Vet Diagn Invest*, 12(2), pp. 126-129.

ONLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses: <http://www.onleish.org/index.php?article=25&visual=3>, MSD Saúde Animal, Portugal.

Otranto D, Capelli G, Genchi C (2009a) Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniasis vs dirofilariosis, pp. 1-7. doi 10.1186/1756-3305-2-S1-S2.

Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB (2009b) Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol*. doi: 10.1016/j.pt.2009.01.003.

Pain S (1997) The plague dogs. *New Science*, 154, pp. 32-37.

Pérez-Jiménez JM, Soler-Cruz MD, Benítez-Rodríguez R, Ruiz-Martínez I, DíazLópez M, Palomares F and Delibes M (1989) Phthiraptera from some wild carnivores in Spain. *Syst Parasitol* 15: 107-117.

Petithory JC, Ardoin F, Ash LR (2005) Rapid and inexpensive Method of Diluting Giemsa Stain for Diagnosis of Malaria and Other Infestations by Blood Parasites. doi: 10.1128/JCM.43.1.528.2005

Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, Baylis M (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol*, 3, pp. 171-181.



Pusterla N, Chang CC, Chomel BB, Chae JS, Foley JE, DeRock E, Kramer VL, Lutz H, Madigan JE (2000) Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in coyotes in California. *J Wildl Diseases*, 36(3), pp. 494-499.

Rausch RL, George JC, Brower HK (2007) Effect of climatic warming on the Pacific walrus, and potential modification of its helminth fauna. *J Parasitol*, 93, pp. 1247-1251.

Ribas A, Milazzo C, Foronda P, Casanova JC (2004) New data on helminths of stone marten *Martes foina* (Carnivora, Mustelidae), in Italy. *Helminthologia*, 41, 1: 59 – 61.

Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JÁ (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, pp. 57-60.

Rosalino LM (2008) Revisão dos parasitas e outros agentes infecciosos que afetam as populações ibéricas de um carnívoro social - O texugo euroasiático (*Meles meles*, Linnaeus 1758). *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária*, 2 (2008), pp. 9- 16.

Rosalino LM, Loureiro F, Macdonald DW, Santos-Reis M (2005) Dietary shifts of the badger *Meles meles* in Mediterranean woodlands: an opportunistic forager with seasonal specialisms. *Mamm Biol* 70: 12–23.

Rosalino LM, Macdonald DW, Santos-Reis M (2004) Spatial structure and land cover use in a low density Mediterranean population of Eurasian badgers. *Can J Zool* 82: 1493-1502.

Rosalino LM, Torres J, Santos-Reis M (2006) A survey of helminth infection in Eurasian badgers (*Meles meles*) in relation to their foraging behaviour in a Mediterranean environment in southwest Portugal. *Eur J Wildl Res* 52: 202–206.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Duncan RB Jr, Waki K, Chang KP, Lindsay DS (2003) Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. *J Eukaryot Microbiol*, 50(Suppl), pp. 691-693.

Santana BB, Silva TLB, Ramos RAN, Alves LC, Carvalho GA (2015) Evaluation of different parasitological techniques for diagnosing intestinal parasites in dogs. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2015.52003>.

Santi SA, Parker GH, Schaffner NP, Capodagli L, Persinger MA (2011) Prevalence, intensity, and geographic distribution of sinus worm (*Skrjabinylus nasicola*) infection in mink (*Mustela vison*) of central Ontario, *Canadian Journal of Zoology*, 84(7). doi: 1011-1018, 10.1139/z06-084

Sastre N, Francino O, Ramirez O, Ensenat C, Sanchez, Altet L (2008) Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from southwestern Europe. *Veterinary Parasitology*, 158(1-2), pp. 117-120.

Schallig HDFH, Cardoso L, Semião-Santos SJ (2013). Seroepidemiology of canine leishmaniasis in Évora (southern Portugal): 20-year trends. *Parasites & Vectors*; 6(100):1- 4. doi:10.1186/1756-3305-6-100

Semião-Santos S, Harith A, Ferreira E, Gusmão R (1995) Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. doi: 10.1007/BF00937115.

