



_título:

_Relatório REVIVE 2013

Culicídeos e Ixodídeos

_subtítulo

_Rede de Vigilância de Vetores

_edição:

_INSA, IP

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
Administrações Regionais de Saúde
Instituto da Administração da Saúde e Assuntos Sociais
Direção-Geral da Saúde

_autores: **Departamento de Doenças Infeciosas**

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac

_local / data:

_Lisboa

_Abril 2014



Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge



Catálogo na publicação

PORTUGAL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP
Relatório REVIVE 2013 - Culicídeos e Ixodídeos : Rede de Vigilância de Vetores / Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. - Lisboa : Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, 2014. - 54 p. : il.

ISBN: 978-972-8643-92-8

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2014.

Título: Relatório REVIVE 2013 - Culicídeos e Ixodídeos : Rede de Vigilância de Vetores
Autores: Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac
Editor: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA, IP)
Coleção: Relatórios científicos e técnicos
Coordenação editorial: Elvira Silvestre
Composição e paginação: Francisco Tellechea
ISBN: 978-972-8643-92-8
Lisboa, abril de 2014

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.





Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge, IP

Av. Padre Cruz 1649-016 Lisboa
t: 217 519 200 @: info@insa.min-saude.pt

www.insa.pt



www.insa.pt



Relatórios

_título:

_Relatório REVIVE 2013

Culicídeos e Ixodídeos

_subtítulo

_Rede de Vigilância de Vetores

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
Administrações Regionais de Saúde
Instituto da Administração da Saúde e Assuntos Sociais
Direção-Geral da Saúde

_edição:

_INSA, IP

_autores: Departamento de Doenças Infeciosas

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac

_local / data:

_Lisboa

_Abril 2014



_Índice

I. O projecto REVIVE	5
II. REVIVE 2013 – Culicídeos	7
1. Introdução.....	8
1.1. Mosquitos.....	8
1.2. Víruses transmitidas por mosquitos.....	10
2. Metodologias REVIVE.....	11
3. Vigilância nos concelhos.....	14
3.1. Colheitas.....	14
3.2. Espécies.....	16
3.3. Agentes patogénicos.....	21
4. Vigilância em Portos e Aeroportos.....	24
5. Conclusões.....	25
III. REVIVE 2013 – Ixodídeos	27
1. Introdução.....	28
1.1. Carrças.....	28
1.2. Doenças transmitidas por carrças.....	31
1.2.1. Febre escaro nodular e outras rickettsioses.....	32
1.2.2. Borreliose de Lyme.....	33
2. Metodologias REVIVE.....	34
3. Vigilância nos concelhos.....	36
3.1. Colheitas.....	36
3.2. Espécies.....	38
3.3. Agentes patogénicos.....	44
4. Conclusões.....	48
IV. Considerações Finais	50
V. Equipas REVIVE no campo e no laboratório	52



Índice de quadros

Quadro 1. Agentes patogénicos mais representativos transmitidos por mosquitos	10
Quadro 2. Espécies de mosquitos identificadas na vigilância de portos e aeroportos	25
Quadro 3. Agentes transmitidos por ixodídeos presentes ou em risco de emergir em Portugal	32
Quadro 4. Número de <i>pools</i> positivos detetados por espécie de ixodídeo e grupo de agente infeccioso	46
Quadro 5. Agentes infecciosos detetados por conelho, espécie de ixodídeo e hospedeiro/vegetação	46

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida dos mosquitos	9
Figura 2. Conelhos com colheitas REVIVE 2013	15
Figura 3. Esforço de captura de mosquitos adultos	15
Figura 4. Esforço de captura de mosquitos imaturos	15
Figura 5. Distribuição geográfica de <i>Culex pipiens</i>	16
Figura 6. Distribuição geográfica de <i>Ochlerotatus caspius</i>	17
Figura 7. Distribuição geográfica de <i>Culex theileri</i>	17
Figura 8. Distribuição geográfica de <i>Culiseta longiareolata</i>	18
Figura 9. Distribuição geográfica de <i>Culex perexiguus</i>	18
Figura 10. Distribuição geográfica de <i>Culex modestus</i>	19
Figura 11. Distribuição geográfica de <i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	19
Figura 12. Distribuição geográfica de <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 13. Árvore filogenética dos flavivírus de mosquitos detetados de 2008 a 2013 no REVIVE	23
Figura 14. Vigilância de mosquitos imaturos em portos e aeroportos	24
Figura 15. Vigilância de mosquitos adultos em portos e aeroportos	24
Figura 16. Ciclo de vida dos ixodídeos	29
Figura 17. Método de captura de carraças em fase de vida livre	35
Figura 18. Esforço de captura de ixodídeos por conelho	36
Figura 20. Colheitas de ixodídeos no Homem	37
Figura 19. Esforço de captura de mosquitos imaturos	37
Figura 21. Colheitas de ixodídeos na fase de vida livre (vegetação)	37
Figura 22. Colheitas de ixodídeos de animais (excepto cão)	37
Figura 23. Distribuição geográfica de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	38
Figura 24. Distribuição geográfica de <i>Rhipicephalus bursa</i>	39
Figura 25. Distribuição geográfica de <i>Dermacentor reticulatus</i>	40
Figura 26. Distribuição geográfica de <i>Hyalomma marginatum</i>	41
Figura 27. Distribuição geográfica de <i>Hyalomma lusitanicum</i>	41
Figura 28. Distribuição geográfica de <i>Dermacentor marginatus</i>	42
Figura 29. Distribuição geográfica de <i>Ixodes ricinus</i>	43
Figura 30. Conelhos com identificação de agentes infecciosos	44

①

0 projecto REVIVE



As doenças transmitidas por vetores têm emergido, ou re-emergido, como resultado de alterações climáticas, demográficas e sociais, alterações genéticas nos agentes patogénicos, resistência dos vetores a inseticidas e como resultado de alterações de práticas de Saúde Pública. Para avaliação do risco em vetores e doenças transmitidas, para além de ser necessário conhecer os vetores presentes em cada região, e se estão ou não infetados, é necessário vigiar a introdução de novos vetores em novas regiões geográficas.

A criação do REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores) deveu-se, sobretudo, à necessidade de instalar capacidades para melhorar o conhecimento sobre as espécies de vetores presentes no país, a sua distribuição e abundância, esclarecer o seu papel como vetor de agentes de doença, assim como detetar atempadamente introduções de espécies invasoras com importância em Saúde Pública.

Em 2007 foi criado o “Programa Nacional de Vetores Culicídeos – REVIVE” entre a Direção-Geral da Saúde, Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e vale do Tejo e Norte e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

No âmbito deste programa foi feita a vigilância de culicídeos (mosquitos) em Portugal de 2008 a 2010. Nesses anos foram colhidos e identificados mosquitos em 54 concelhos, foram descritas 18 espécies, autóctones, de mosquitos e pesquisada a respetiva atividade viral.

No 2.º protocolo REVIVE (2011-2015), da Direção-Geral da Saúde, Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa

e vale do Tejo e Norte com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, alargou-se a vigilância de mosquitos também à de carraças, vetores com grande importância em Saúde Pública em Portugal.

- O “REVIVE Culicídeos e Ixodídeos” tem como objetivos:
- Vigiar a atividade de artrópodes hematófagos,
- Caracterizar as espécies e a sua ocorrência sazonal,
- Identificar agentes patogénicos importantes em Saúde Pública que permitam, em função da densidade dos vetores, do nível de infeção ou da introdução de espécies exóticas,
- Alertar para a adequação das medidas de controlo.

Nesta publicação apresentam-se os resultados das atividades de vigilância em mosquitos e carraças no ano de 2013.

Os resultados obtidos, em 2013, foram anteriormente enviados, pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, aos parceiros do programa na forma de relatório detalhado, nomeadamente “6.º Relatório REVIVE-Culicídeos” e “3.º Relatório REVIVE-Ixodídeos”.

Se a prevenção for privilegiada, em detrimento da resposta à emergência, a vigilância permite que qualquer alteração na abundância, na diversidade e no papel de vetor, detetada atempadamente, motive as autoridades de Saúde Pública a tomar medidas que contribuam para o controlo das populações de vetores de forma a mitigar o seu impacto em Saúde Pública.

2

REVIVE 2013

Culicídeos

DGS – Divisão de Saúde Ambiental

ARS – Administração Regional de Saúde do Alentejo, Algarve, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte

IA Saúde – Instituto da Administração da Saúde e Assuntos Sociais, IP-RAM

INSA/DDI – Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac

Maria João Alves, Hugo Osório, Fátima Amaro, Líbia Zé-Zé



1. Introdução

O programa de “REVIVE – Culicídeos”, a funcionar desde 2008, tem gerado dados de qualidade que permitem entender a distribuição geográfica, a ecologia e o impacto das alterações ambientais no planeamento de estudos de vigilância e determinação de risco em Saúde Pública.

Existe um alerta crescente das autoridades de Saúde Pública em toda a Europa com a probabilidade da introdução, ou estabelecimento, de novos vetores, sobretudo dos mosquitos das espécies invasoras *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*.

As *Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe*¹ do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), refletem a preocupação com a introdução de mosquitos invasores. Em 2014 o ECDC pretende redigir *Guidelines* europeias também para a vigilância de mosquitos nativos. A importância que se tem dado à necessidade de existirem programas de vigilância em todos os países demonstra que o REVIVE, em funcionamento desde 2008, já percorreu vias que alguns países de Europa ainda agora estão a iniciar.

O ECDC criou, no *Programme on emerging and vector-borne diseases*, uma rede de instituições que contribuem com dados para a criação de mapas de vigilância de vetores a nível de toda a Europa (Vbornet). O REVIVE tem contribuído para o Vbornet e os mapas, disponíveis no portal do ECDC, refletem a importância que as Administra-

ções Regionais de Saúde, a Direção-Geral da Saúde e o Instituto Nacional de Saúde dão à vigilância de vetores a nível nacional.

Adicionalmente, o Regulamento Sanitário Internacional (D.R. 1.ª série, N.º 16, de 23 de Janeiro de 2008) preconiza, nos Anexos 1 e 5, o estabelecimento de programas de vigilância e controlo de vetores no perímetro de portos e aeroportos, locais privilegiados para os processos de invasão e estabelecimento de espécies exóticas de importação. A vigilância nos portos e aeroportos, no âmbito do REVIVE, tem vindo a ser consolidada, apesar de ainda não estar completamente garantida.

Na Madeira, a introdução do mosquito invasor *Aedes aegypti* em 2005 e o surto de Dengue em 2012 são ocorrências exemplares que justificam a necessidade de existência de programas de vigilância permanentes que avaliem eficazmente a diversidade e abundância das espécies com impacto em Saúde Pública.

1.1. Mosquitos

Os mosquitos, ou culicídeos, pertencem ao filo *Arthropoda*, classe *Insecta*, ordem *Diptera*, subordem *Nematocera*, família *Culicidae*. A família *Culicidae* divide-se em três subfamílias, *Anophelinae*, *Culicinae* e *Toxorhynchitinae*. A sistemática dos mosquitos é complexa e tem sido continuamente sujeita a revisões que incluem a adição de novas taxa e a modificação e/ou remoção de outras desde o início das primeiras revisões taxonómicas^{2,3}.

1. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER.Mosquito-surveillance-guidelines.pdf>

2. Edwards, F. W. *Diptera, Family Culicidae*. [book auth.] P. Wytman. *Genera Insectorum*. Brussels : Desmet Verteneuil, 1932, pp. 1-258.

3. *A Synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera, Culicidae)*. Stone, Alan, Knight, Kenneth L. and Starcke, Helle. s.l. : The Thomas Say Foundation, Entomological Society of America, 1959, Entomological Society of America, p. 358.

O catálogo mundial da família Culicidae atualmente é mantido eletronicamente pela *Walter Reed Biosystematics Unit* em Washington DC (URL: <http://wrbu.si.edu>) e conta com 3528 espécies válidas distribuídas por 43 géneros⁴.

Tal como os outros dípteros, os mosquitos são insetos holometabólicos, exibem metamorfoses completas passando pelos estádios de ovo, larva e pupa que são anatomicamente diferentes do inseto adulto, têm outro tipo de alimentação e ocupam habitats diferentes.

O ciclo de vida dos mosquitos compreende necessariamente uma fase aquática, relativa às formas imaturas, ovo, quatro estádios larvares e pupa e uma fase terrestre/aérea correspondente ao mosquito adulto (Figura 1). As fêmeas de mosquitos colocam 50 a 300 ovos por postura, sendo o número e a forma da postura dependente da espécie e do estado fisiológico da fêmea. A postura pode ser efetuada sobre a superfície da água ou em locais húmidos que posteriormen-

te serão inundados. Pode ocorrer diapausa na fase de ovo. Os mosquitos exploram uma grande variedade de habitats aquáticos para o desenvolvimento larvar, estando a maioria das espécies de mosquitos apenas adaptadas a criadouros de água doce.

Quanto à alimentação, machos e fêmeas necessitam de hidratos de carbono, geralmente na forma de néctares e sucos vegetais. As fêmeas dos anofelíneos e culicíneos necessitam de proteínas para o desenvolvimento dos ovos que são obtidas do sangue de animais vertebrados. A preferência alimentar das fêmeas, animais (zoofilia) ou humanos (antropofilia), condiciona o seu papel como vetores de agentes patogénicos. Após a refeição sanguínea as fêmeas de mosquito procuram um abrigo e entram num período de atividade em que se dá a digestão e maturação dos ovos^{5,6}.

As espécies com importância em Saúde Pública pertencem à subfamília *Anophelinae* e *Culicinae*, nas quais as fêmeas fazem refeições sanguíneas.

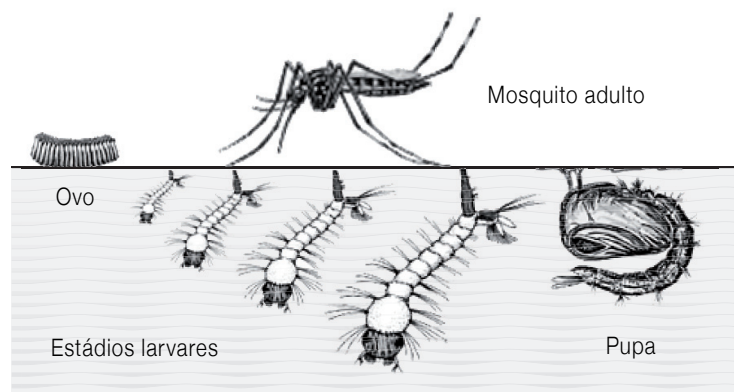


Figura 1 – Ciclo de vida dos mosquitos

4. Harbach, Ralph E. and Howard, Theresa M. Mosquito Classification. The Walter Reed Biosystematics Unit. [Online] 2010. [Cited: Fevereiro 26, 2014.] <http://wrbu.si.edu/index.html>.

5. Silver, John B. Mosquito Ecology. Field Sampling Methods 3rd ed. New York : Springer, 2008.

6. Clements, A. N. The Biology of Mosquitoes Volume I - Development, nutrition and reproduction. London, United Kingdom : CABI Publishing, 2000.



