

***Anaplasma phagocytophilum*: REPERCUSSÃO DA INFECÇÃO DA FAUNA SILVESTRE EM CÃES E GATOS DE UMA ZONA ENDÉMICA**

***Anaplasma phagocytophilum*: REPERCUSSION OF WILDLIFE INFECTION IN DOGS AND CATS IN AN ENDEMIC AREA**

J. Trincheiras¹, Â. Martins^{1,5}, M. Santos-Silvas^{3,4}, M. Alves^{1,2}, A. Santos^{3,4}

¹ Lusofona University of Humanities and Technologies, Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon, Portugal. ² CBIOS – Research Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e tecnologias. Campo Grande, 376. 1749-024 Lisboa – Portugal. ³ Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Águas de Moura, 2965-575 Setúbal – Portugal. ⁴ Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa. Av. Prof. Egas Moniz, Ed. Egas Moniz, Piso 0, Ala C 1649-028 Lisboa, Portugal. ⁵ Hospital Veterinário da Arrábida. 2925-538 Azeitão – Portugal.

Resumo: *A população silvestre pode albergar uma elevada densidade de ixodídeos associados à transmissão de agentes patogénicos. Este facto é particularmente importante quando se assiste ao aumento descontrolado das populações silvestres, como se verifica, actualmente, com os javalis em Portugal. O presente estudo, procurou detectar evidências de infecção activa por Anaplasma phagocytophilum, agente zoonótico cuja transmissão poderá estar potenciada com o aumento da população de javalis no Parque Natural da Serra da Arrábida (PNSA). Foram estudados 21 javalis de três populações distintas, 35 cães e um gato com sinais clínicos, laboratoriais e/ou epidemiológicos compatíveis com doença associada a ixodídeos, atendidos no Hospital Veterinário da Arrábida (HVA) e 80 ixodídeos, capturados na vegetação (N=61) ou a parasitar animais (N=19) em áreas do PNSA. A pesquisa de ADN bacteriano foi realizada por PCR convencional genérico para Anaplasma/Ehrlichia e por PCR em tempo real específico para A. phagocytophilum. Embora em nenhuma das amostras tenha sido possível identificar reacções positivas as restrições temporais e espaciais deste estudo exploratório reforçam a importância de se realizar uma vigilância epidemiológica mais abrangente de agentes patogénicos associados a ixodídeos no PNSA.*

Abstract: *Wildlife can harbor a high density of ixodes ticks involved in the transmission of pathogens. This is of particular importance when we assist to an uncontrolled growth of wild animal populations, as is currently the case of wild boars in Portugal. The present study aimed to detect evidence of active infection caused by these bacterial agents, namely A. phagocytophilum, a zoonotic agent whose transmission may be enhanced by the increase of wild boar population in Serra da Arrábida Natural Park (SANP). Twenty-one wild boars from three different population, 36 companion animals (35 dogs and one cat), with clinical, laboratorial and/or epidemiological signs compatible with tick-borne diseases, attended at Arrábida Veterinary Hospital, and 80 ixodids captured either in the vegetation (N = 61) or parasitizing companion animals (N = 19) in the SANP area were included in this study. A generic PCR for Anaplasma / Ehrlichia spp. and a real-time PCR specific for A. phagocytophilum were performed. Despite the absence of A. phagocytophilum DNA amplification in all studied samples, it should be noted, that the timing and geographical limitations of sampling highlight the importance of a deep epidemiological surveillance of ixodid-borne agents in SANP.*

1. INTRODUÇÃO

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria gram negativa, intracelular obrigatória, com tropismo para leucócitos polimorfonucleados, afectando maioritariamente os neutrófilos, no interior dos quais forma microcolónias designadas de mórulas (Dumler *et al.*, 2001; Carrade *et al.*, 2009; Nováková e Vichová, 2010; Diniz & Breitschwerdt, 2012; Silveira *et al.*, 2015) (**Figura 1**). Este é o agente etiológico da Anaplasmose, uma doença infecciosa que afecta vários mamíferos, incluindo animais de companhia, animais de interesse pecuário e o Homem, tratando-se, assim, de uma zoonose. Nos cães esta doença é designada por anaplasmose granulocítica canina (AGC) e nos humanos por anaplasmose granulocítica humana.