Seraydar K & Kaufman PE (2014) *Ctenocephalides canis*. Departamento de entomologia e nematologia. Universidade da Florida. EUA.

Shaw SE, Day, MJ (2005) *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*, London: Manson Publishing.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL (2009) Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.079.

Silva MM, Santos AS, Formosinho F, Bacellar F (2006) Carraças Associadas a Patologias Infecciosas em Portugal. Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa. *Acta Med Port*; 19; pp: 43-45.

Simões MP (2009) Parasitic diversity of wild carnivores and considerations on their Conservation. Tese de mestrado em biologia da conservação, Universidade de Évora, Portugal, pp.8-17.

Sréter T, Sréterné Lancz Z, Széll Z, Egyed L (2004) *Anaplasma phagocytophilum*: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and central Eastern Europe. *Ann Trop Med Parasitol*, 98(4), pp. 401- 405.

Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Triscioglio A, Gortázar C (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.003.

Storey J. (2012) Standard operating procedures for Giemsa malaria microscopy. WHO (World Health Organization).

Tabor GM, Ostfeld RS, Poss M, Dobson AP, Aguirre AA (2001) Conservation biology and the health sciences: defining the research priorities of conservation medicine. In *Research Priorities in Conservation Biology*. 2nd edition. Editado por Soulé ME, Orians GH. Washington, DC: *Island Press*, pp. 165-173.

Tabor GM, Aguirre AA: Ecosystem health and sentinel species (2004) adding an ecological element to the proverbial “canary in the mineshaft”. *EcoHealth*, 1, pp. 226-228.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2016) *Veterinary Parasitology* 4ªed., West Sussex, Reino Unido.

Merck - The Merck Veterinary Manual. Disponível para consulta em: <http://www.merckvetmanual.com/>

Milan J, Sevilla I, Gerrikagoitia X, Garcia-Peres A, Barral M (2004) Helminth parasites of the euroasian badger (*Meles meles* L.) in the Basque Country (Spain). *Eur. J. Wildl. Res* 50, pp. 37-40.

Rodriguez-Refojos C, Zabala J, Zuberogoitia I, Barral M (2006) Ectoparasitic charge of small carnivores and its sanitary implications. *Small Carnivore Conservation*. 35, pp. 33-34.

The Free Dictionary by Farlex, <http://www.thefreedictionary.com/family+Ancylostomatidae> (2003-2012 Princeton University, Farlex Inc.)

Torres J, Feliu C, Fernández-Morán J, Ruíz-Olmo J, Rosoux R, Santos-Reis M, Miquel J, Fons R (2004) Helminth parasites of the Eurasian otter *Lutra lutra* in southwest Europe. doi: <http://dx.doi.org/10.1079/JOH2004253>.

Torres J, Miquel J, Motjé M (2001) Helminth parasites of the Eurasian badger (*Meles meles* L.) in Spain: a biogeographical approach. doi: 10.1007/s10344-006-0033-7.

Universidade de Évora. Chaves para as famílias e géneros dos Ixodoidea representados na Península Ibérica. In *Chaves para identificação de interesse em Medicina Veterinária*. Adaptado de Tendeiro (1962), Travassos Santos Dias (1994), Sonenshine (1991) e Baker (1999). Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro. Departamento de Medicina Veterinária. Évora, Portugal.

Urquhart G M, Armour J, Duncan J L, Dunn A M, Jennings F W (1996) *Veterinary Helminthology*. In *Veterinary Parasitology* 2ªed., The Faculty of Veterinary Medicine, The University of Glasgow, Scotland, Blackwell Science.

Walker, J. B., Keirans, J. E. & Horak, I. G. (2000). *The Genus Rhipicephalus (Acari, Ixodidae): A guide to the Brown Ticks of the World*. (1th ed). New York

Waner T, Baneth G, Strenger C, Keysary A, King R, Harrus S (1999) Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. *Vet Parasitol*, 82(2), pp. 121-128.