1.2. Virozes transmitidas por mosquitos

Os mosquitos são o mais importante grupo de artrópodes do ponto de vista médico e veterinário pelo facto de serem hospedeiros e vetores de importantes doenças da espécie humana, algumas das quais com reservatórios animais (Quadro 1). Os microrganismos podem alternar a fase parasítica com uma fase de vida livre ou ser exclusivamente parasitas, alternando, no seu ciclo de vida, entre hospedeiros vertebrados e os mosquitos. A malária, várias arboviroses e filarioses linfáticas são doenças transmitidas por mosquitos que causam anualmente elevada morbilidade e mortalidade.

Os arbovírus (*Arthropod-borne viruses*), são vírus transmitidos por artrópodes e englobam um grupo taxonomicamente diverso de vírus, sendo os agentes patogénicos para o Homem transmitidos por mosquitos pertencentes a três famílias: *Togaviridae* (género *Alphavirus*), *Flaviviridae* (género *Flavivirus*) e *Bunyaviridae* (género *Bunyavirus*). Dentro destes, destacam-se como zoonoses emergentes em Portugal e na Europa, os flavivírus Dengue (DEN), transmitido por mosquitos do género *Aedes*, nomeadamente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, e *West Nile* (WN), transmitido por mosquitos do género *Culex*.

Quadro 1 – Agentes patogénicos mais representativos transmitidos por mosquitos

Doença/ Agente patogénico	Hospedeiro		Vetores principais
	Natural	Tangencial	
Arboviroses/ Vírus			
Chikungunya	Primata	Humano	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>
Encefalite equina oriental	Ave	Humano, equídeo	<i>Coquilletidea perturbans</i>
Encefalomielite equina ocidental	Ave	Humano, equídeo	<i>Culex tarsalis</i>
Encefalomielite venezuelana	Mamíferos	Humano	<i>Cx. pipiens</i>
Dengue	Humano	Humano	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>
Encefalite japonesa	Porco	Humano	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>
Encefalite de Saint Louis	Ave	Humano	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. nigripalpus</i>
Febre-amarela	Primata	Humano	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Haemagogus spp.</i>
Encefalite de La Crosse	Roedores	Humano	<i>Ae. triseriatus</i>
Febre/ encefalite <i>West Nile</i>	Ave	Humano, equídeo	<i>Culex spp.</i>
Protozoários/ Plasmódios			
Malária humana	Humano		<i>Anopheles spp.</i>
Helminthes/ Filárias			
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Humano	Humano	<i>Culex</i> , <i>Mansonia spp.</i>
<i>Brugia malayi</i>	Gato	Humano	<i>Culex</i> , <i>Mansonia spp.</i>
<i>Dirofilaria immitis</i>	Cão	Humano	<i>Culex</i> , <i>Aedes spp.</i>

1. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER.Mosquito-surveillance-guidelines.pdf>
2. Edwards, F. W. Diptera, Family Culicidae. [book auth.] P. Wytzman. Genera Insectorum. Brussels : Desmet Verteneuil, 1932, pp. 1-258.
3. A Synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera, Culicidae). Stone, Alan, Knight, Kenneth L. and Starcke, Helle. s.l. : The Thomas Say Foundation, Entomological Society of America, 1959, Entomological Society of America, p. 358.



Nas últimas décadas a incidência de dengue cresceu dramaticamente em todo o mundo, estimando-se que ocorram 50-100 milhões de infeções todos os anos⁷. Em 2012 ocorreu um surto de dengue na ilha da Madeira com mais de dois mil casos. Em 2010 e 2013 foram registados três casos de dengue autóctones em França e um caso na Croácia.

A febre-amarela, apesar da vacina altamente eficaz, provoca 200000 casos e 30000 mortes por ano, número que tem vindo a aumentar nas últimas duas décadas devido ao declínio da imunidade da população vacinada e a fatores sociais e ecológicos, como migrações populacionais, deflorestação, urbanização e alterações climáticas⁸.

A encefalite japonesa, a mais comum encefalite viral transmitida por mosquitos nos países asiáticos, tem uma casuística de 50000 casos anuais⁹.

A febre por *West Nile*, causada pelo vírus *West Nile*, tem um elevado impacto em países onde é ou se tornou endémico, como no Continente Norte-americano¹⁰ e nas últimas duas décadas os surtos epidémicos do vírus *West Nile* na Europa e bacia mediterrânica têm vindo a aumentar¹¹. A presença do vírus *West Nile* já foi identificada por diversas vezes em Portugal.

O Chikungunya, arbovírus que causa febre e dores articulares intensas, atingiu proporções epidémicas

entre 2005-2007 quando foram registados 1,25 milhões de casos em ilhas do Oceano Índico e na Índia⁸. Em 2007 foi registado um surto de Chikungunya em Itália com mais de duas centenas de casos.

2. Metodologias REVIVE

Os programas que envolvem a investigação e vigilância de espécies de mosquitos estão, normalmente, focados no estudo das fases imaturas e os programas de estudo da sua capacidade vectorial incidem, sobretudo, nos mosquitos adultos. Os métodos de amostragem são, assim, diversos e não sistematizados, variando com os interesses, objetivos e oportunidades das equipas.

Os métodos de colheita não podem ser universalmente aplicados a todas as espécies de mosquitos (por exemplo, as armadilhas com luz não colhem as espécies diurnas, o isco humano só colhe espécies antropofílicas e é muito difícil aceder aos refúgios de adultos). Por outro lado, os estádios imaturos – aquáticos – são fáceis de localizar o que simplifica a colheita.

Os métodos usados no âmbito do REVIVE são anualmente revistos, mantidos ou melhorados, com a participação dos responsáveis e técnicos das ARS's, IASaúde e CEVDI/INSA.

7. World Health Organization (WHO). Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. France : WHO Library Cataloguing-Publication Data, 2009. ISBN 978-92-4-154787-1.

8. World Health Organization (WHO). Fact sheet. [Online] [Cited: Fevereiro 26, 2014.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en>.

9. Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. and Lee, C. K. Zoonotic encephalitis caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. Clinical and experimental vaccine research. 2014, Vols. 3 (1): 58-77.

10. Komar, N. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. 2003, Advances in Virus Research, pp. 61: 185-234.

11. Danis, K., et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. 2011, Eurosurveillance, p. 16 (34) pii: 19951



Colheitas

As colheitas de mosquitos, no âmbito do REVIVE, incidem tanto nos estádios imaturos como adultos.

No âmbito do REVIVE, para iniciar os trabalhos de colheitas de adultos, foram seleccionadas as armadilhas tipo CDC iscadas com CO₂ e aspiradores para captura de culicídeos vivos, processados para a pesquisa de agentes infecciosos. Actualmente para além dos modelos CDC são também utilizadas armadilhas BG e *Mosquito-taire*.

Na recolha de larvas e pupas em criadouros aquáticos, que representam mais eficientemente a distribuição de espécies nos locais, são utilizados caços.

As temperaturas mínimas e máximas, humidade relativa e dados de georeferência são registados nas colheitas.

Os dados das colheitas são registados em Boletins de Colheita de Adultos e Estádios Imaturos.

A periodicidade da amostragem é variável de acordo com os objetivos dos projectos. Em Portugal, o período mais significativo para a presença de mosquitos ocorre de Maio a Outubro, tendo sido este período seleccionado para as colheitas, não excluindo, no entanto, a probabilidade, cada vez maior, de ocorrência de mosquitos noutros períodos do ano devido às alterações climáticas. Na ilha da Madeira, devido ao clima, o período de colheitas ocorre de Abril a Novembro. Nos portos e aeroportos a vigilância decorre de janeiro a dezembro.

No período de colheitas as autoridades de saúde regionais fazem colheitas de duas a três noites,

duas vezes por mês, para captura de mosquitos adultos e imaturos em locais seleccionados nos concelhos e nos pontos de entrada, nomeadamente portos e aeroportos.

As selecções de locais, a programação e a realização das colheitas são da responsabilidade das Administrações Regionais de Saúde.

Transporte

As amostras são enviadas ao CEVDI/INSA por correio, ou em mão, acondicionadas em malas refrigeradas e até três dias depois do início do trabalho de campo. O acondicionamento dos artrópodes (adormecidos pelo frio) para envio ao laboratório segue as regras do triple packaging, recomendado pela OMS para o transporte de produtos biológicos.

Todas as amostras chegam acompanhadas dos respetivos Boletins de Colheita de Mosquitos Adultos e Estádios Imaturos, nos quais foram reunidas informações sobre a ARS, coletor, local de colheita, descrição, coordenadas GPS, condições atmosféricas, horas, temperatura e humidade.

Identificação

Os mosquitos recebidos no laboratório são anestesados num refrigerador a 4°C e identificados à espécie com as chaves de identificação de Ribeiro e Ramos (1999)¹² e Schaffner et al. (2001)¹³. Os mosquitos identificados são transferidos para tubos em *pools* até um máximo de 50 espécimes, de acordo com a espécie, género, data e local de colheita.



Pesquisa de vírus

Os procedimentos para pesquisa de flavivírus (*West Nile*, Dengue, Febre Amarela, Zika, Encefalite Japonesa e outros) iniciam-se com a extracção de ARN total dos *pools* de mosquitos. Para tal, os mosquitos são macerados em azoto líquido e extraído o ARN total com o kit comercial *PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O ARN total é armazenado a -80°C até utilização.

A pesquisa de flavivírus efectua-se por pesquisa directa da presença de ARN viral no ARN total extraído dos *pools* de mosquitos colectados. Para tal, efectua-se a amplificação parcial por RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) do gene NS5 recorrendo a primers específicos para flavivírus (Briese *et al.*, 1999, 2002)^{14, 15}. Os produtos de RT-PCR são re-amplificados numa segunda reacção de PCR de forma a aumentar a sensibilidade da detecção e analisados em gel de agarose. Para identificação molecular dos flavivírus detetados, os produtos de *Nested-PCR* são purificados utilizando o *JetQuick-PCR Purification Kit* (Genomed) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados num sequenciador automático (*ABI automated DNA capillary sequencer*; Applied Biosystems, USA).

Para cada *pool* de mosquitos positivo, as sequências parciais do gene NS5 são obtidas combinando as sequências geradas com ambos os *primers* recorrendo ao *software* BioEdit. As pesquisas de semelhanças com sequências em bases de dados (GenBank) são efectuadas recorrendo ao algoritmo BLASTN (Altschul *et al.* 1997)¹⁶. Cada *pool* positivo é designado, de acordo com a regra usualmente seguida no CEVDI para a detecção/isolamento de novos agentes, como PoMoFlav (*de Portuguesa Mosquito Flavivirus*) seguido de um R, de REVIVE e o n.º do *pool*.

Comunicação

Mensalmente, durante a época de colheitas, são enviados pelo CEVDI/INSA, por correio electrónico, aos participantes REVIVE, resumos dos resultados das colheitas, identificações e pesquisas de vírus.

No término da época de colheitas e trabalho laboratorial de identificação de mosquitos e pesquisa de flavivírus, o CEVDI/INSA prepara os quadros e resumo dos dados REVIVE relativo a cada uma das regiões e a nível nacional e apresenta-os na forma de relatórios.

12. Ribeiro H, Ramos, HC. Identification keys of the mosquitoes of Continental Portugal, Açores and Madeira. *Eur Mosq Bull* 1999; 3:1-11.
13. Schaffner E, Angel G, Geoffroy B, Hervy J-P *et al.* The Mosquitoes of Europe: An identification and Training Programme. IRD editions; 2001 (CD-ROM).
14. Briese T, Jia X-Y Huang C, Grady LJ *et al.* Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *The Lancet* 1999; 354:1261-1262.
15. Briese T, Rambaut A, Pathmajeyan M, Bishara J, *et al.* Phylogenetic Analysis of a Human Isolate from the 2000 Israel West Nile virus Epidemic. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:528-31.
16. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-3402.



Em Abril de cada ano é organizado o Workshop REVIVE nas instalações do CEVDI/INSA em Águas de Moura, com a participação de técnicos e responsáveis das ARS's, IA Saúde Madeira, INSA e DGS.

Formação

No âmbito do REVIVE são organizadas acções de formação, com duração de um dia, destinadas aos colaboradores REVIVE. Na formação pretende-se salientar a importância da vigilância de vetores e agentes transmitidos, demonstrar o funcionamento do projecto REVIVE, assim como treinar os formandos para as colheitas de mosquitos nas suas regiões. A formação é da responsabilidade dos investigadores do CEVDI/INSA que prepararam um “Manual REVIVE” para distribuição aos formandos.

As acções de formação REVIVE – Mosquitos ocorreram em 2008 (1.º protocolo) e anualmente desde 2011 (2.º protocolo), tendo contado com a participação de 167 formandos.

Em 2014 vai decorrer a 5.ª edição da formação “REVIVE – Mosquitos”.

3. Vigilância nos concelhos

3.1. Colheitas

O trabalho de campo, realizado pelas regiões de saúde, para recolha de mosquitos adultos e imaturos, decorreu entre Maio e Outubro de 2013.

As colheitas foram realizadas em 128 concelhos das cinco regiões de saúde de Portugal continental e Madeira (Figura 2).

Os locais, assim como a periodicidade da amostragem, foram seleccionados pelas ARS's, tendo como critério principal a proximidade à população humana, o historial da presença de mosquitos, o impacto nas atividades humanas, a presença de potenciais criadouros e pontos de entrada de espécies exóticas assim como a experiência adquirida em anos anteriores no âmbito do REVIVE.