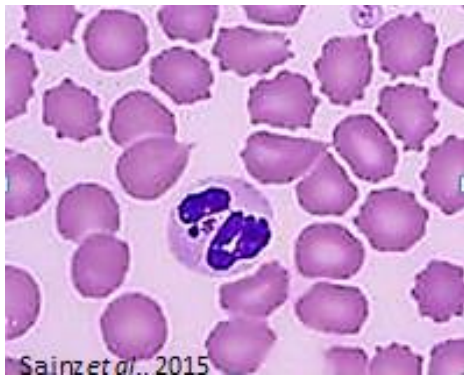


Figura 1 – Mórula no interior de um neutrófilo

Nos animais de companhia os sinais clínicos da AGC surgem, geralmente, após um período de incubação de uma a duas semanas depois da exposição a ixodídeos infectados e manifesta-se, principalmente, por letargia e hipertermia (Greig *et al.*, 1996; Poitout, 2005; Kohn *et al.*, 2008; Carrade *et al.*, 2009; Dondi *et al.*, 2014), sendo acompanhada por algumas alterações hematológicas como trombocitopenia, leucopenia e anemia (Dumler *et al.*, 2001; Kohn, 2008; Carrade *et al.*, 2009).

A principal via de transmissão de *A. phagocytophilum*, tanto no contexto da

medicina veterinária como da medicina humana, ocorre pela exposição a um ixodídeo infectado, ou seja, através da inoculação de secreções salivares infetantes durante a sua refeição sanguínea (Nicholson *et al.*, 2010; Day, 2011). Porém, existem outras vias de transmissão tais como a perinatal, que pode ocorrer tanto em animais como no Homem, transfusional e transplante de órgãos, descrita no Homem (Assi *et al.*, 2007; Kohn *et al.*, 2008; Shield *et al.*, 2015) e transplacentária em bovinos (Kohn *et al.*, 2008). É de salientar que na população de ixodídeos *A. phagocytophilum* apenas se mantém por transmissão transestadial, ou seja, um ixodídeo uma vez infectado mantém o agente durante toda a sua vida, nas várias fases biológicas, mas não o transmite à sua descendência. Desta forma, para que, na natureza, seja perpetuado o ciclo de transmissão de *A. phagocytophilum* é necessária a existência de um hospedeiro reservatório (Rizolli *et al.*, 2014).

Os vectores deste agente são, maioritariamente, ixodídeos do género *Ixodes*. Em Portugal, encontram-se descritas duas espécies de *Ixodes* associadas a este agente – *I. ricinus* e *I. ventrallo* (Santos *et al.*, 2004). *Ixodes ricinus* é, sem dúvida, o vector mais importante uma vez que parasita uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo os animais de companhia, o Homem e diversos animais silvestres. Em Portugal, *I. ricinus* está activo durante todo o ano, ocorrendo as fases adultas (machos e fêmeas) em especial durante o Outono/Inverno, enquanto as formas imaturas (larvas e ninfas) apresentam maior actividade na Primavera/Verão (Santos-Silva *et al.*, 2018).

Relativamente aos hospedeiros/reservatórios, para além dos animais domésticos, *A. phagocytophilum* infecta várias espécies de animais silvestres, destacando-se neste contexto os javalis. Estes animais são considerados, simultaneamente, hospedeiros e reservatórios, mantendo infecções persistentes por *A. phagocytophilum* (de la Fuente, 2012;

Galindo *et al.*, 2012). Para além disso, o aumento da população destes animais e a sua aproximação de zonas peri-urbanas, com o intuito de procurar alimento e água, constitui um maior risco de disseminação a animais domésticos e à população humana de várias doenças zoonóticas, entre as quais, as associadas a vectores, em particular ixodídeos, representando um desafio à implementação de medidas de vigilância e de controlo (Gortázar *et al.*, 2007).