WHO – World Health Organization (2010) Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's Guide, Second Edition.

Zajiček D (1987) Laboratory diagnosis of parasites in the Czech Socialist Republic in the period 1976-1986. IV Dogs, cats. Veterinarstvi 37: 549-550.

Anexos:

Anexo 1 - Lista de parasitas de carnívoros silvestres e seus hospedeiros na Península Ibérica e países mediterrânicos. A azul encontram-se os parasitas observados no nosso estudo:

Parasita	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Herpestes ichneumon</i>	<i>Martes Foina</i>	<i>Meles meles</i>	<i>Genetta genetta</i>	<i>Lutra lutra</i>	<i>Mustela putorius</i>	Homem	Cão doméstico	Gato doméstico
<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>				X						X
<i>Aelurostrongylus falciformis</i>				X						
<i>Aelurostrongylus pridhami</i>				X						
<i>Alaria alata</i>	X		X	X					X	X
<i>Ancylostoma caninum</i>	X				X			X	X	X
<i>Ancylostoma genettae</i>					X					
<i>Ancylostoma martinezi</i>					X					
<i>Andersonstrongylus captivensis</i>	X		X	X					X	
<i>Angiostrongylus vasorum</i>	X		X	X					X	
<i>Anisakis (L3)</i>						X				
<i>Aonchotheca putorii</i>			X	X		X				X
<i>Ascocotyle sp.</i>	X								X	
<i>Atritaenia incisa</i>				X						
<i>Babesia spp.</i>	X							X	X	
<i>Brachylaima sp.</i>				X				X		
<i>Capillaria aerophila</i>	X		X						X	X
<i>Capillaria plica</i>	X		X	X		?			X	X
<i>Ceratopsylla globiceps</i>				X				X		
<i>Chaetopsylla trichosa</i>				X				X		
<i>Cheyletiella sp.</i>		X	X					X	X	X
<i>Crenosoma melesi</i>			X	X						
<i>Crenosoma petrowi</i>			X							
<i>Crenosoma vulpis</i>	X		X	X					X	X
<i>Cryptocotyle lingua</i>	X					?		?	X	X
<i>Ctenocephalides canis</i>	X	?	?		?	?		X	X	X

Parasita	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Herpestes ichneumon</i>	<i>Martes Foina</i>	<i>Meles meles</i>	<i>Genetta genetta</i>	<i>Lutra lutra</i>	<i>Mustela putorius</i>	Homem	Cão doméstico	Gato doméstico
<i>Ctenocephalides felis</i>	X	?	?	?	?	?		X	X	X
<i>Dermacentor sp.</i>	X	X	X	X	X	?		X	X	X
<i>Dipetalonema reconditum</i>	?							X	X	X
<i>Diploilidium acanthotetra</i>					X			?		
<i>Diploilidium nolieri</i>					X			?		
<i>Dipylidium caninum</i>	X							X	X	X
<i>Dirofilaria immitis</i>	X		X			X		X	X	X
<i>Dirofilaria repens</i>	X							X	X	X
<i>Echinococcus granulosus</i>	X							X	X	
<i>Echinococcus multilocularis</i>	X							X	X	
<i>Ehrlichia canis</i>	X								X	X
<i>Eucoleus schvalovoj</i>						X				
<i>Euparyphium perfoliatum</i>	X							?		
<i>Euryhelmis squamula</i>	X		X	X				X		X
<i>Família Acuariidae</i>					X					
<i>Família Oxyuridae</i>	X		X							
<i>Filaroides hirthei</i>	X	X							X	
<i>Filaroides martis</i>		X	X	X		X				
<i>Filaroides milksi</i>		X							X	
<i>Gigantorhynchus sp.</i>						X				
<i>Gnathostoma sp.</i>	?	?	?	?	?	?		X	X	X
<i>Haemaphysalis punctata</i>	X	X	X	X	X	?		X	X	X
<i>Hepatozoon canis</i>	X				?				X	?
<i>Isthmiophora melis</i>	X		X	X				X		
<i>Ixodes sp.</i>	X	X	X	X	X	?		X	X	X
<i>Leishmania infantum</i>	X	X	X	X	X	?		X	X	X
<i>Lynxacarus mustelae</i>			X							
<i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>	?							X	X	
<i>Mastophorus muris</i>				X						X