O esforço de captura (número de colheitas) de mosquitos adultos e mosquitos imaturos variou entre uma colheita e mais do que 24 colheitas em toda a época por concelho (Figura 3 e Figura 4)

Em 805 colheitas de adultos (armadilhas/noite) foram capturados 11314 mosquitos e em 1154 colheitas de imaturos (boletins) foram recolhidos 21870 larvas e pupas de mosquito

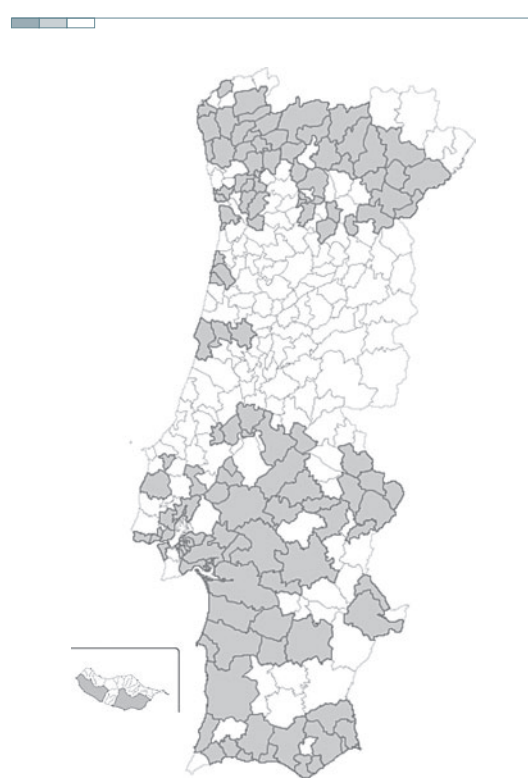


Figura 2 – Concelhos com colheitas REVIVE 2013

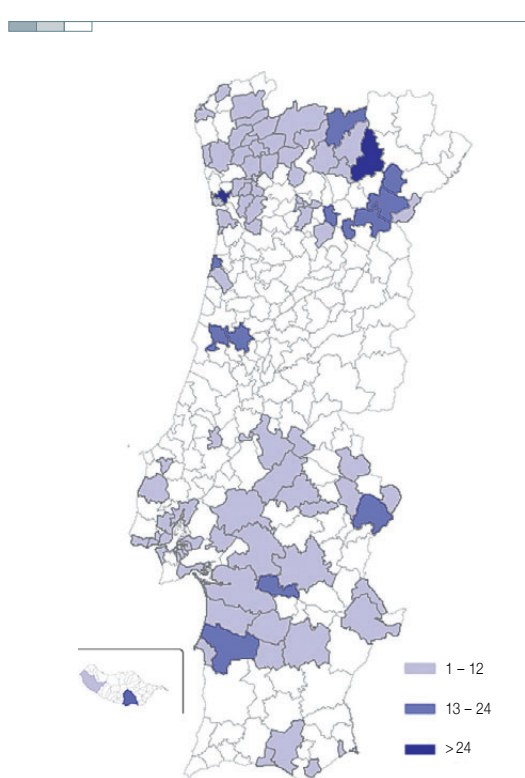


Figura 3 – Esforço de captura de mosquitos adultos

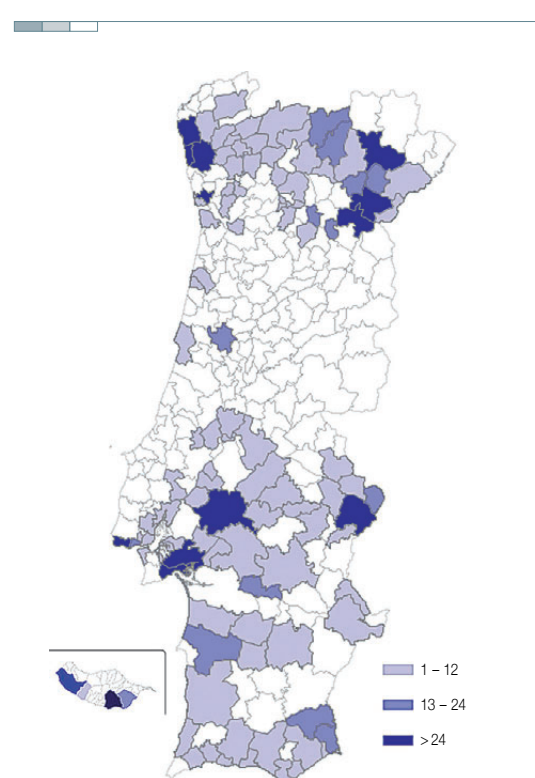


Figura 4 – Esforço de captura de mosquitos imaturos

3.2. Espécies

Os mosquitos foram identificados nos laboratórios do CEVDI/INSA.

Dos mosquitos colhidos como adultos, 89,3% eram fêmeas devido ao método de captura escolhido, nomeadamente as armadilhas CDC desenhadas para atrair fêmeas, prováveis vetores de agentes patogénicos.

No laboratório foram identificados mosquitos de 22 espécies diferentes. Com excepção da Madeira, onde desde 2005 que é detetada a presença de uma espécie exótica/invasora - *Aedes aegypti* -, em todas as regiões foram identificados unicamente espécies de mosquitos autóctones.

Abaixo e nas páginas seguintes descrevem-se as espécies identificadas e com importância em Saúde Pública, ou por serem vetores de doença ou por serem incomodativas para a população,

a sua abundância e a respetiva distribuição geográfica nas colheitas realizadas em 2013.

Para além das espécies apresentadas nos mapas das páginas seguintes foram ainda identificados outras espécies com abundâncias relativas inferiores a 4%, nomeadamente *Anopheles algeriensis*, *An. claviger*, *An. plumbeus*, *Coquilletidea richiardii*, *Culiseta annulata*, *Culex hortensis*, *Cx. impudicus*, *Cx. laticinctus*, *Cx. mimeticus*, *Cx. territans*, *Cx. torrentium*, *Ochlerotatus berlandi*, *Oc. detritus*, *Oc. geniculatus* e *Uranotaenia unguiculata*.

Os mapas representam a cinzento os concelhos onde foram realizadas colheitas, tanto de mosquitos adultos como imaturos, e a azul os concelhos onde foram identificadas as espécies. Nos concelhos representados a branco não houve colheitas, portanto não há informação sobre a presença das espécies

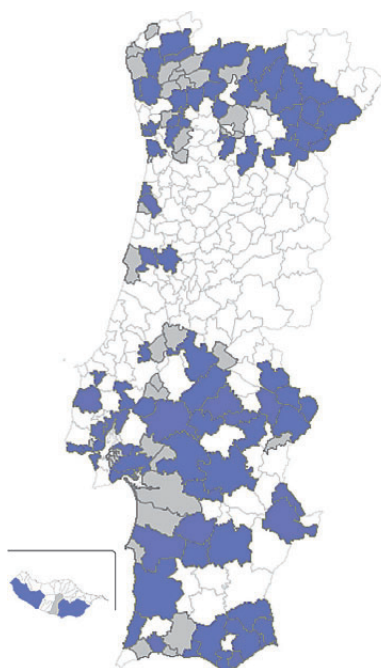


Figura 5 – Distribuição geográfica de *Culex pipiens*

***Culex (Culex) pipiens* Linnaeus, 1758**

Espécie nominal do complexo *pipiens*, Paleártica, encontrando-se também na sub-região este e sul africana e na América do Norte e do Sul.

Culex pipiens é um mosquito extremamente comum em Portugal, estando abundantemente distribuído em todas as regiões. Apresenta elevada capacidade de adaptação ecológica. Os criadouros são colecções de água temporárias ou permanentes, muito poluídas e ricas em matéria orgânica ou límpidas. É abundante durante o Verão e Outono, iniciando-se a atividade dos adultos na Primavera. As fêmeas invernam abrigadas no interior de habitações, nos lugares mais escuros, e em caves naturais. É uma espécie considerada primariamente ornitofílica, embora esteja demonstrado que se alimenta de outros vertebrados de sangue quente, incluindo humanos.

Cx. pipiens está envolvido na circulação de vários arbovírus na natureza, nomeadamente o vírus *West Nile*.

A abundância relativa de *Cx. pipiens* determinada no REVIVE 2013 foi de 48,3% para adultos e 45,7% para imaturos. A elevada abundância de *Cx. pipiens*, assim como a pequena diferença na amostragem entre estádios, corrobora as características domésticas e cosmopolitas típicas desta espécie.

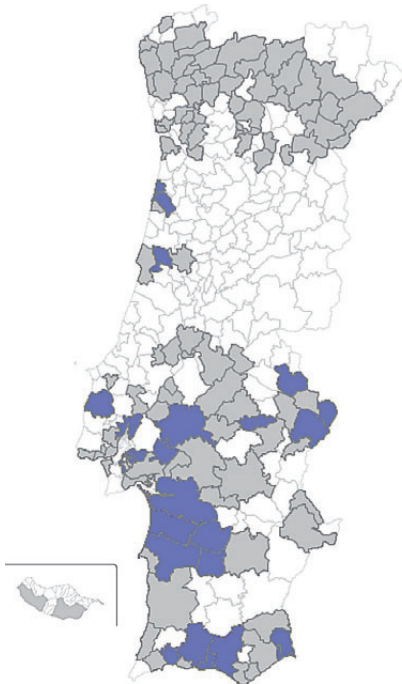


Figura 6 – Distribuição geográfica de *Ochlerotatus caspius*

Ochlerotatus (Ochlerotatus) caspius Pallas, 1771

Espécie amplamente distribuída na região Paleártica.

Ochlerotatus caspius é um mosquito halófilico abundante nas regiões húmidas do litoral, como em estuários, salinas e regiões pantanosas. As larvas estão presentes em criadouros de água salobra onde a presença de vegetação abundante é comum. Os adultos estão presentes o ano todo, mas são muito abundantes na Primavera e nos meses de Verão. Apresenta várias gerações por ano, invernando no estágio de ovo. As fêmeas são extremamente agressivas, picando todos os vertebrados de sangue quente, incluindo humanos, principalmente no exterior. Pode entrar nas habitações próximas dos locais dos criadouros.

O. caspius é considerado um mosquito praga muito antropofílico e vetor do vírus da mixomatose e do arbovírus Tahyna. Pode ser naturalmente infetado com o vírus *West Nile*.

A abundância relativa de *Oc. caspius* determinada no REVIVE 2013 foi de 25,1% para mosquitos adultos e apenas 0,7% para imaturos. A diferença na amostragem realça a dificuldade em aceder aos criadouros de imaturos, geralmente sistemas aquáticos de grande dimensões, como lagoas e regiões pantanosas de estuários.

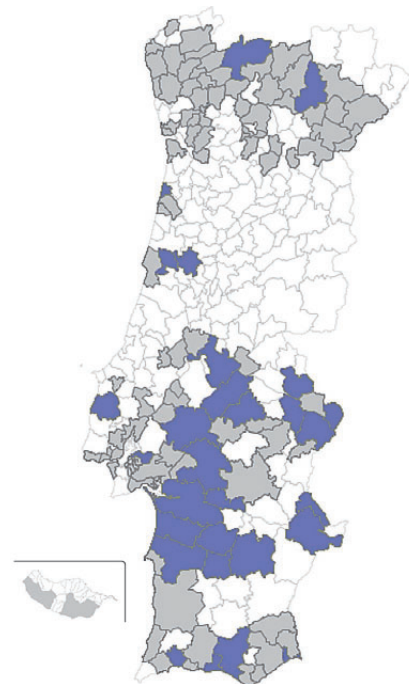


Figura 7 – Distribuição geográfica de *Culex theileri*

Culex (Culex) theileri Theobald, 1903

Espécie amplamente distribuída na sub-região Mediterrânica da região Paleártica, sub-região sudeste africana da região Afrotropical e norte da região Oriental.

Culex theileri é um mosquito comum em Portugal. As larvas podem ser encontradas numa grande variedade de criadouros, como arrozais, canais de irrigação e tanques de rega, onde a água é geralmente doce ou ligeiramente salobra.

Apresenta duas a três gerações por ano, sendo abundante nos meses de Verão e Outono e invernando no estágio adulto. É um mosquito zoofílico, as fêmeas alimentam-se preferencialmente em vertebrados mamíferos e geralmente no exterior, podendo, no entanto, entrar em casas e estábulos e picarem humanos.

Esta espécie é conhecida por estar envolvida na circulação de vários arbovírus na natureza, nomeadamente o vírus *West Nile*, embora embora não seja considerada como vetor primário. É uma espécie vetor de *Dirofilaria immitis* responsável pela dirofilariose canina.

A abundância relativa de *Cx. theileri* determinada no REVIVE 2013 foi de 16,2% para mosquitos adultos e apenas 0,4% para imaturos. A diferença na amostragem realça a dificuldade em aceder aos criadouros de imaturos, geralmente sistemas aquáticos de maiores dimensões, como arrozais e lagoas.

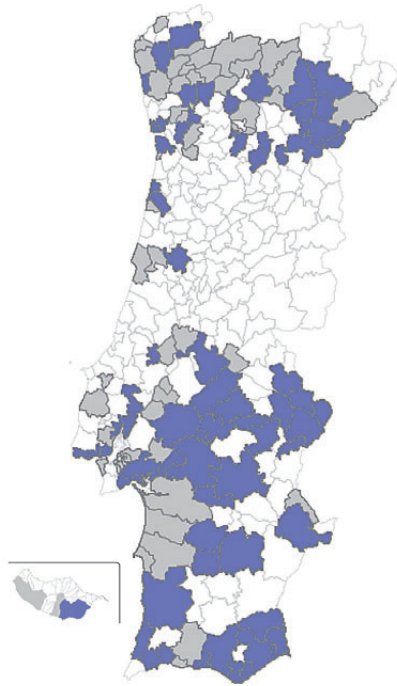


Figura 8 – Distribuição geográfica de *Culiseta longiareolata*

***Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata* Macquart, 1838**

Esta espécie apresenta uma distribuição ampla e descontínua que inclui a região Paleártica Central e Sul e a região Afrotropical.

Cs. longiareolata é um mosquito comum em Portugal e dos que atingem maiores dimensões. Os criadouros das larvas são muito variados - contentores abandonados, arrozais, canais de irrigação, tanques de rega - mas normalmente são águas estagnadas ricas em matéria orgânica. Os criadouros podem ser temporários ou permanentes, à sombra ou expostos à radiação solar, de água doce ou salobra e de água límpida ou poluída. Encontra-se muitas vezes associada à espécie *Culex pipiens*, sendo frequente encontrar criadouros com imaturos das duas espécies.

Os adultos estão presentes durante todo o ano, com máxima densidade na Primavera e Verão. Inverna na forma de larva nas regiões temperadas e de fêmea nas regiões frias. As fêmeas picam mais frequentemente aves, ocorrendo, raramente, refeições de sangue em humanos. Ocasionalmente podem entrar em casas e estábulos. É um mosquito zoofílico e não é conhecido por transmitir agentes patogénicos ao homem.

A abundância relativa de *Cs. longiareolata* determinada no REVIVE 2013 foi de apenas 1,2% para mosquitos adultos e 43,5% para imaturos. A diferença na amostragem realça a facilidade em aceder aos criadouros de imaturos por esta ser uma espécie peri-doméstica, com criadouros artificiais e outras coleções de água na proximidade de habitações.

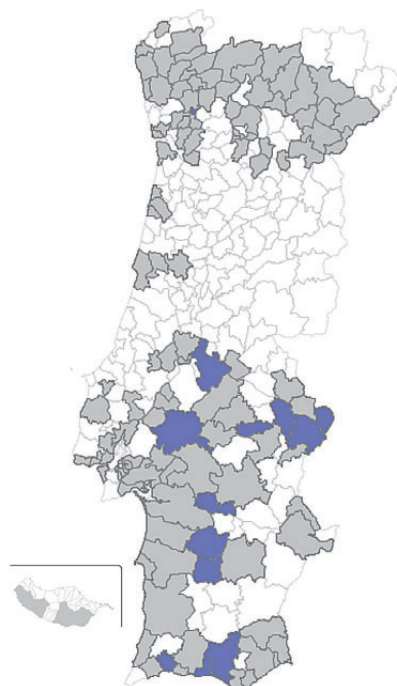


Figura 9 – Distribuição geográfica de *Culex perexiguus*

***Culex (Culex) perexiguus* Theobald, 1903**

Espécie amplamente distribuída na região Afrotropical e presente na sub-região Mediterrânica.

Culex perexiguus é um mosquito relativamente comum principalmente na região centro e sul de Portugal. É mais abundante nos meses do fim de Verão e Outono. As larvas desenvolvem-se em criadouros domésticos (vasos de plantas) ou naturais (linhas de água) e a água é geralmente límpida.