Com o presente estudo, pretendeu-se investigar a presença de *A. phagocytophilum* no Parque Natural da Serra da Arrábida (PNSA) e as suas implicações epidemiológicas, investigando a repercussão da infecção da fauna silvestre na sanidade de cães e gatos da região. Para tal, o estudo teve como alvo animais de companhia residentes no PNSA, com suspeita de doença associada a ixodídeos, bem como javalis capturados ao abrigo do programa de controlo de populações do Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF) e ixodídeos capturados na mesma região.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Colheita da amostra

Foram incluídos neste estudo 35 cães e um gato, atendidos no Hospital Veterinário da Arrábida (HVA) num período compreendido entre Maio de 2017 e Fevereiro de 2018. Como critérios clínicos de inclusão, consideraram-se a ocorrência de hipertermia, mucosas pálidas, distúrbios gastrintestinais, anorexia e epistaxis uni ou bilateral. Como critérios laboratoriais, consideraram-se a presença de trombocitopenia e leucopenia. Quanto aos critérios epidemiológicos, consideraram-se a exposição a ixodídeos e o acesso a áreas frequentadas por javalis. No total foram recolhidas 33 amostras sanguíneas, bem como ixodídeos que se encontravam a parasitar estes animais. Quanto aos javalis, foram incluídos 21 animais de três populações distintas, sendo que apenas uma pertencia a uma área integrante do PNSA (**Figura 2**). Nestes

animais, no dia seguinte ao abate, foram recolhidas amostras de baço e fígado, durante a sua evisceração, bem como ixodídeos que ainda se encontravam fixos. Para além dos ixodídeos obtidos na fase parasitária (nos animais de companhia e javalis), foram, também, capturados exemplares na fase de vida livre (ou questing) em locais do PNSA frequentados por javalis e onde ocorre a espécie *I. ricinus*, principal vector de *A. phagocytophilum* (**Figura 2**). O método utilizado foi o flagging/dragging, que consiste no arrastamento de um pano turco 1 x 1 m na vegetação herbácea, ao nível do solo (dragging) e na vegetação herbácea, mais alta (flagging) (**Figura 3**).

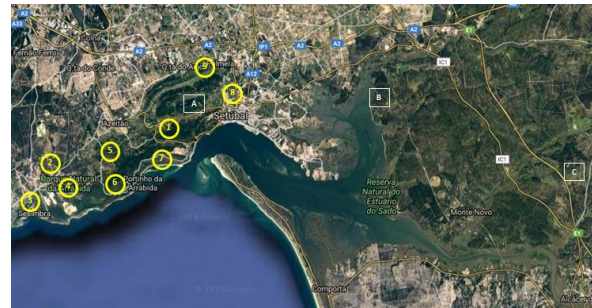


Figura 2 – Áreas onde foram realizadas as colheitas de ixodídeos na fase de vida livre (círculo) e javalis (retângulos). Imagem adaptada do Google maps (<http://google.pt/maps/>). 1- Aldeia Grande; 2- Maçã; 3- Sesimbra- Castelo; 4- Sesimbra- Pedreira; 5- Azeitão- Arrábida; 6- Arrábida- El Carmen; 7- Arrábida- Coelhos; 8- Baixa de Palmela; 9- Barris; A- Aldeia Grande; B- Zambujal; C- Casébres



Figura 3 – Técnica de flagging/dragging para colheita de ixodídeos da vegetação.

Extração de ADN e PCR

A extração do ADN das amostras de sangue total foi realizada com recurso ao kit comercial “ISOLATE II Genomic ADN Kit” (Bioline®), de acordo com as instruções do fabricante. Nas amostras de baço e fígado de javalis, o ADN foi extraído de um fragmento de 10 a 25 mg de cada tecido usando o kit “DNeasy Blood & tissue” (Quiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. Relativamente aos ixodídeos, antes de proceder à extração de ADN, a superfície exterior destes artrópodes foi descontaminada por imersão em álcool iodado (1g de iodo sublimado para 500 mL de etanol) durante 5 minutos, seguida de passagem por água destilada estéril e secagem em papel de filtro estéril. Os artrópodes foram, então, processados individualmente para extração de ADN recorrendo ao método da hidrólise por solução de amónia, descrito por Schouls et al. (1999).

Após extração, avaliou-se a qualidade do ADN, com base no teste da integridade física por electroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v) e/ou verificando a ausência de inibidores por PCR convencional tendo como alvo molecular os genes 12S rADN de ixodídeo (Beati & Keirans, 2001) e β -actina canina (Maia et al., 2010). Não foi possível averiguar a presença de eventuais inibidores nas amostras de ADN de javali, uma vez que, nos laboratórios envolvidos, não existia protocolo padronizado para esta espécie.