Parasita	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Herpestes ichneumon</i>	<i>Martes Foina</i>	<i>Meles meles</i>	<i>Genetta genetta</i>	<i>Lutra lutra</i>	<i>Mustela putorius</i>	Homem	Cão doméstico	Gato doméstico
<i>Mesocestoides sp.</i>	X	X	X	X	X	?		X	X	X
<i>Metorchis albidus</i>	X								X	X
<i>Molineus patens</i>			X	X						
<i>Ollulanus tricuspis</i>	X								X	X
<i>Oochoristica sp.</i>			X							
<i>Opisthorchis sp</i>	X					X		X	X	X
<i>Oslerus osleri</i>	?								X	
<i>Oslerus rostratus</i>										X
<i>Otodectes cynotis</i>	X		X						X	X
<i>Paraceras melis melis</i>	X		X	X					X	X
<i>Phagicola sp.</i>						X		X		
<i>Physaloptera praeputialis</i>					X			X		X
<i>Physaloptera sibirica</i>	X			X						
<i>Pterygodermatites sp.</i>	X				X					
<i>Pulex irritans</i>	X	X	X	X	X			X	X	X
<i>Rhipicephalus sp.</i>	X	X	X	X	X				X	X
<i>Rossicotrema donicum</i>	X								X	X
<i>Skrjabingylus sp.</i>			X				X			
<i>Sobolevingylus petrowi</i>			X							
<i>Soboliphyme baturini</i>			X							
<i>Spilopsyllus cuniculi</i>	X								X	X
<i>Spirocerca lupi</i>	X								X	
<i>Spirura rytipleurites</i>	X	X	X	X	X					X
<i>Strongyloides spp.</i>	X			X		X		X	X	X
<i>Taenia sp.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Taenia cervi</i>	X								X	
<i>Taenia hydatigena</i>	X		X	X				X	X	
<i>Taenia martis</i>			X					X		
<i>Taenia ovis</i>	X								X	

Parasita	<i>Vulpes vulpes</i>	<i>Herpestes ichneumon</i>	<i>Martes Foina</i>	<i>Meles meles</i>	<i>Genetta genetta</i>	<i>Lutra lutra</i>	<i>Mustela putorius</i>	Homem	Cão doméstico	Gato doméstico
<i>Taenia pisiformis</i>	X			X					X	X
<i>Taenia serialis</i>	X							X	X	
<i>Taenia taeniformis</i>	X		X	X	X			X		X
<i>Toxascaris leonina</i>	X				X				X	X
<i>Toxocara canis</i>	X							X	X	
<i>Toxocara genettae</i>					X					
<i>Toxocara mystax</i>			X		X			X		X
<i>Toxoplasma gondii</i>	X			X				X		X
<i>Trichinella britovi</i>	X							X		
<i>Trichinella spiralis</i>	X			X	X			X		
<i>Trichodectidae</i>	X	X	X	X	X		X		X	X
<i>Trichuris sp.</i>	X		X	X					X	
<i>Trichuris vulpis</i>	X								X	
<i>Trombicula sp.</i>	X	X	X	X	X			X	X	X
<i>Trypanosoma pestanai</i>				X						
<i>Uncinaria criniformis</i>	X		X	X		X				
<i>Uncinaria stenocephala</i>	X			X				X	X	X
<i>Vigisospirura potekhina hugoti</i>				X						
<i>Trogloremata acutum</i>							X			

Fonte: (Torres *et al.*, 2004; Rosalino, 2008; CDC; Dawes, 1968; Urquhart *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2016; The Merck Veterinary Manual; Ribas *et al.*, 2004; Kierdorf *et al.*, 2006).