A biologia dos adultos é pouco conhecida. As fêmeas parecem preferir aves, no entanto podem picar humanos, principalmente no período nocturno.

Cx. perexiguus é vetor de vários arbovírus, incluindo o vírus *West Nile*.

A abundância relativa de *Cx. perexiguus* determinada no REVIVE 2013 foi de apenas 0,9 % para mosquitos adultos e 0% para imaturos, no entanto é uma espécie-vetor que pode ter importância em saúde pública.

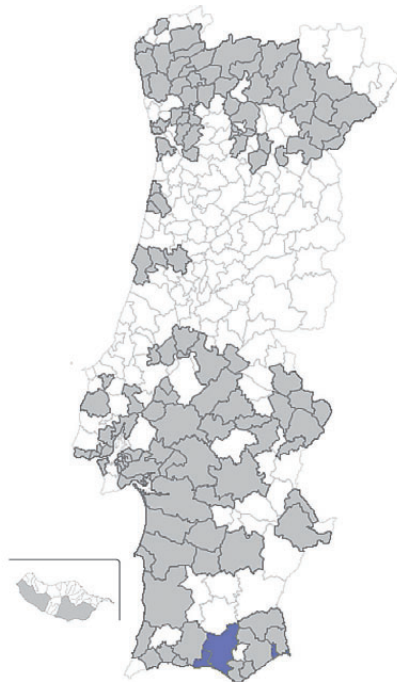


Figura 10 – Distribuição geográfica de *Culex modestus*

Culex (Barraudius) modestus modestus Ficalbi, 1890

Espécie Paleártica distribuída por toda a Europa excepto Escandinávia e região Báltica. Em Portugal, tem sido frequentemente encontrada no Algarve, mas encontra-se provavelmente distribuída noutras regiões (o programa REVIVE detetou esta espécie no concelho de Coimbra).

Culex modestus é uma espécie autogénica com as larvas a aparecerem na Primavera e a perdurarem até ao Outono. Os criadouros mais comuns são semi-permanentes, como campos de arroz e canais de irrigação de água doce ou salina até 2g/L.

As fêmeas são agressivas para os humanos e podem picar a qualquer hora do dia, mas principalmente ao crepúsculo. Picam sempre no exterior e raramente se encontram em repouso no interior de habitações.

Cx. modestus é uma espécie com importância médica, vetor de arbovírus como o vírus *West Nile* e o vírus Tahyna.

A abundância relativa de *Cx. modestus* determinada no REVIVE 2013 foi de apenas 0,3% para mosquitos adultos, tendo sido identificado apenas um espécime imaturo, no entanto é uma espécie-vetor que pode ter importância em saúde pública.

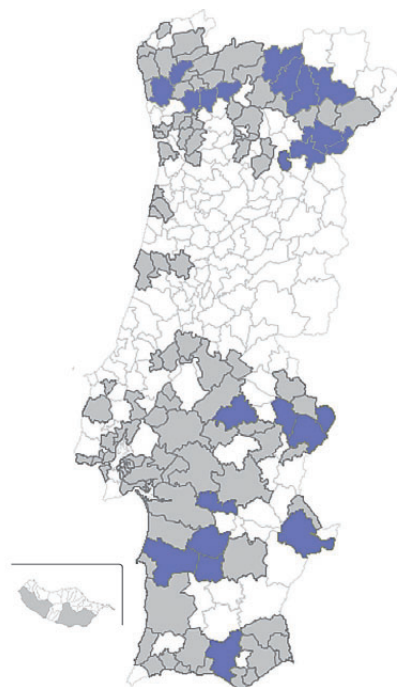


Figura 11 – Distribuição geográfica de *Anopheles maculipennis* s.l.

Anopheles (Anopheles) maculipennis s.l. Meigen, 1818

Os membros do complexo *maculipennis* são dificilmente identificados no estágio de adulto e larva.

Anopheles atroparvus, membro do complexo *maculipennis*, é uma espécie Paleártica ocidental da sub-região Mediterrânica e está distribuída em Portugal Continental, tendo sido o principal vetor da malária antes da erradicação da doença no País. As larvas desenvolvem-se em criadouros de águas calmas, limpas e expostas ao sol, podendo ser ligeiramente salobras como, por exemplo, pântanos costeiros, canais de irrigação e arrozais. Podem entrar em casas e estábulos, onde são frequentemente encontrados em repouso.

Espécie zoofílica, normalmente associada a animais domésticos ou de criação, encontra-se em elevado número em abrigos de animais, como coelheiras, pocilgas e estábulos. As fêmeas invernam geralmente nestes locais.

Além de vetor da malária é também um importante vetor de arbovírus, como o vírus *West Nile*, já isolado em Portugal a partir desta espécie.

A abundância relativa de *An. maculipennis* s.l. determinada no REVIVE 2013 foi de 0,8% para mosquitos adultos, e 0,4% para imaturos. As baixas abundâncias identificadas no REVIVE em 2013 não correspondem às elevadas abundâncias descritas historicamente e na actualidade devido aos locais selecionados para as colheitas, no entanto é uma espécie-vetor que pode ter importância em saúde pública.

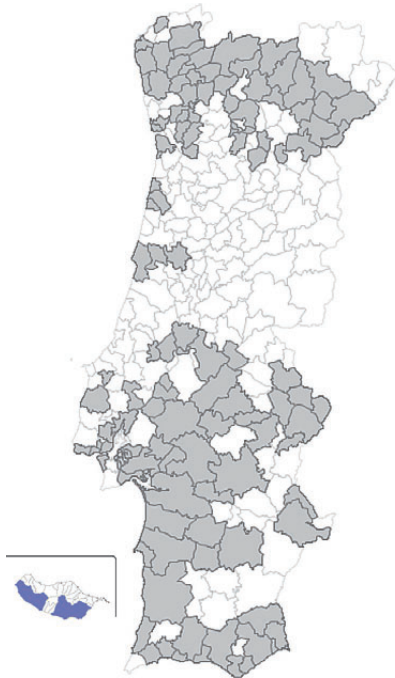


Figura 12 – Distribuição geográfica de *Aedes aegypti*

Aedes (Stegomyia) aegypti Linnaeus, 1762

Esta espécie encontra-se amplamente distribuída pelo mundo, estando quase sempre presente nas regiões onde a temperatura média anual está acima dos 20°C.

Aedes aegypti é uma espécie multivoltina, ocorrendo as gerações de uma após a outra sem intervalo, sendo constante a presença de mosquitos adultos. Não faz diapausa de Inverno em nenhum estágio do ciclo de vida, não estando assim adaptada às regiões frias.

Provavelmente o controlo sistemático de mosquitos nos países do sul da Europa, em meados do século passado, levou à erradicação de *Ae. aegypti*. Actualmente, na Europa, está presente nos países da costa oeste do Mar Negro, nomeadamente Geórgia e sul da Rússia, e na Madeira. Alguns espécimes foram identificados recentemente na Holanda, no entanto os mosquitos não sobreviveram ao Inverno.

Em Portugal *Ae. aegypti* esteve presente até à década de 60 do século passado. Pensa-se que, à semelhança do que aconteceu no resto da Europa, tenha sido erradicado nas campanhas de luta contra a malária, onde foi utilizado DDT no combate ao vetor da malária *Anopheles atroparvus*.

Em 2005 *Ae. aegypti* foi detetado na freguesia de Santa Luzia, Funchal, Madeira. Tudo indica que terá chegado à região, a partir de da América Central ou Sul, em cargas de importação de plantas. Apesar das medidas de combate, com recurso a desinfestações, adoptadas pelas autoridades desde Outubro de 2005, o mosquito estabeleceu-se na ilha e é hoje uma praga no concelho do Funchal e Câmara de Lobos.

Os ovos de *Ae. aegypti* são colocados individualmente na superfície da água. A eclosão demora cinco dias, mas pode ser adiada por vários meses ou anos até as condições ideais à eclosão serem satisfeitas. O ovo é resistente à dessecação, ao calor (+46°C) e ao frio (-17°C).

O desenvolvimento das larvas demora cerca de dez dias. Os criadouros são geralmente pequenos reservatórios de água, limpos ou poluídos, encontrados nos aglomerados urbanos (vasos de flores, latas abandonadas, sarjetas, etc.).

O adulto é um mosquito pequeno e caracteristicamente listrado a branco e preto. Vive aproximadamente um mês e pode ser facilmente criado em laboratório (espécie estenogâmica). As fêmeas são extremamente agressivas e picam dentro e fora das habitações a qualquer hora do dia, mas são mais activas ao entardecer.

Ae. aegypti é uma espécie de grande importância médica. É o principal vetor do vírus Dengue, do vírus da Febre amarela e pode também transmitir o vírus West Nile, a mixomatose, o plasmódio aviário e a filariase canina.

A abundância relativa de *Ae. aegypti*, determinada na ilha da Madeira no REVIVE 2013, foi de 39% para mosquitos adultos e 88% para mosquitos imaturos.



3.3. Agentes patogénicos

Pela sua importância como zoonoses emergentes em Portugal e na Europa, no âmbito do REVIVE pesquisou-se a presença de *Flavivirus* em *pools* de mosquitos.

Os *Flavivirus* incluem um grupo diverso de vírus que parecem ter evoluído de forma concertada com os seus vetores, podendo ser divididos em quatro grupos: I - transmitidos por carraças; II - transmitidos por mosquitos, que podem ainda ser subdivididos em transmitidos por mosquitos do género *Aedes* ou *Culex*, III - sem vetor conhecido e IV - específicos de insetos (*Insect Specific Flavivirus*, ISFs) que podem representar um grupo primordial de flavivírus, aparentemente incapazes de infectar vertebrados^{17,18}.

Em 2013, em 16009 mosquitos adultos identificados, tanto nos concelhos como nos portos e aeroportos, foram pesquisados para a presença de flavivírus 7395 mosquitos (46,2%; em 233 *pools*) de espécies vectoras. Não foram identificados flavivírus patogénicos para o Homem, no entanto foram detetados ISFs em 3 *pools* de *Aedes aegypti* colhidos na Madeira.

Os ISFs representam um subgrupo de flavivírus com uma elevada diversidade genética. Até ao momento apenas foram isolados ou detetado em insetos, apresentando incapacidade ou dificuldade de se replicar em células de vertebrados. O primei-

ro ISF reconhecido foi o *Cell Fusing Agent Virus* (CFAV) que foi isolado em 1975 de uma linha celular de *Ae. aegypti*¹⁹. Com a percepção da importância dos arbovírus como zoonoses emergentes e o desenvolvimento de programas de vigilância entomológica, o isolamento e deteção de ISFs têm sido reportados com mais frequência em todos os continentes.

No âmbito do REVIVE já foram detetados três tipos diferentes de ISFs, associados a diferentes géneros de mosquitos: *Aedes* (*Ae. aegypti* na Madeira, 2010 e 2013), *Culex* (*Cx. theileri* em Lisboa e Vale do Tejo, 2008), no Alentejo, 2009 e 2010 e na Madeira, 2010) e *Ochlerotatus* (*Ochlerotatus caspius* no Algarve, 2008). Na análise filogenética, apresentada na Figura 13, pode-se observar a identidade das seqüências de vírus específicos de inseto identificados em 2013 e nos anos em que o programa REVIVE decorreu, assim como a sua distância em relação aos vírus dos grupos de causam doença no Homem.

A importância e manutenção destes vírus na natureza ainda não está esclarecida, no entanto, pensa-se que poderão em situações de co-infecção (mosquitos infetados em simultâneo por um flavivírus patogénico e um ISF) impedir a transmissão de vírus patogénicos. No entanto, embora existam estudos que apoiam esta hipótese, também há evidências de interações positivas entre o vírus WN e ISFs (com coexistência dos dois vírus ou promoção

17. Calzolari M, Zé-Zé L, Růžek D, Vázquez A, Jeffries C, Defilippo F, Osório HC, Kilian P, Ruiz S, Fooks AR, Maioli G, Amaro F, Tlustý M, Figuerola J, Medlock JM, Bonilauri P, Alves MJ, Šebesta O, Tenorio A, Vaux AG, Bellini R, Gelbič I, Sánchez-Seco MP, Johnson N, Dottori M. (2012). Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J Gen Virol* 93: 1215-1225.

18. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol* 72 (1): 73-83.

19. Stollar V, Thomas VL. (1975). An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Pelec) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, 64(2), 367-377.



da infeção por WN)^{20,21}. Contudo os estudos preliminares realizados num ISF, vírus Marim, isolado num *pool* de *Oc. caspius* no sul de Portugal, indiciam a inibição ou redução da replicação do vírus WN em co-infeção ou superinfeção com o vírus Marim (trabalho submetido para publicação). Se a pesquisa de flavivírus já era plenamente justificada pela comprovada circulação do vírus *West Nile* no nosso país^{22,23,24}, com o surto de Dengue em 2012 na Madeira²⁵, a vigilância epidemiológica destes agentes torna-se cada vez mais importante, para a adequação atempada de medidas de controlo das espécies vectoras.