Nas amostras em estudo a pesquisa de ADN de *A. phagocytophilum* foi realizada com base na PCR convencional dirigida para o gene 16S rADN de *Anaplasma/Ehrlichia* (Maggi et al., 2006), que amplifica todos os agentes da família Anaplasmataceae, e na PCR em tempo real tendo como alvo molecular o gene *msp2* de *A. phagocytophilum* (Courtney et al., 2004), específica apenas para este agente.

3. RESULTADOS

Nos animais de companhia em estudo (35 cães e um gato) verificou-se um predomínio de fêmeas (57,1%), sendo que a maior parte dos animais vivia no interior de uma habitação mas tinha acesso ao exterior (42,9%) e/ou realizava passeios em áreas da região da Arrábida (57,1%), onde se verifica a presença de javalis. Os distúrbios gastrintestinais foram a causa mais frequente para a ida ao veterinário, manifestando-se por diarreia, vómitos ou ambos (**Figura 4**).

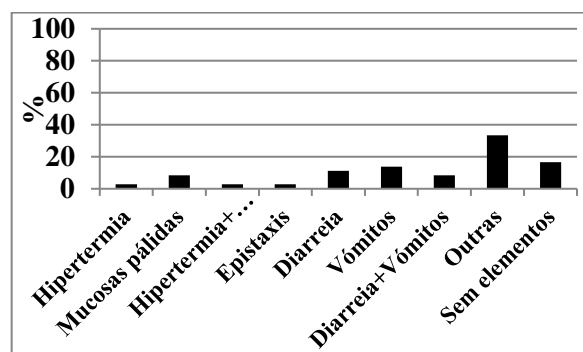


Figura 4 – Manifestações clínicas mais frequentes dos animais de companhia em estudo (35 cães e um gato).

Dos 33 animais em que foi colhida uma amostra de sangue para análise, a alteração hematológica mais frequente foi a trombocitopenia isolada, seguida de trombocitopenia associada a anemia (**Figura 5**).

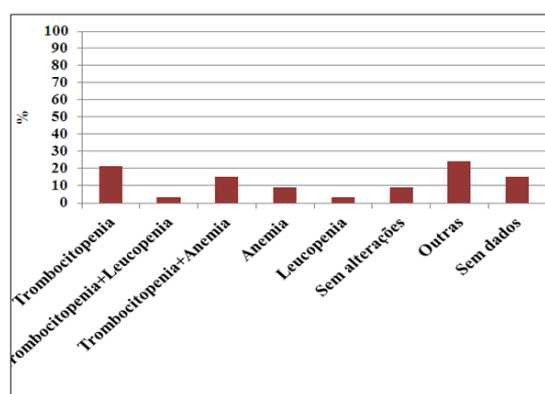


Figura 5 – Achados no hemograma da população de cães em estudo (n=33).

No ADN extraído dessas 33 amostras de sangue total foi possível confirmar a sua qualidade, com presença de uma única banda de elevado peso molecular, sinónimo de uma

boa integridade física (**Figura 6**) e ausência de inibidores na amplificação de um fragmento do gene da β -actina canina (**Figura 7**).

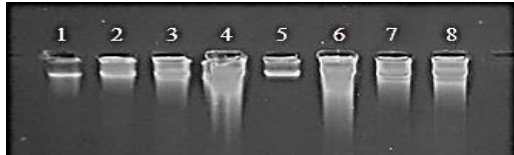


Figura 6 – Migração electroforética em gel de agarose a 0,8% do ADN extraído das amostras de sangue total dos cães em estudo. Linhas 1-3, 5, 7-8 - ADN com banda única de alto peso molecular bem definida; 4 e 6- ADN com alguma fragmentação.

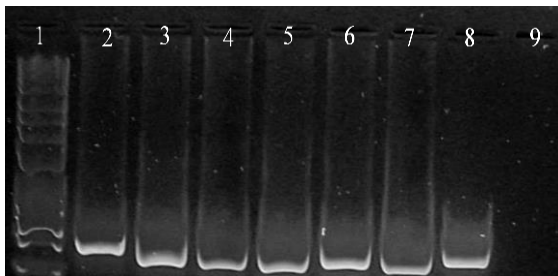


Figura 7 – Migração electroforética em gel de agarose a 1,5% de produtos de amplificação de um fragmento do gene β -actina canino de algumas amostras em estudo. 1 – Marcador de pesos moleculares (Hypper Ladder 100pb, Bioline®); 2-7 – Amostra com amplificação positiva; 8 – Controlo positivo; 9 – Controlo negativo.