#### Anexo 2: Ectoparasitas presentes nos animais necropsiados:

Data Captura:	Data Necropsia	Espécie/Código	Localização	Ectoparasitas
05/07/2015	09/09/2015	Fm1	N2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Ni	10/09/2015	Fm2	Ni	<i>Otodectes cynotis</i>
24/05/2016	04/06/2016	Fm22	Ni	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>



Data Captura:	Data Necrópsia	Espécie/Código	Localização	Ectoparasitas
23/04/2016	07/06/2016	Fm23	Ni	<i>Otodectes cynotis</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Ni	17/06/2016	Fm25	CM1079	<i>Rhipicephalus bursa</i>
29/11/2015	09/12/2015	Fm3	Ni	<i>Pulex irritans</i>
Ni	04/04/2016	Fm7	Ni	<i>Otodectes cynotis</i> , <i>Ixodes</i> sp.
22/08/2015	10/09/2015	Gm1	Ni	No
11/11/2015	09/12/2015	Gm3	Ni	<i>Pulex irritans</i> , <i>Ctenocephalides canis</i>
02/02/2016	18/04/2016	Gm8	N114	No
18/03/2016	18/04/2016	Gm9	R114-4	No
14/11/2015	15/12/2015	Lm1	N114	No
01/03/2016	31/03/2016	Lm2	N114	No
24/05/2016	24/05/2016	Lm3	N4	No
09/05/2016	02/06/2016	Lm5	N4	No
Ni	02/06/2016	Lm6	N4	No
05/09/2015	08/09/2015	Rm1	N114	<i>Pulex irritans</i> , <i>Hyppoboscidae</i>
15/09/2015	15/09/2015	Rm2	IP2	No
02/10/2015	02/10/2015	Rm3	N4	No
20/11/2015	14/12/2015	Rm4	N114	<i>Otodectes cynotis</i> , <i>Pulex irritans</i> , <i>Rhipicephalus</i> sp.
03/01/2016	09/01/2016	Rm9	N114	<i>Otodectes cynotis</i> , <i>Pulex irritans</i> , <i>Ixodes ricinus</i>
28/08/2015	08/09/2015	SRm1	N114	<i>Pulex irritans</i>
10/09/2015	11/09/2015	SRm2	M521	No
27/09/2015	29/09/2015	SRm3	N4	No
09/10/2015	09/10/2015	SRm4	N4	No
10/03/2016	19/04/2016	SRm5	N114	No
05/02/2016	19/04/2016	SRm6	Ni	No

<b>Data Captura:</b>	<b>Data Necrópsia</b>	<b>Espécie/Código</b>	<b>Localização</b>	<b>Ectoparasitas</b>
20/09/2015	29/09/2015	Tm1	N4	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>Pulex irritans</i> , <i>Hyppoboscidae</i>
Ni	12/04/2016	Tm5	N114	<i>Pulex irritans</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i> , <i>Ixodes ricinus</i>
09/04/2016	27/05/2016	Tm7	IP2	<i>Pulex irritans</i> , <i>Trichodectes</i> sp., <i>Ixodes hexagonus</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>

Legenda: no – não observado; ni – não identificada

### Anexo 3: Parasitas pulmonares:

<b>Data Captura:</b>	<b>Data Necrópsia</b>	<b>Espécie/Código</b>	<b>Localização</b>	<b>Pulmões</b>
05/07/2015	09/09/2015	Fm1	N2	No
Ni	10/09/2015	Fm2	Ni	No
24/05/2016	04/06/2016	Fm22	Ni	No
23/04/2016	07/06/2016	Fm23	Ni	No
Ni	17/06/2016	Fm25	CM1079	No
29/11/2015	09/12/2015	Fm3	Ni	No
Ni	04/04/2016	Fm7	Ni	No
22/08/2015	10/09/2015	Gm1	Ni	No
11/11/2015	09/12/2015	Gm3	Ni	No
02/02/2016	18/04/2016	Gm8	N114	No
18/03/2016	18/04/2016	Gm9	R114-4	No
14/11/2015	15/12/2015	Lm1	N114	No
01/03/2016	31/03/2016	Lm2	N114	No
24/05/2016	24/05/2016	Lm3	N4	No
09/05/2016	02/06/2016	Lm5	N4	No
Ni	02/06/2016	Lm6	N4	No