-
20. Newman CM, Cerutti F, Anderson TK, Hamer GL, Walker ED, et al. (2011). *Culex flavivirus* and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 1099-1105
 21. Kent RJ, Crabtree MB, Miller BR (2010). Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex Flavivirus* Izabal. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e671
 22. Connell J, McKeown P, Garvey P, Cotter S, Conway A, O'Flanagan D, O'Herlihy BP, Morgan D, Nicoll A, Lloyd G. (2004). Two linked cases of West Nile virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal. *Euro Surveill.* 2004;8(32):pii=2517. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2517>
 23. Alves MJ, Poças JMD, Osório HC, Amaro F, Zé-Zé L (2012). Infeção por vírus West Nile (Flavivírus) em Portugal. Considerações acerca de um caso clínico de síndrome febril com exantema. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 8 (1): 46-51.
 24. Barros, S.C., et al., Serological evidence of West Nile virus circulation in Portugal. *Vet. Microbiol.* (2011), doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.013
 25. Alves MJ, Fernandes PL, Amaro F, Osório H, Luz T, Parreira P, Andrade G, Zé-Zé L, Zeller H. (2013) Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Euro Surveill.*;18(6):pii=20398. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20398>

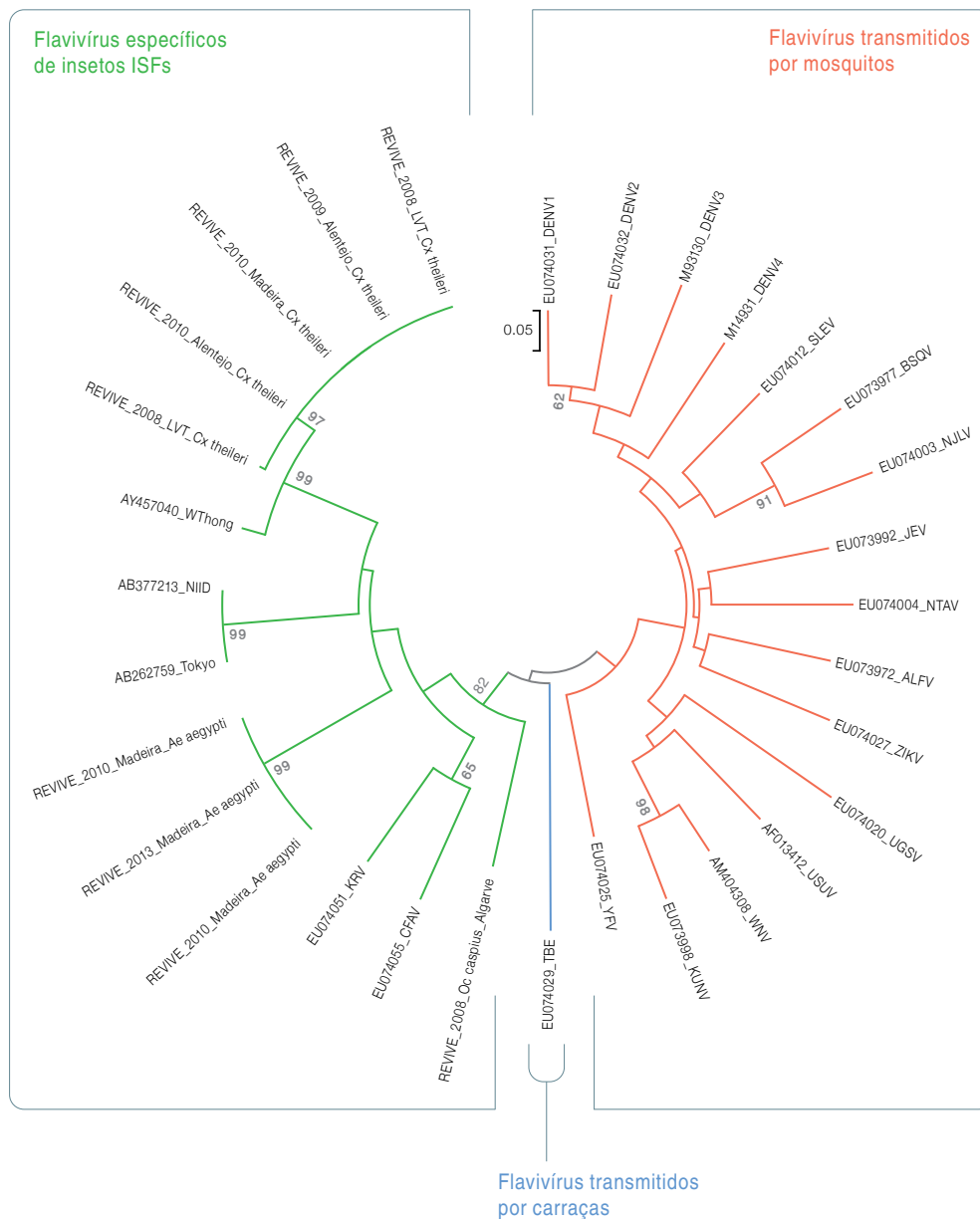


Figura 13 – Árvore filogenética dos flavivírus de mosquitos detetados de 2008 a 2013 no REVIVE

A análise filogenética apresentada na figura é baseada na sequência parcial do gene NS5 e foi construída no programa Mega versão 6 com um conjunto de sequências de flavivírus usando o método de Neighbor-joining com bootstrap (1000 réplicas). A vermelho apresentam-se os flavivírus transmitidos por mosquitos, a azul os transmitidos por carrças e a verde os ISFs. O n.º de acesso do GenBank é apresentado na árvore antes da abreviatura do

nome do vírus. Abreviaturas: DENV (vírus Dengue), SLEV (vírus Encefalite de St. Louis), BSQV (vírus Bussuquara), NJLV (vírus Naranjal), JEV (vírus Encefalite Japonesa), NTAV (vírus Ntaya), ALFV (vírus Alfuy), ZIKV (vírus Zika), UGSV (vírus Uganda S), USUV (vírus Usutu), WNV (vírus *West Nile*), KUNV (vírus Kunjin), YFV (vírus Febre Amarela), TBE (vírus Encefalite Transmitida por Carrças), CFAV (vírus *Cell Fusing Agent*), KRV (vírus Kamiti river).

4. Vigilância em Portos e Aeroportos

De acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (D.R. 1.ª série, N.º 16, de 23 de Janeiro de 2008) devem ser estabelecidos programas de vigilância e controlo de vetores no perímetro de portos e aeroportos, locais privilegiados para os processos de invasão e estabelecimento de espécies exóticas.

A vigilância nestes locais deve ser realizada durante todo o ano.

A vigilância nos portos e aeroportos, no âmbito do REVIVE, foi realizada em oito portos marítimos (Vila

Real de Santo António, Portimão, Sines, Setúbal, Figueira da Foz, Aveiro, Leixões e Viana do Castelo) e dois aeroportos internacionais (Faro e Porto).

Nas Figuras 14 e 15 representa-se o esforço de captura (número de colheitas) realizado nos concelhos exclusivamente no âmbito dos portos e aeroportos.

Os mosquitos adultos (n=4695) foram capturados em 128 armadilhas/noite e os mosquitos imaturos (n=1994) foram colhidos, sobretudo em *ovitrap*s (criadouros artificiais para oviposição), vigiadas 881 vezes.

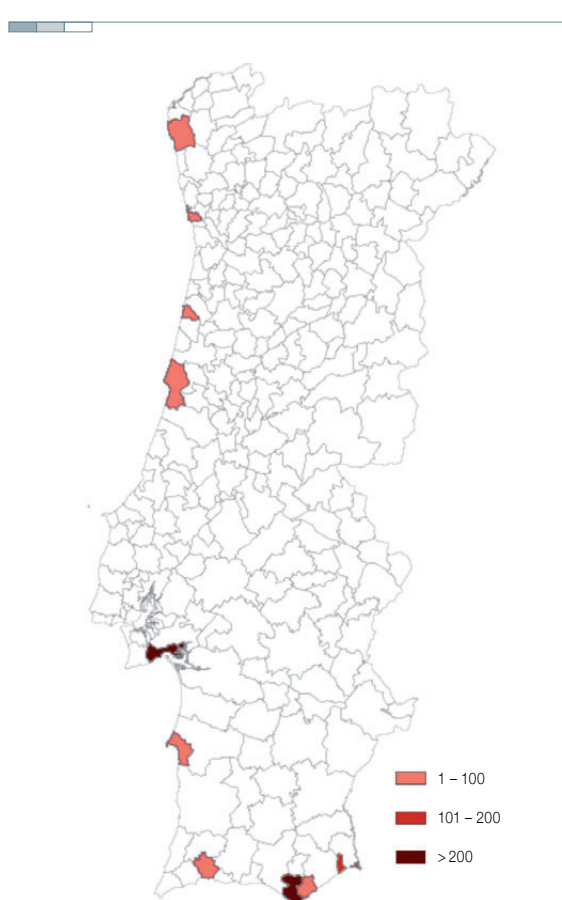


Figura 14 – Vigilância de mosquitos imaturos em portos e aeroportos

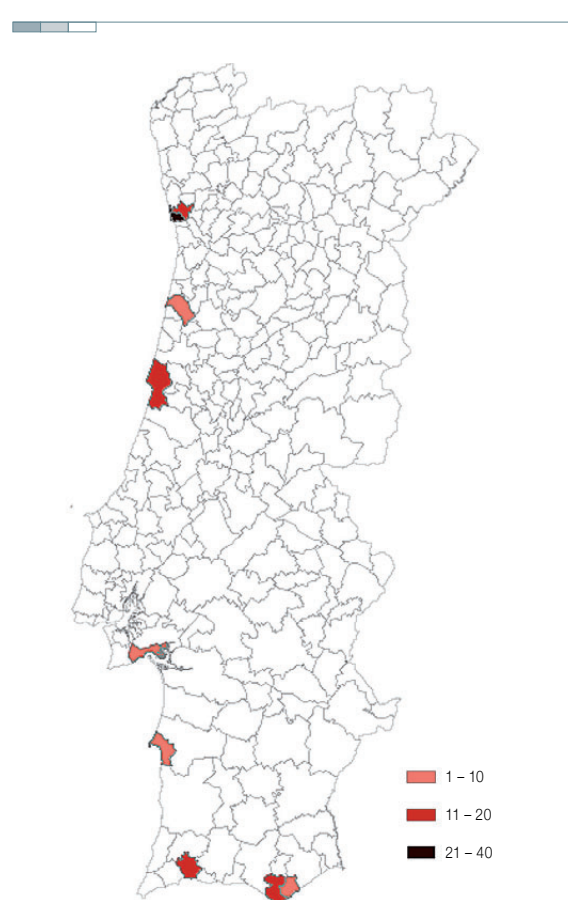


Figura 15 – Vigilância de mosquitos adultos em portos e aeroportos



Os 6689 espécimes de mosquitos adultos e imaturos foram identificados como pertencendo a nove espécies conhecidas da fauna de culicídeos de Portugal (Quadro 2).

Apesar das espécies identificadas não representarem algum risco em saúde pública indicam que

nestes locais existem condições ambientais adequadas à sobrevivência de culicídeos e que as espécies exóticas/invasoras, que podem ser introduzidas como *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, terão possibilidade de se estabelecerem e a partir de aí se dispersarem para outras regiões.

Quadro 2 – Espécies de mosquitos identificadas na vigilância de portos e aeroportos

	An. <i>maculipennis</i>	Cx. <i>laticinctus</i>	Cx. <i>hortensis</i>	Cx. <i>pipiens</i>	Cs. <i>annulata</i>	Cs. <i>longiareolata</i>	Cx. <i>theileri</i>	Oc. <i>caspius</i>	Oc. <i>detritus</i>
Portos marítimos									
Aveiro				x		x		x	
Figueira da Foz				x			x	x	x
Leixões				x		x	x		
Portimão				x	x	x		x	
Setúbal				x					
Sines	x			x		x	x	x	x
Viana do Castelo			x	x	x	x			
Vila Real de Santo António				x	x	x			
Aeroportos									
Faro		x		x		x	x	x	
Porto				x					

5. Conclusões

Entre Maio e Outubro de 2013 realizaram-se, em 128 concelhos de Portugal, 805 colheitas de culicídeos adultos e 1130 de imaturos.

A vigilância em portos e aeroportos foi realizada de Janeiro a Dezembro em oito portos e dois aeroportos em 128 colheitas de culicídeos adultos e em *ovitrap*s vigiadas 881 vezes.

Nos laboratórios foram identificados 39873 mosquitos de 22 espécies.

Na pesquisa de flavivírus não foram identificados vírus patogénicos.

Na vigilância realizada em oito portos e dois aeroportos, de Janeiro a Dezembro, foram identificadas unicamente espécies de culicídeos autóctones.

O ano de 2013 foi o 6.º ano de aplicação do programa REVIVE.

Nestes seis anos o número de concelhos onde têm sido feitas colheitas no âmbito do REVIVE aumentou de 43, em 2008, para 128, em 2013.



Desde o início do program REVIVE foram colhidos e identificados 192008 espécimes de mosquitos.

A atividade viral detetada nestes anos tem-se limitado a flavivírus específicos de inseto não patogénicos para o Homem.

O REVIVE tem contribuído, desde 2008, para o conhecimento sobre as espécies de vetores presentes nas regiões, a sua distribuição e abundância, assim como para o esclarecimento do seu papel como vetor de agentes de doença e para vigiar potenciais introduções de espécies invasoras com importância em Saúde Pública.

A prioridade do REVIVE é a vigilância e a prevenção para conhecimento da realidade local. Com os resultados do projecto REVIVE pretende-se, informar e alertar as autoridades de saúde pública para contribuir com medidas para o controlo das populações de vetores culicídeos de forma a mitigar o seu impacto em Saúde Pública.

3

REVIVE 2013

Ixodídeos

DGS – Divisão de Saúde Ambiental

ARS – Administração Regional de Saúde do Alentejo, Algarve, Lisboa e Vale do Tejo e Norte

INSA/DDI – Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac

Maria Margarida Santos-Silva, Ana Sofia Santos,
Isabel Lopes de Carvalho, Rita de Sousa, Natacha Milhano,
Hugo Osório, Maria João Alves e Maria Sofia Nuncio



1. Introdução

O programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores) resulta da colaboração entre instituições do Ministério da Saúde e tem vigiado a atividade de culicídeos (mosquitos) desde 2008.

Uma vez que actualmente os artrópodes vetores que constituem um maior risco para a Saúde Pública, em Portugal e na Europa, são os ixodídeos (carraças) justificou-se, em 2011, a inserção do estudo das carraças no programa REVIVE.

Os dados disponíveis demonstram que tem aumentado o número de casos de doenças associadas a picada de carraça. Este aumento está a ser potenciado por factores tão diversificados como as alterações climáticas, rapidez da deslocação de pessoas e bens, mudanças de comportamento, desenvolvimento tecnológico, alteração dos métodos de exploração agrícola e pecuária, entre outros.

Frequentemente, as autoridades de saúde têm tido uma resposta tardia, que surge unicamente após a ocorrência de um caso ou surto, usualmente associado a casos de morte. Considerando que se tratam de doenças que podem ser prevenidas, sendo os métodos disponíveis para controlo e prevenção amplamente conhecidos, é unicamente necessário conhecer e caracterizar a zona geográfica para poderem ser estabelecidas medidas que visem mitigar o efeito das doenças associadas a carraças na população. Para isso é necessário conhecer quais as espécies de carraças presentes, qual a sua abundância, a taxa de infeção para cada um dos agentes infecciosos que circulam na mesma zona geográfica, período de

atividade, principais hospedeiros e factores de risco para a população exposta ao contacto com carraças.

O REVIVE-Ixodídeos tem como objetivo a inventariação das espécies e determinação da densidade populacional das espécies de carraças presentes em Portugal, vigiar a introdução de espécies exóticas, identificar focos de infeção e/ou factores de risco e pesquisar agentes patogénicos transmitidos por estas como as bactérias do género *Rickettsia* e *Borrelia*, com o objetivo de contribuir para o conhecimento da distribuição geográfica da abundância e períodos de atividade das espécies importantes em saúde pública.

No âmbito do REVIVE-Ixodídeos está previsto, sempre que se justifique, alertar as autoridades competentes para a necessidade de estabelecer medidas de prevenção, controlo e mitigação adequadas à situação em causa.

1.1. Carraças

Os ixodídeos, vulgarmente designados por carraças, são artrópodes vetores, que parasitam um vasto número de animais. A sua perpetuação na natureza depende da alimentação (refeições sanguíneas) que realizam para manter o seu ciclo de vida enquanto parasitas. As carraças podem acidentalmente parasitar o Homem e se estiverem infetadas podem transmitir os agentes infecciosos enquanto realizam a sua alimentação.

Actualmente conhecem-se 889 espécies de carraças que se subdividem em duas famílias principais: Ixodidae e Argasidae. A família mais importante, no

que diz respeito à transmissão de agentes infecciosos, é a família Ixodidae. Em Portugal conhecem-se 21 espécies de carraças desta família e das doenças mais importantes causadas por agentes transmitidos por estas salientam-se a febre escararodular e a borreliose de Lyme.