Contudo, em nenhuma das amostras foi possível identificar ADN de *A. phagocytophilum* quer na PCR convencional (**Figura 8**), quer na PCR em tempo real (**Figura 9**).

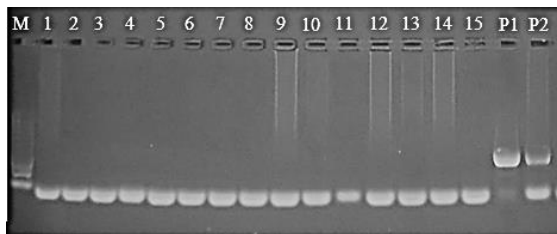


Figura 8 – Electroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos do PCR convencional para pesquisa de ADN de *Anaplasma spp./Ehrlichia spp.* nas amostras dos cães. M – Marcador de pesos moleculares (Hypper Ladder 100pb, Bioline®); 1-15 – Ausência de amplificação em algumas das amostras dos cães em estudo; P1 – Controlo positivo (ADN de *A. phagocytophilum*); P2 – Controlo positivo (ADN de *E. chaffeensis*); N – Controlo negativo

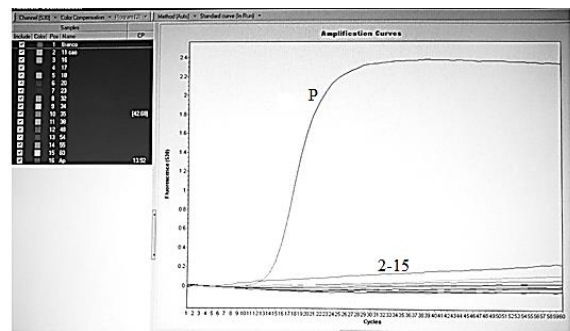


Figura 9 – Análise da leitura final do PCR em tempo real para pesquisa de *A. phagocytophilum* nas amostras de cães. 1 – Controlo negativo; 2-15 - Resultado negativo de algumas das amostras dos cães em estudo; P-Controlo positivo (ADN de *A. Phagocytophilum*)

Quanto aos javalis, houve também um predomínio de fêmeas (52,38%), sendo que 19% dos animais eram provenientes do PNSA. A electroforese do ADN extraído das 42 amostras de baço e fígado destes animais permitiu verificar que se apresentava degradado, com um arrastamento de bandas de baixo peso molecular. Esta ausência de integridade física pode ter sido devida à degradação ou lise dos tecidos e, conseqüente, degradação do ADN. Assim, apesar de todas as amostras terem sido negativas na PCR convencional e em tempo real ficará a dúvida quanto à validade destes resultados em virtude da má qualidade do ADN.

Foram, ainda, estudados 80 ixodídeos (um exemplar colhido em gato, três em javalis, 15 em cães e 60 na vegetação). Foram identificadas três espécies de ixodídeos, tanto nos exemplares de fase parasitária (**Figura 10**) como nos recolhidos da vegetação (**Figura 11**) com predomínio do género *Ixodes*. No ADN extraído dos 80 ixodídeos em estudo, comprovou-se a ausência de inibidores com a amplificação de um fragmento do gene 12S rADN em todas as amostras. Contudo, em nenhuma das amostras foi possível identificar ADN de *A. phagocytophilum*, quer na PCR convencional, quer na PCR em tempo real.

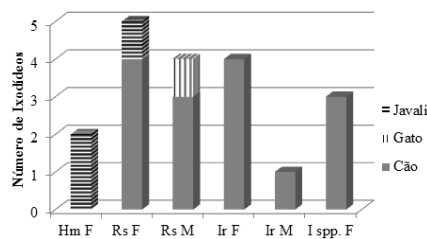


Figura 10 – Distribuição da amostra de ixodídeos na fase parasitária por género e hospedeiro vertebrado. Hm – *Hyalomma marginatum*; Rs – *Rhipicephalus sanguineus*; Ir – *Ixodes ricinus*; I spp. – *Ixodes* spp., F – fêmea; M – macho.