Data Captura:	Data Necrópsia	Espécie/Código	Localização	Pulmões
05/09/2015	08/09/2015	Rm1	N114	<i>Crenosoma vulpis</i>
15/09/2015	15/09/2015	Rm2	IP2	No
02/10/2015	02/10/2015	Rm3	N4	No
20/11/2015	14/12/2015	Rm4	N114	No
03/01/2016	09/01/2016	Rm9	N114	No
28/08/2015	08/09/2015	SRm1	N114	Larvas pulmonares ni
10/09/2015	11/09/2015	SRm2	M521	No
27/09/2015	29/09/2015	SRm3	N4	<i>Crenosoma vulpis</i>
09/10/2015	09/10/2015	SRm4	N4	No
10/03/2016	19/04/2016	SRm5	N114	No
05/02/2016	19/04/2016	SRm6	Ni	No
20/09/2015	29/09/2015	Tm1	N4	Larvas pulmonares ni
Ni	12/04/2016	Tm5	N114	No
09/04/2016	27/05/2016	Tm7	IP2	No

Legenda: No – Não observada nenhuma forma parasitária; ni – não identificado.

#### Anexo 4: Parasitas gastrointestinais:

Data Captura:	Data Necropsia	Espécie/Código	Localização	Total
05/07/2015	09/09/2015	Fm1	N2	Ni
Ni	10/09/2015	Fm2	Ni	Willis ID: L3 ni Willis ID e IG: Ovos tipo estrangilo

Data Captura:	Data Necropsia	Espécie/Código	Localização	Total
24/05/2016	04/06/2016	Fm22	Ni	Willis IG: Ovos tipo estrongilo ni de roedores  Willis IG: Nematodas ni de roedores
23/04/2016	07/06/2016	Fm23	Ni	Sedimentação ID: <i>Taenia</i> sp.
Ni	17/06/2016	Fm25	CM1079	Willis IG: Ovos <i>Trichuris</i> sp.
29/11/2015	09/12/2015	Fm3	Ni	Estômago: Nematodas Spirurida ni  Willis IG: Ovos embrionados tipo estrongilo
Ni	04/04/2016	Fm7	Ni	No
22/08/2015	10/09/2015	Gm1	Ni	Willis IG: Ovos tipo estrongilo
11/11/2015	09/12/2015	Gm3	Ni	Sedimentação ID: <i>Taenia</i> sp.
02/02/2016	18/04/2016	Gm8	N114	Sedimentação ID: <i>Taenia</i> sp.
18/03/2016	18/04/2016	Gm9	R114-4	Sedimentação ID: <i>Taenia</i> sp.  Sedimentação ID: <i>Physaloptera</i> <i>praeputialis</i>  Willis IG: Ovos tipo estrôngilo
14/11/2015	15/12/2015	Lm1	N114	Willis IG: Oocisto não- esporulado
01/03/2016	31/03/2016	Lm2	N114	No
24/05/2016	24/05/2016	Lm3	N4	No
09/05/2016	02/06/2016	Lm5	N4	Willis IG: Oocisto