Ciclo de vida das carraças

Os ixodídeos são parasitas hematófagos estritos de um grande número de vertebrados, como mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Todas as espécies de carraças necessitam de ingerir sempre uma quantidade mínima de sangue para poderem realizar uma muda e passar à fase evolutiva seguinte. O seu ciclo termina com o acasalamento e a postura dos ovos que vão garantir a geração seguinte. Os ixodídeos apresentam quatro fases ao longo do seu ciclo de vida: ovo, larva, ninfa e adulto (Figura 16).

A maior parte das espécies demora vários dias a completar a refeição sanguínea, em média 2-5 dias nas larvas, 3-5 dias nas ninfas e 7-14 dias no caso dos adultos. Os machos podem realizar uma pequena ingestão de sangue para terminar a espermatogénese, mas frequentemente não necessitam de efectuar refeição de sangue, pois completam a espermatogénese com a alimentação da fase ninfal. As fêmeas necessitam de ingerir grandes quantidades de sangue para garantir a postura, que pode oscilar entre algumas centenas a milhares de ovos, consoante a espécie. O número de ovos pode atingir os 20 000 no caso do género *Amblyomma*, se bem que normalmente a maioria das espécies presentes em Portugal apresentam posturas na ordem dos 3 000 - 5 000 ovos como é o caso de *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus sanguineus*, respetivamente.

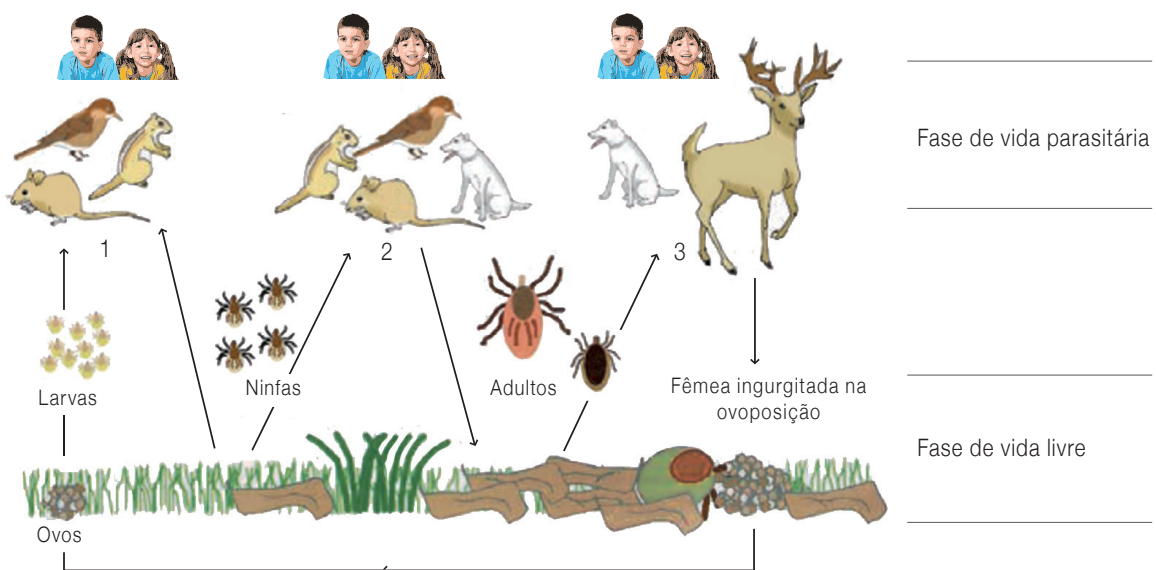


Figura 16 – Ciclo de vida dos ixodídeos

Adaptado de <http://www.hvceo.org/images/lymethreehostlifecycle.jpg>

A postura pode ser efectuada directamente no solo ou em fendas e no interior das tocas ou dos ninhos dos animais que parasitam. Quando a postura termina a fêmea morre. De cada ovo eclode uma larva hexápode que após efectuar uma refeição de sangue passará à fase evolutiva seguinte, até completar o seu ciclo de vida.

O ciclo de vida dos ixodídeos é muito semelhante para todas as espécies. Todos apresentam um único estágio ninfal. Após a cópula que, com excepção de quase todas as espécies do género *Ixodes* ocorre sobre o hospedeiro, as fêmeas alimentam-se até à total repleção (aumentando o seu volume até 100 vezes) soltam-se do hospedeiro e iniciam a postura, no solo ou sob pedras normalmente em locais recônditos e sombrios.

Como artrópodes hematófagos estritos, os ixodídeos são vetores de agentes, tais como vírus, bactérias e protozoários com implicação em saúde pública e sanidade animal.

Entre as características que tornam os ixodídeos bons vetores de agentes patogénicos destacam-se:

- Todos os estádios (larva, ninfa e adulto) necessitam de efectuar uma refeição de sangue, ingerindo sempre uma quantidade considerável (comparativamente com as suas dimensões) de cada hospedeiro;
- A ingurgitação demora vários dias a completar-se, permitindo um contacto prolongado com o hospedeiro;
- Em algumas associações ixodídeo/agente infeccioso é possível que ocorra a invasão do sistema

reprodutor, permitindo assim a transmissão da infeção à progenitura (transmissão transovarial). A percentagem de fêmeas transmitindo um agente transovaricamente e a percentagem da geração seguinte que eclode já infetada depende do grau de infeção dos tecidos do ovário e das células germinativas e pode ser muito importante para a manutenção de microrganismos na natureza;

- A metamorfose não envolve a degeneração e regeneração total de cada órgão, pelo que os microrganismos podem sobreviver em alguns órgãos após a muda (transmissão transestadial);
- Pelo menos um dos estádios dos ixodídeos possui um tempo de vida longo, pelo que os microrganismos podem sobreviver durante largos períodos, mesmo em condições climáticas adversas;
- O sistema sensorial é extremamente bem desenvolvido, o que permite aos ixodídeos detetar o gás carbónico, emitido pelos animais, no ambiente. Assim, eles concentram-se perto dos locais habituais de passagem, aumentando as suas hipóteses de encontrar um hospedeiro adequado.

A maioria das espécies com interesse em medicina humana e animal pertence à família Ixodidae. As espécies pertencentes a este grupo apresentam um escudo quitinoso rígido, na parte anterior da superfície dorsal das larvas, ninfas e fêmeas. Nos machos este escudo ocupa toda a superfície dorsal. Na Europa ocidental, os géneros mais importantes são *Dermacentor* (Koch, 1844), *Hae-maphysalis* (Koch, 1844), *Hyalomma* (Koch, 1844),

Ixodes (Latreille, 1795) e *Rhipicephalus* (Koch, 1844), tendo sido referenciados mais de 25 agentes etiológicos transmitidos por estes ixodídeos. A transmissão de numerosos agentes patogénicos por uns ixodídeos e não por outros faz com que a sua determinação específica constitua uma condição indispensável para o conhecimento da etiologia de diversas doenças do Homem e dos animais, como base para o seu combate e profilaxia. Não é possível falar de métodos gerais aplicáveis a todas as espécies, mas sim contra esta ou aquela espécie; quer se recorra à luta química, quer aos métodos de condicionamento ecológico (supressão dos roedores e dos carnívoros selvagens, processos agrícolas, manipulação animal, controlo biológico ou controlo integrado), não é possível obter bons resultados sem conhecimento prévio da biologia da espécie ixodológica em causa.

A lista actualizada de espécies de carraças presentes em Portugal engloba 21 espécies: *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), *Haemaphysalis hispanica* (Gil Collado, 1938), *Haemaphysalis inermis* (Birula, 1895), *Haemaphysalis punctata* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Hyalomma lusitanicum* (Koch, 1844), *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), *Ixodes acuminatus* (Neumann, 1901), *I. arboricola* (Schulze & Schlottke, 1930), *Ixodes bivari* (Dias, 1990), *Ixodes canisuga* (Johnston, 1849), *Ixodes frontalis* (Panzer, 1798), *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815), *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Ixodes simplex* (Neumann, 1906), *Ixodes ventalloi* (Gil Collado, 1936), *Ixodes vespertilionis* (Koch, 1844), *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* (Say,

1821), *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Rhipicephalus pusillus* (Gil Collado, 1938) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).

Pela sua abundância e pelos agentes etiológicos que podem transmitir, as duas espécies mais importantes em termos de saúde pública são *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

1.2. Doenças transmitidas por carraças

Enquanto portadora de microrganismos, a carraça pode transmitir uma grande variedade de doenças.

As doenças transmitidas por carraças constituem um perigo para a saúde pública e para a sanidade animal, não só pela gravidade de algumas patologias, como pelo facto de muitas vezes surgirem com carácter epidémico, podendo ocasionar surtos de grandes proporções, caso não seja implementada uma intervenção rápida.

O risco de contrair estas doenças tem vindo a aumentar, especialmente no Sul da Europa. Em Portugal, o número de doenças endémicas é considerado elevado, com cinco a oito doenças endémicas identificadas²⁶, este mesmo nível é partilhado pela maioria dos países mediterrânicos, como Espanha, França, Itália, Grécia e Turquia, decrescendo para norte. A Alemanha, a Áustria ou a Polónia, por exemplo, registam um nível médio (três a quatro doenças endémicas) enquanto o Reino Unido, a Suécia e a Noruega são países com baixa endemicidade (uma a duas doenças endémicas). Em Portugal já foram assinaladas várias infecções associadas a carraças (Quadro 3), no entanto, as doenças com maior impacto em saúde pública são a febre escaro nodular e a borreliose de Lyme.

26. Santos-Silva MM, Santos AS, Formosinho P, Bacellar F. 2006. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. Acta Méd Port, 19, 39-48.

**Quadro 3** – Agentes transmitidos por ixodídeos presentes ou em risco de emergir em Portugal

Agente patogénico	Doença	Espécie de ixodídeo
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> *	Anaplasmosose humana	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. ventrallo</i>
<i>Babesia divergens</i>	Babesiose	<i>Ixodes spp.</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.*	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>B. garinii</i> *	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>B. afzelii</i> *	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>B. valaisiana</i> *	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>B. lusitaniae</i> *	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>B. turdi</i> *	–	
<i>Coxiella burnetii</i> *	Febre Q	Várias espécies
<i>Francisella tularensis</i> *	Tularémia	Várias entre as quais <i>Ixodes ricinus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i>
<i>R. aeschlimannii</i> *	Sem denominação	<i>Hyalomma marginatum</i>
<i>Rickettsia conorii</i> *	Febre escaro nodular	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>R. helvetica</i> *	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>R. massiliae</i> *	Sem denominação	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>R. monacensis</i> *	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>R. sibirica mongolotimoniae</i> *	LAR*	<i>Hyalomma sp.</i> , <i>Rhipicephalus pusillus</i>
<i>R. slovaca</i> *	TIBOLA†	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>
Vírus da Febre Hemorrágica Crimeia-Congo	Febre hemorrágica	<i>Hyalomma marginatum</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>Dermacentor spp.</i> , <i>Rhipicephalus spp.</i>
Vírus Eyach	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes ventrallo</i>
Vírus TBE	Encefalite	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i>

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

1.2.1. Febre escaro nodular e outras rickettsioses

A febre escaro nodular (FEN) é uma doença endémica em Portugal.

O agente etiológico responsável por esta patologia é a bactéria *Rickettsia conorii*.

Rhipicephalus sanguineus, vulgarmente designada por carraça do cão, é o vetor mais importante sob o ponto de vista epidemiológico da FEN. Qualquer estágio (larva, ninfa, adulto) do *R. san-*

guineus pode parasitar o homem, no entanto o período de incubação da doença e o ciclo biológico do vetor, indicam que as ninfas são o estágio responsável pelo maior número de casos de FEN nos meses de Agosto e Setembro. Apesar de ser uma doença com características estivais, as condições climáticas em algumas regiões do nosso país permitem que o vetor se mantenha activo todo o ano e possa transmitir o agente mesmo fora desta época.

A FEN caracteriza-se clinicamente como uma doença exantemática, com um processo de vasculite generalizado. O diagnóstico da FEN é habitualmente clínico. Contudo em Portugal, segundo a Circular Normativa n.º3/DSIA de 1999 da DGS, os casos suspeitos devem ter confirmação laboratorial. A circular descreve ainda que o diagnóstico clínico de FEN baseia-se na “*observação de febre de início súbito, artralgias e mialgias, com aparecimento de uma erupção maculopapulosa não pruriginosa, afectando geralmente as regiões palmar e plantar dos membros entre o 3.º e 5.º dia. Escara de inoculação acompanhada de linfadenopatia regional*”. A existência de um contexto epidemiológico compatível é importante, devendo ter-se em consideração a época do ano, o contacto com animais, as atividades ao ar livre, a atividade profissional e as viagens, entre outros.

A taxa de incidência desta doença em Portugal é uma das mais altas quando comparada com outros países da bacia do Mediterrâneo. Apesar da maioria dos casos apresentarem evolução benigna, registam-se casos graves. O número de óbitos ocorridos por esta patologia é também elevado em Portugal comparativamente a outros países onde a doença é endémica. Bragança é o distrito com maior número de casos por habitante (62,5/10⁵ hab) seguido pelo distrito de Beja^{27,28}. A FEN é uma doença com uma distribuição homogénea relativamente aos sexos e o grupo etário mais afectado é o dos 1-4 anos de idade. Apesar de ser

uma doença de declaração obrigatória, continua-se a subestimar a sua verdadeira incidência devido à elevada subnotificação.

No quadro 3, apresentam-se ainda outras espécies de rickettsias capazes de causar doença no Homem. Apesar de todas estas espécies terem sido detetadas em ixodídeos no nosso País, apenas foram descritos, até à data, cerca de 10 casos clínicos de infeção por *R. sibirica mongolotimonae* e um caso de infeção por *R. slovaca*²⁹. O número reduzido de casos associados a outras espécies de rickettsia deve-se, provavelmente, ao facto de a maior parte não ter confirmação laboratorial por técnicas de identificação molecular.

1.2.2. Borreliose de Lyme

A borreliose de Lyme é uma doença multissistémica, que pode afectar vários tecidos ou órgãos. É uma doença evolutiva que na sua fase inicial se caracteriza pelo aparecimento de uma lesão na pele, designada como eritema migratório. Nas fases seguintes outros órgãos podem ser afectados causar lesões ao nível articular (artrite de Lyme), neurológico (neuroborreliose) ou dermatológico (acrodermatite crónica atroficante).

Esta doença tem uma distribuição mundial e é causada por espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* sensu lato, que são transmitidas por carraças antropofílicas do género *Ixodes*. Actualmente já se encontram descritas 19 genoespécies do comple-

27. Sousa, R., Nobrega, S.D., Bacellar, F. & Torgal, J. Sobre a realidade epidemiológica da febre escaro-nodular em Portugal. Acta Méd. Portuguesa, 2003. 16, 430-438.

28. de Sousa R, Nóbrega SD, Bacellar F, Torgal J. Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;990:285-94.