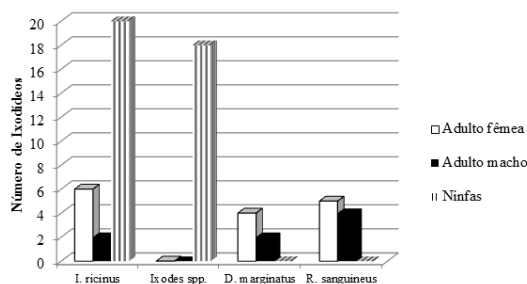


Figura 11 – Distribuição da amostra de ixodídeos de fase de vida livre por fase evolutiva estudados neste trabalho (n=61).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo não foi possível verificar a presença de ADN de *A. phagocytophilum* em nenhuma das amostras rastreadas. Contudo, há que realçar algumas limitações que podem ter influenciado estes resultados. Por um lado, as amostras sanguíneas foram recolhidas exclusivamente no Hospital Veterinário da Arrábida, o que tornou este estudo mais restrito. Assim, seria interessante confirmar estes resultados alargando as colheitas a várias clínicas da região em estudo. Ainda, é importante referir que *A. phagocytophilum* está associado a bacteriemias curtas, com subsequente limpeza do agente da circulação sanguínea. Relativamente aos javalis, o número de amostras obtido foi reduzido, não tendo, para além disso, sido possível garantir as condições de armazenamento desde a colheita até à chegada ao laboratório, o que pode ter determinado a fraca qualidade do ADN obtido a partir destas amostras. Relativamente aos ixodídeos, apenas foram realizadas duas colheitas, sendo que as

mesmas devem, idealmente, ser realizadas de forma sistemática e num período de tempo mais alargado.

Até ao momento ainda não foi detectado em Portugal nenhum caso de anaplasose, quer em animais, quer em humanos, confirmado com base na detecção de ADN do agente nestes hospedeiros (Santos *et al.*, 2009a). É, também, difícil obter uma ideia clara da verdadeira seroprevalência ou exposição a este agente, particularmente nos cães, uma vez que existem reacções cruzadas com *Anaplasma platys*, um outro agente do grupo muito prevalente em cães em Portugal (Santos *et al.*, 2009a; Dondi *et al.*, 2014). Importa, no entanto, salientar que *A. phagocytophilum* já foi detectado no nosso país, concretamente em ixodídeos capturados na Baixa de Palmela, uma região pertencente ao PNSA, com taxas de infecção a variar entre os 0,3 - 10,3% para *I. ricinus* e 2,1% para *I. ventralloii* (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2009d; Santos *et al.*, 2018). É, também, importante referir que os javalis albergam uma elevada densidade de ixodídeos que estão envolvidos na transmissão de vários agentes patogénicos, como bactérias (onde se inclui *A. phagocytophilum*), vírus e parasitas (Michalik *et al.*, 2012).

O papel dos animais silvestres na epidemiologia da anaplasose granulocítica não se encontra, ainda, completamente esclarecido sendo, por isso, importante olhar com atenção para o aumento descontrolado de algumas populações silvestres, como se verifica, actualmente, com os javalis em vários pontos de Portugal, em particular, no PNSA.

5. CONCLUSÃO

Embora os resultados obtidos tenham sido negativos, não se pode excluir a circulação do agente nesta região. O presente trabalho permitiu abrir caminho para a realização de mais estudos para conhecer melhor não só esta doença, como os reservatórios (nomeadamente os javalis), vectores

(nomeadamente *I. ricinus*) e o seu papel quer na doença veterinária, quer na doença humana. A anaplasmose, sendo uma zoonose, deve ser alvo de atenção por parte dos médicos veterinários e entidades de saúde pública.

6. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi financiado pela FCT, no âmbito do projecto PTDC/SAU-PAR/28947/2017.

REFERÊNCIAS

Assi, M.A., Yao, J.D., Walker, R.C. (2007). Lyme disease followed by human granulocytic anaplasmosis in a kidney transplant recipient. *Transpl Infect Dis*, 9(1): 66-72.

Beati, L., Keirans, L.J., (2001). Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol*, 87: 32-48.

Courtney, J.W., Kostelnik, L.M., Zeidner, N.S., Massung, R.F., (2004). Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, 42: 3164-3168.

Day, M.J. (2011). One health: The importance of companion animal vector-borne Diseases. *Parasit Vectors*, 4: 49.