Data Captura:	Data Necropsia	Espécie/Código	Localização	Total
Ni	02/06/2016	Lm6	Ni	No
05/09/2015	08/09/2015	Rm1	N114	Willis ID e IG: Ovos tipo estrangilo Sedimentação ID e IG: <i>Mesocoestoides</i> sp. Sedimentação ID: <i>Pterygodermatites</i> sp. Sedimentação ID e IG: <i>Uncinaria stenocephala</i>
15/09/2015	15/09/2015	Rm2	IP2	No
02/10/2015	02/10/2015	Rm3	N4	No
20/11/2015	14/12/2015	Rm4	N114	Sedimentação ID: <i>Uncinaria stenocephala</i> Willis IG: Ovos tipos estrôngilo
03/01/2016	09/01/2016	Rm9	N114	Willis ID e IG: Ovos tipo estrangilo Sedimentação ID e IG: <i>Uncinaria stenocephala</i>
28/08/2015	08/09/2015	SRm1	N114	Willis IG: Larva ni
10/09/2015	11/09/2015	SRm2	M521	Willis ID e IG: Ovos tipo estrangilo
27/09/2015	29/09/2015	SRm3	N4	Willis ID e IG: Ovos tipo estrangilo Willis ID: Ovos <i>Trichuris</i> sp. Willis ID: Larvas L1 ni
09/10/2015	09/10/2015	SRm4	N4	No
10/03/2016	19/04/2016	SRm5	N114	No
05/02/2016	19/04/2016	SRm6	Ni	No

Data Captura:	Data Necropsia	Espécie/Código	Localização	Total
20/09/2015	29/09/2015	Tm1	N4	Estômago: <i>Spirura rytipleurites</i> Willis IG: Ovos <i>Trichuris</i> sp.
Ni	12/04/2016	Tm5	N114	Sedimentação ID: <i>Taenia</i> sp.
09/04/2016	27/05/2016	Tm7	IP2	No

Legenda: Ni - não identificado; no – não observada nenhuma forma parasitária.

Anexo 5: Resultados da pesquisa de *L. infantum* em esfregaços por aspiração de medula óssea:

Data Captura:	Data Necropsia	Espécie/Código	Localização/ID	Medula Óssea:
05/07/2015	09/09/2015	Fm1	N2	Inconclusivo
Ni	10/09/2015	Fm2	Ni	Inconclusivo
24/05/2016	04/06/2016	Fm22	Ni	No
23/04/2016	07/06/2016	Fm23	Ni	Inconclusivo
Ni	17/06/2016	Fm25	CM1079	Inconclusivo
29/11/2015	09/12/2015	Fm3	Ni	Inconclusivo
Ni	04/04/2016	Fm7	Ni	Inconclusivo
22/08/2015	10/09/2015	Gm1	Ni	Inconclusivo
11/11/2015	09/12/2015	Gm3	Ni	Inconclusivo
02/02/2016	18/04/2016	Gm8	N114	No
18/03/2016	18/04/2016	Gm9	R114-4	Inconclusivo
14/11/2015	15/12/2015	Lm1	N114	Inconclusivo
01/03/2016	31/03/2016	Lm2	N114	No
24/05/2016	24/05/2016	Lm3	N4	No
09/05/2016	02/06/2016	Lm5	N4	No

<b>Data Captura:</b>	<b>Data Necropsia</b>	<b>Espécie/Código</b>	<b>Localização/ID</b>	<b>Medula Óssea:</b>
Ni	02/06/2016	Lm6	N4	Inconclusivo
05/09/2015	08/09/2015	Rm1	N114	No
15/09/2015	15/09/2015	Rm2	IP2	No
02/10/2015	02/10/2015	Rm3	N4	No
20/11/2015	14/12/2015	Rm4	N114	Inconclusivo
03/01/2016	09/01/2016	Rm9	N114	Inconclusivo
28/08/2015	08/09/2015	SRm1	N114	-
10/09/2015	11/09/2015	SRm2	M521	Inconclusivo
27/09/2015	29/09/2015	SRm3	N4	Inconclusivo
09/10/2015	09/10/2015	SRm4	N4	no
10/03/2016	19/04/2016	SRm5	N114	no
05/02/2016	19/04/2016	SRm6	Ni	no
20/09/2015	29/09/2015	Tm1	N4	no
Ni	12/04/2016	Tm5	IP2	no
09/04/2016	27/05/2016	Tm7	N2	Inconclusivo

Legenda: Ni - não identificado; no – não foram observadas formas parasitárias.