29. de Sousa R, Pereira BI, Nazareth C, Cabral S, Ventura C, Crespo P, Marques N, da Cunha S. *Rickettsia slovaca* infection in humans, Portugal. Emerg Infect Dis. 2013 Oct;19(10):1627-9



xo *B. burgdorferi* s.l. em todo o mundo, sendo que em Portugal já foram detetadas seis. A mais prevalente é sem dúvida *B. lusitaniae* isolada pela primeira vez no CEVDI a partir de *I. ricinus* colhidos em Águas de Moura³⁰. Estudos recentes demonstraram que esta espécie é patogénica para o Homem^{31,32}. No nosso País, apesar de já terem sido detetadas borrélias em outras espécies de ixodídeos, *I. ricinus* é a única espécie de carraça com competência vetorial comprovada para *B. burgdorferi* s.l.

Antes de o ixodídeo iniciar a refeição de sangue, as borrélias encontram-se restritas à área do intestino, nas microvilosidades e no epitélio. Durante a alimentação as espiroquetas passam para os outros tecidos e glândulas salivares, sendo a transmissão ao Homem efectuada pela inoculação das bactérias juntamente com a saliva, durante a refeição sanguínea. A transmissão pode ocorrer 24h após o início da refeição, mas a maior parte das borrélias só passa para o sangue do hospedeiro ao fim de 48h. Qualquer dos estádios (larva, ninfa e adulto) pode transmitir o agente ao homem. O estágio ninfal parece ser o mais perigoso uma vez que como possui menores dimensões torna-se mais difícil de detetar. Estas bactérias já foram isoladas a partir de mais de 20 espécies de mamíferos domésticos e silvestres e de oito espécies de aves. Todos eles parecem ser reservatórios competentes.

2. Metodologias REVIVE

A colheita de carraças foi realizada na sua fase de vida livre (sobre a vegetação) e na sua fase parasitária (sobre os hospedeiros humanos, cães e outros animais) ao longo de todo o ano.

Colheita de carraças em fase de vida livre (vegetação)

As colheitas de carraças em fase de vida livre foram realizadas em habitats onde havia possibilidade, ou historial, de ocorrência de carraças. As zonas escolhidas foram seleccionadas pelas diferentes ARS's. A colheita das carraças na vegetação foi realizada pelo método de arrastamento da bandeira que consiste na passagem de um pano turco, de cor branca, sobre a vegetação a uma velocidade constante em linhas de aproximadamente 100m. As carraças foram recolhidas, com o auxílio de pinças, acondicionadas em frascos com garantia de manutenção de nível mínimo de humidade no interior, identificados e mantidos no frigorífico até serem enviadas acondicionadas e enviadas para o laboratório (Figura 17).

Colheita de carraças em fase de vida parasitária (sobre o hospedeiro)

Esta operação envolveu a colheita de carraças em diferentes hospedeiros, nomeadamente no Homem, em cães e em outros animais de estimação ou gado. A colheita das carraças nos hospedeiros foi efectuada por remoção directa, com o auxílio

30. Nuncio, MS; Péter, O; Alves, MJ; Bacellar, F e Filipe, AR. Isolamento e caracterização de borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. Rev. Port. Doenç. Infec. 1992; 16(3): 175-179.

31. Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Gonçalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. J Clin Microbiol. 2004 Mar;42(3):1316-8.

32. de Carvalho IL, Fonseca JE, Marques JG, Ullmann A, Hojgaard A, Zeidner N, Nuncio MS. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. Clin Rheumatol. 2008 Dec;27(12):1587-91.



Figura 17 – Método de captura de carrças em fase de vida livre

de pinças, acondicionadas em frascos com garantia de manutenção de nível mínimo de humidade no interior, identificados e mantidos no frigorífico até serem enviadas para o CEVDI.

Transporte

As amostras foram enviadas das ARS's ao CEVDI/INSA por correio, ou em mão, acondicionadas em malas refrigeradas, até três dias depois do início do trabalho de campo, em “triple packaging”, recomendado pela OMS para o transporte de produtos biológicos.

Identificação dos exemplares colhidos

Os exemplares foram identificados com base nos caracteres morfológicos que exibiam, separados de acordo com a espécie, género, data e local e forma de colheita.

Detecção dos agentes infecciosos

Depois de identificada a espécie de cada exemplar, cada carrça, individualmente foi lavada e extraído o DNA pelo método de hidrólise por solução de amónia. Posteriormente foram feitos pools de DNA com uma a cinco carrças da mesma

colheita, espécie e estado evolutivo. As carrças removidas de humanos, pela sua importância, foram estudadas individualmente recorrendo à extração de DNA com o kit comercial *MagCore Genomic DNA Tissue®*. A pesquisa de DNA específico de *Rickettsia* e *Borrelia* foi realizada pela técnica de PCR convencional e PCR nested e os positivos foram depois sequenciados para a confirmação e identificação da espécie bacteriana.

Comunicação

Mensalmente foram enviados por correio electrónico, aos participantes REVIVE, resumos dos resultados das colheitas, identificações e pesquisa de agentes infecciosos.

No término das colheitas e trabalho laboratorial de identificação de carrças e pesquisa de agentes patogénicos, o CEVDI/INSA preparou os quadros resumo dos dados REVIVE relativo a cada uma das regiões, neste caso ARS Algarve, Alentejo, Lisboa e Vale do Tejo, Norte e a nível nacional e apresenta-os na forma de relatórios.

Em Abril de cada ano é organizado o Workshop REVIVE nas instalações do CEVDI/INSA em Águas



de Moura, com a participação de técnicos e responsáveis das ARS's, INSA e DGS.

Formação

No âmbito do REVIVE-Ixodídeos são organizadas acções de formação, com duração de um dia, destinadas aos colaboradores REVIVE. Na formação pretende-se divulgar a importância da vigilância de vetores e agentes transmitidos, demonstrar o funcionamento do projecto REVIVE, assim como treinar os formandos para as colheitas de carraças. A formação é da responsabilidade dos investigadores do CEVDI/INSA que prepararam um "Manual REVIVE-Ixodídeos" para distribuição aos formandos. No decorrer do programa nacional, entre 2011 e 2013 foram instruídos 109 formandos.

Em 2014 vai decorrer a 4.ª edição da Formação REVIVE- Carraças.

como critério principal a proximidade à população humana, o historial da presença de carraças, a ocorrência de doenças associadas, o impacto nas atividades humanas e a acessibilidade do local, assim como a experiência adquirida em anos anteriores no âmbito do REVIVE.

Como colheita efectuada na vegetação considerou-se todas as efectuadas em fase de vida livre da carraça incluindo, para além da vegetação, residências, paredes, habitações, solo, etc.

O esforço de captura (número de colheitas) de carraças por concelho variou entre uma colheita e mais do que 60 colheitas (Figura 18).

Das 1103 colheitas realizadas, 182 foram feitas no Homem (Figura 19), 470 no cão (Figura 20), 128 em outros animais excepto o cão (Figura 21) e na fase de vida livre (vegetação) 323 colheitas (Figura 22).

3. Vigilância nos concelhos

3.1. Colheitas

O trabalho de campo, realizado pelas Administrações Regionais de Saúde, para colheita de carraças decorreu entre Janeiro e Dezembro de 2013.

As colheitas foram realizadas em 126 concelhos de quatro regiões de saúde de Portugal continental, nomeadamente Alentejo, Algarve, Lisboa e Vale do Tejo e Norte.

Os locais, assim como a periodicidade da amostragem, foram seleccionados pelas ARS's, tendo

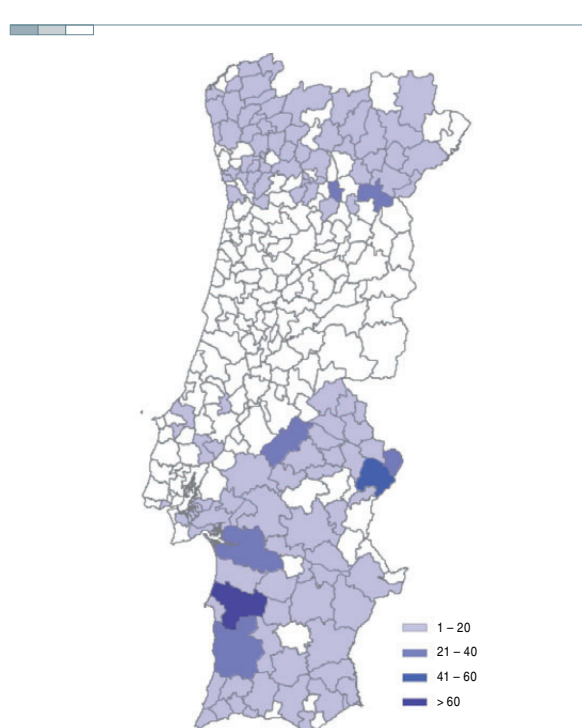


Figura 18 – Esforço de captura de ixodídeos por concelho

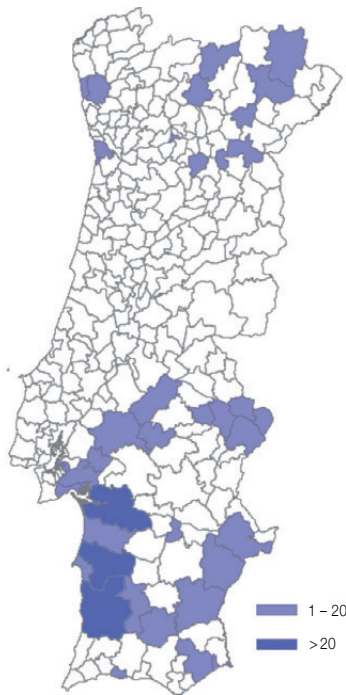


Figura 19 – Colheitas de ixodídeos no Homem

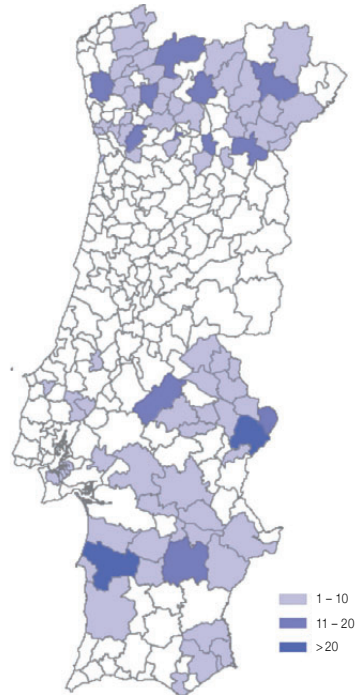


Figura 20 – Colheitas de ixodídeos no cão



Figura 21 – Colheitas de ixodídeos de animais (excepto cão)

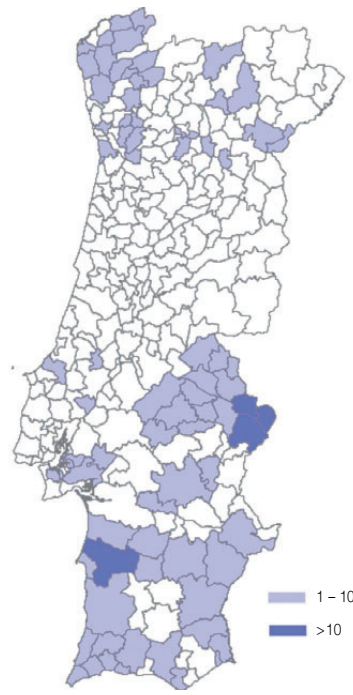


Figura 22 – Colheitas de ixodídeos na fase de vida livre (vegetação)

3.2. Espécies

Os ixodídeos identificados em 2013 nos laboratórios do CEVDI/INSA pertencem a cinco géneros e estão distribuídos por 12 espécies, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *Ixodes ricinus*, *I. canisuga*, *I. hexagonus*, *I. ventralloji*, *Rhipicephalus bursa*, *R. pusillus* e *R. sanguineus*. Todas as espécies detetadas tinham sido anteriormente assinaladas em Portugal continental³³.

Das espécies identificadas com importância em saúde pública, apresentam-se mapas de distribuição geográfica (presença/ausência) com

descrições sumárias e respetiva abundância relativa de sete espécies (Figura 23 a Figura 29). Nestes mapas estão assinaladas a distribuição das espécies de carraças que têm o estatuto de vetores de agentes patogénicos para o Homem e as espécies que, pela sua abundância, causam um impacto considerável nas populações de animais domésticos em termos veterinários e económicos.

Os mapas representam a cinzento os concelhos onde foram realizadas colheitas e a azul, os concelhos onde foram identificadas as espécies. A branco estão os concelhos onde não foram realizadas colheitas.

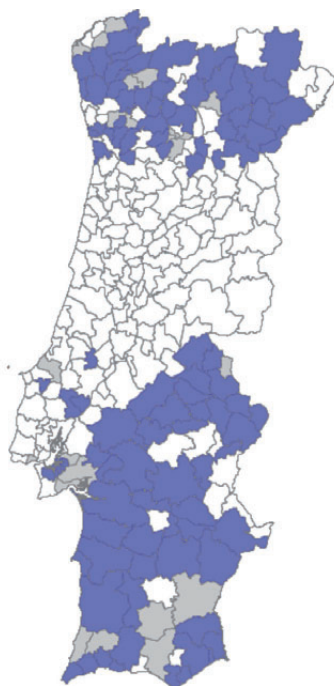


Figura 23 – Distribuição geográfica de *Rhipicephalus sanguineus*

Rhipicephalus sanguineus

Rhipicephalus sanguineus apresenta uma distribuição mundial. Em termos nacionais é a espécie mais abundante, o que se confirmou com os dados obtidos no REVIVE 2013, onde apresentou uma abundância relativa de 69,1%. Em Portugal esta espécie está adaptada do ponto de vista ecológico a todos os ambientes, a grandes variações de temperatura e humidade relativa, assim como a variados hospedeiros vertebrados. Assim, parasita numerosos animais silváticos e todas as espécies de animais domésticos, estando particularmente associada ao cão e ocasionalmente ao Homem. As maiores densidades populacionais foram encontradas nos meses mais quentes, pelo que esta espécie aparenta estar melhor adaptada a temperaturas altas, não sendo exigente quanto à humidade relativa, sobrevivendo com facilidade em climas secos. Os adultos estão activos todo o ano, com um aumento no período da Primavera/Verão. O desenvolvimento de formas imaturas de larvas e ninfas, estão sobretudo concentradas nos meses de Verão.

R. sanguineus é o vetor de *Rickettsia conorii*, agente etiológico da principal doença associada à picada de carraça, a FEN vulgarmente designada por febre da carraça. No entanto, *R. sanguineus* está também associado à transmissão de outras bactérias, cujos agentes etiológicos podem ser rickettsias ou outros agentes infecciosos, incluindo protozoários e vírus.

33. Santos-Silva MM, Beati L, Santos AS, De Sousa R, Nuncio MS, Melo P, Santos-Reis M, Fonseca C, Formosinho P, Vilela C, Bacellar F. 2011. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol.* 2011 Sep;55(1):85-121.