De la Fuente J., Gortázar C. (2012) Wild boars as hosts of human-pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants [Letter]. *Emerg Infect Dis*, 12(18): 2094-2095.

Diniz, P.P. & Breitschwerdt, E.B. (2012). *Anaplasma phagocytophilum* infection (Canine Granulocytotropic Anaplasmosis) In: Greene infectious Diseases of the Dog and Cat (4thEd, pp. 244-254). Elsevier Saunders.

Dondi, F., Russo, S., Agnoli, C., Mengoli, N., Balboni, A., Alberti, A., *et al.* (2014). Clinicopathological and molecular findings in a case of canine *Anaplasma phagocytophilum* infection in Northern Italy. *Sci World J*, 1-6.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., . (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(6): 2145-2165.

Galindo R.C, Ayllón N., Smrdel K.S, Boadella M., Beltrán-Beck B., Mazariegos M. *et al.* (2012). Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasites and Vectors*, 5: 181.

Gortázar, C., Ferroglio, E., Hofle, U., Frolich, K., Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur J Wild Res*, 53: 241-256.

Greig, B., Asanovich, K.M., J. Armstrong, P., S. Dumler, J. (1996). Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol*, 34(1): 44-48.

Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., Pfister, K. (2008). Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med*, 22(6): 1289-1295.

Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica* 116: 193-199.

Maggi, R.G., Diniz, P.P., Cadenas, M.B, Breitschwerdt, E.B. (2006). The Use of Molecular Diagnostic Techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* Species in Arthropods or Patients. *International CVBD Symposium*. pp. 8-13.

Michalik J., Stanczak J., Cieniuch S., Racewicz M., Sikora B., Dabert, M. (2012). Wild boars as hosts of human pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants. *Emerg Infect Dis*, 18: 998-1001.

Nicholson, W.L., Allen K.E., McQuiston, J.H., Breitschwerdt E.B., Little, S.E. (2010). The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs in people. *Trends Parasitol*, 26(4): 205-12.

- Nováková, M., Vichová, B. (2010). Granulocytic anaplasmosis- emerging tick-borne disease of humans and animals. *Biologia* 65: 925-931.
- Poitout, F.M., Shinozaki, J.K., Stockwell, P.J., Holland, C.J., Shukla, SK. (2005). Genetic variants of *Anaplasma Phagocytophilum* infecting dogs in western Washington State. *J Clin Microbiol*, 43(2): 796-801.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., et al. (2014). *Ixodes ricinus* and its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front in Public Health*, 2:1-26.
- Santos, A.S., Alexandre, N., de Sousa, R., Nuncio, M.S., Bacellar, F., Dumler, JS. (2009a). Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infections in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec*, 164(6): 168-71.
- Santos, A.S., de Bruin, A., Veloso, A.R., Marques, C., Pereira da Fonseca, I., de Sousa, R., Sprong, H., Santos-Silva, M.M. (2018). Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia sp.*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia spp.* in questing ticks from a recreational park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis*, 9(6): 1555-1564.
- Santos, A.S., Santos-Silva, M.M., Almeida, V.C., Bacellar, F., Dumler, J.S. (2004). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerg Infect Dis*, 10(9): 1643-8.
- Santos A.S., Santos-Silva M.M., de Sousa R., Bacellar F., Dumler J.S. (2009d). PCR-based survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Portuguese ticks (Acari: Ixodidae). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 9(1): 33-40.
- Santos-Silva, M.M., Santos, A.S., Carvalho, I.L., de Sousa, R., Osório, H., Alves M.J., et al. (2018). Revive 2017. Culicídeos e ixodídeos, Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pp. 29-50.
- Schouls, L.M., Van de Pol, I., Rijpkema, S.G., Schot, C.S. (1999). Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol*, 37: 2215-2222.
- Silveira, J.A.G., Valente, P.C.L.G., Paes, P.R.O., Vasconcelos, A.V., Silvestre, B.T., Ribeiro, M.F.B. (2015). The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in Brazilian dog. *Ticks and Tick-Borne Dis*, 6(3): 242-245
- Shields, K., Cumming, M., Rios, J., Wong, M.T., Zwicker, J.I., Stramer, S.L., et al. (2015). Transfusion- associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient