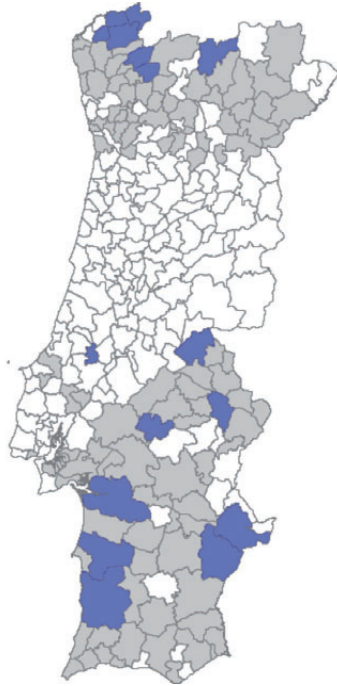


Figura 24 – Distribuição geográfica de *Rhipicephalus bursa*

Rhipicephalus bursa

Rhipicephalus bursa apresenta uma distribuição geográfica muito ampla, incluindo o Norte de África, Europa e Ásia. Em termos nacionais apresenta-se de norte a sul do País. Em 2013, no âmbito do REVIVE, foi determinada uma abundância relativa de 13,3%.

Em Portugal está adaptada, do ponto de vista ecológico, a todos os ambientes, a grandes variações de temperatura e humidade relativa, assim como a variados hospedeiros vertebrados essencialmente domésticos. Assim, parasita maioritariamente grandes e pequenos ruminantes particularmente a vaca, cabra e ovelha. Ocasionalmente parasita o Homem.

As maiores densidades populacionais foram encontradas em Julho, pelo esta espécie está bem adaptada a temperaturas intermédias a altas, não sendo exigente quanto a humidade relativa, sobrevivendo com facilidade quer em climas secos ou húmidos. Os adultos estão activos no período da Primavera/Verão. O desenvolvimento de formas imaturas de larvas e ninfas, estão sobretudo concentradas nos meses de Outono/Inverno.

R. bursa é uma espécie importante em termos de medicina veterinária em Portugal continental. Para além de vetor de agentes infecciosos a ruminantes como por exemplo, *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp., também já foram identificadas outros agentes etiológicos como, uma nova espécie de rickettsia próxima de *Rickettsia sibirica*, cujo papel em saúde pública ainda não está totalmente esclarecido³⁴. Por fim é ainda considerada uma praga pelo forte parasitismo em animais de produção, provocando danos consideráveis, quer nas populações animais, quer em termos económicos aos proprietários das explorações.

34. de Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato C, Torgal J, Walker D, Bacellar F. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. Emerg Infect Dis. 2006 Jul;12(7):1103-8.



Figura 25 – Distribuição geográfica de *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus

Dermacentor reticulatus apresenta uma distribuição geográfica que inclui Europa e Ásia. Em termos nacionais apresenta-se apenas na região norte do país. Em 2013, no âmbito do REVIVE foi identificada uma abundância relativa superior a 5%.

Na Europa, é considerada uma espécie em expansão devido aos efeitos provocados pelas alterações climáticas ou por modificações na utilização de terrenos agrícolas/florestais, o que conduz a que o seu rastreio apresente importância epidemiológica.

Do ponto de vista ecológico está bem adaptada, suportando temperaturas baixas ou mesmo negativas, requerendo alguma humidade relativa. Parasita essencialmente ungulados selvagens, como por exemplo o corço, o cão e, ocasionalmente, o Homem.

As maiores densidades populacionais foram encontradas em Novembro, pelo que esta espécie está bem adaptada a temperaturas baixas, requerendo humidade relativa e sobrevivendo com facilidade em climas frios.

Os adultos estão activos no período do Outono/Inverno. O desenvolvimento de formas imaturas de larvas e ninfas, ocorre sobretudo durante os meses de Verão.

D. reticulatus é uma espécie importante em termos de Saúde Pública. Para além de transmitir *Babesia canis* ao cão³⁵, também já foi associada transmissão de *Rickettsia slovaca*³⁶ e *Francisella tularensis* ao Homem³⁷.

35. Cardoso L, Costa A, Tuna J, Vieira L, Eyal O, Yisaschar-Mekuzas Y, Baneth G. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet Parasitol.* 2008 Oct 1;156(3-4):199-204.

36. de Sousa R, Pereira BI, Nazareth C, Cabral S, Ventura C, Crespo P, Marques N, da Cunha S. *Rickettsia slovaca* infection in humans, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2013 Oct;19(10):1627-9.

37. de Carvalho IL, Escudero R, Garcia-Amil C, Falcão H, Anda P, Nuncio MS. *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2007 Apr;13(4):666-7.

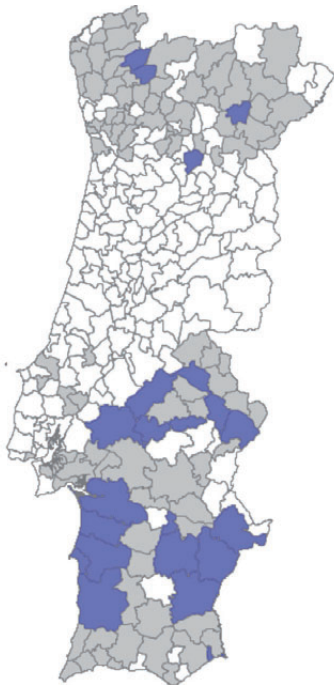


Figura 26 – Distribuição geográfica de *Hyalomma marginatum*

Hyalomma marginatum

Hyalomma marginatum tem uma distribuição geográfica que inclui África, Europa e Ásia. Em termos nacionais, a sua distribuição é mais homogénea na região Sul, embora já tenha sido assinalada em todo o território. Em 2013 a sua abundância relativa identificada no REVIVE foi superior a 4%.

Do ponto de vista ecológico está bem adaptada, suportando variadas temperaturas e humidade relativa. Parasita essencialmente animais domésticos de produção, aves e acidentalmente o Homem.

As maiores densidades populacionais foram encontradas em Julho, pelo que esta espécie está bem adaptada a temperaturas altas. Os adultos estão activos no período do Primavera/Verão. O desenvolvimento de formas imaturas de larvas e ninfas, estão sobretudo concentradas nos meses de Outono.

H. marginatum é uma espécie importante em termos de Saúde Pública. Para além de vetor de bactérias do género *Rickettsia* também é vetor do vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo.

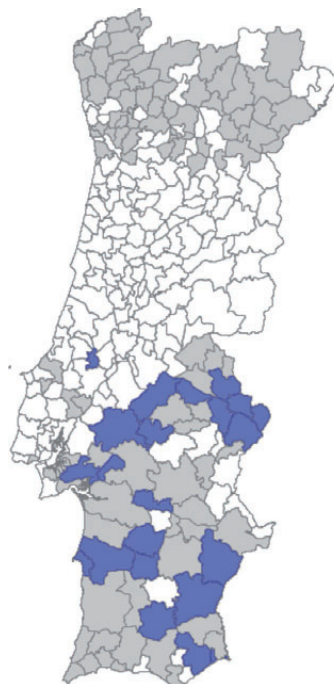


Figura 27 – Distribuição geográfica de *Hyalomma lusitanicum*

Hyalomma lusitanicum

Hyalomma lusitanicum é uma espécie cuja distribuição geográfica está restrita ao Sul da Europa e Norte de África. Em termos nacionais apresenta-se apenas na região Sul do País. Em 2013, no âmbito do REVIVE, a abundância relativa determinada foi superior a 2%.

Do ponto de vista ecológico está bem adaptada, suportando bem temperaturas altas e humidade relativa reduzida. Parasita essencialmente animais domésticos de produção, vários animais silváticos como leporídeos, insectívoros e carnívoros selvagens. Ocasionalmente parasita o Homem.

As maiores densidades populacionais foram encontradas em Junho, pelo que esta espécie está bem adaptada a climas quentes e secos.

Os adultos assim como os imaturos estão activos no período do Primavera/Verão, podendo a sua atividade extender-se até ao Outono.

H. lusitanicum é uma espécie que aparenta uma certa antropofagia relativamente ao Homem ao contrário do que é muitas vezes referido na bibliografia³⁸. O papel que desempenha em termos de Saúde Pública está ainda a ser investigado, uma vez que em Espanha o vírus Crimeia-Congo foi isolado a partir de exemplares desta espécie.

38. Santos-Silva MM, Beati L, Santos AS, De Sousa R, Nuncio MS, Melo P, Santos-Reis M, Fonseca C, Formosinho P, Vilela C, Bacellar F. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Exp Appl Acarol.* 2011 Sep;55(1):85-121.

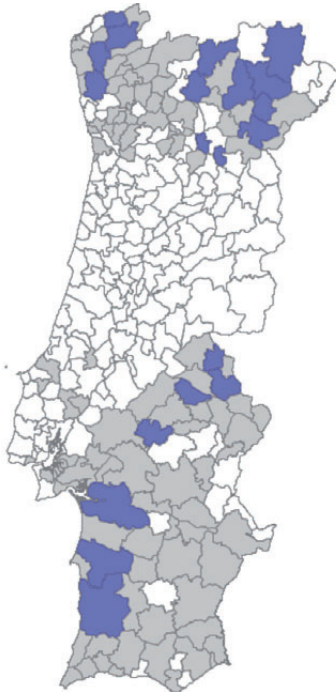


Figura 28 – Distribuição geográfica de *Dermacentor marginatus*

Dermacentor marginatus

Dermacentor marginatus apresenta uma distribuição geográfica ampla, que inclui Europa, Norte de África e Ásia. Em termos nacionais apresenta-se de norte a sul do País, com abundância relativa, de acordo com os dados obtidos no REVIVE 2013, de 1,6%. Considera-se importante a manutenção de estudos de vigilância epidemiológica, uma vez que a baixa abundância verificada em 2013, por comparação à determinada em anos anteriores, poderá refletir o impacto de alterações climáticas na sua distribuição.

Do ponto de vista ecológico, ocorre em regiões de clima temperado e seco, no entanto suporta com facilidade temperaturas mais elevadas ou mesmo muito baixas, não sendo também muito exigente em humidade relativa. Parasita uma variada gama de hospedeiros, abrangendo praticamente todos os mamíferos domésticos e vários silváticos assim como o Homem.

As maiores densidades populacionais foram encontradas em Outubro. Os adultos apresentam maior atividade no período de Outono-Inverno enquanto os imaturos estão mais activos no período do Primavera/Verão

D. marginatus é uma espécie importante em termos de Saúde Pública. Para além de vetor de *Rickettsia slovaca* agente etiológico de linfadenopatia causada pela picada de carraça (TIBOLA)³⁹ foram encontrados exemplares infetados com *Borrelia lusitaniae*, não sendo contudo claro o seu papel como vetor deste agente⁴⁰ e outras bactérias, protozoários e vírus.

39. de Sousa R, Pereira BI, Nazareth C, Cabral S, Ventura C, Crespo P, Marques N, da Cunha S. *Rickettsia slovaca* infection in humans, Portugal. Emerg Infect Dis. 2013 Oct;19(10):1627-9

40. Milhano N, de Carvalho IL, Alves AS, Arroube S, Soares J, Rodriguez P, Carolino M, Nuncio MS, Piesman J, de Sousa R. Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. Ticks Tick Borne Dis. 2010 Dec;1(4):172-7



Figura 29 – Distribuição geográfica de *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus

Ixodes ricinus apresenta uma distribuição geográfica que inclui Europa e Norte de África e Ásia menor. Em termos nacionais já foi assinalada em todo o território e em 2013, no âmbito do REVIVE, a sua abundância relativa foi de 1,3%.

Do ponto de vista ecológico, está adaptada a ambientes que apresentem uma cobertura vegetal considerável e onde se verifiquem elevados níveis de humidade relativa (especialmente acima dos 90%). É uma espécie muito dependente do estado higrométrico do ar e da temperatura cujo o equilíbrio lhe é essencial. Apresenta uma excepcional capacidade de adaptação a diversos hospedeiros parasitando tanto mamíferos domésticos e silváticos, como aves e lacertídeos, sendo de todas as espécies nacionais a que exhibe uma antropofagia bem marcada, aparecendo com muita frequência a parasitar o Homem durante os meses mais frios.

As maiores densidades populacionais foram encontradas nos meses de Outono-Inverno. No entanto na região Sul do País não foi detetada na vegetação, tendo todos os exemplares sido removidos de Homem, o que não aconteceu no Norte, em que foi encontrada na vegetação.

Os adultos podem estar activos todo o ano mas em especial durante o Outono/Inverno. O desenvolvimento de formas imaturas de larvas e ninfas, estão sobretudo concentradas nos meses de Primavera/Verão.

Em termos de Saúde Pública, *I. ricinus* é a segunda espécie mais importante em Portugal continental uma vez que é vetor de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, agente etiológico da segunda doença associada à picada de carraça com maior prevalência em Portugal, a borreliose de Lyme⁴¹, para além de estar associado à transmissão de outros agentes etiológicos, como rickettsias, protozoários e vírus.

Para além das sete espécies ixodológicas, cujos mapas foram apresentados acima, foram ainda identificadas outras cinco, nomeadamente *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes canisuga*, *I. hexagonus*, *I. ventraloi* e *Rhipicephalus pusillus* com abundâncias relativas determinadas no REVIVE 2013 inferiores a 1,2%.

Este valor pode refletir a verdadeira abundância das espécies em questão ou ser causada pelo en-

viesamento das capturas uma vez que algumas apresentam especificidade parasitária para alguns animais silváticos não pesquisados em 2013 ou períodos de atividades em épocas em que as colheitas na vegetação foram muito poucas ou mesmo inexistentes, devido eventualmente às condições climáticas adversas ou à limitação de recursos.

41. Lopes de Carvalho, I. and Nuncio, M.S. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis in Portuguese National Institute of Health (1990-2004). Eurosurveillance. 2006;11 (10):257-260.

Apesar da abundância relativa reduzida, são igualmente espécies que desempenham um papel importante em Saúde Pública, como por exemplo, *R. pusillus* que já foi identificado como vetor de *Rickettsia sibirica mongolotimonae*, espécie que causa doença no Homem⁴².

3.3. Agentes patogénicos

Na pesquisa de borrélias e rickettsias foram analisados 951 (11,9%) ixodídeos do total de exemplares capturados, distribuídos por 11 espécies e provenientes de 101 concelhos de norte a sul do País.

A selecção dos exemplares a testar foi efectuada com base na capacidade vetorial que determina das espécies têm para transmitir borrélias e rickettsias. A sazonalidade, a distribuição geográfica, a abundância e origem foram também factores ponderados de forma a assegurar a representatividade da amostra. No total foram analisados, pela técnica de PCR, 609 *pools* constituídos por um a cinco ixodídeos cada. Todos os exemplares removidos de humanos foram incluídos na pesquisa de agentes patogénicos e testados individualmente.

Dos 609 *pools* em estudo, 71 (11,7%) apresentaram resultados positivos. As amostras positivas foram provenientes de 29 concelhos de norte a sul de Portugal (Figura 30), envolvendo quatro espécies de ixodídeos – *D. marginatus*, *H. marginatum*, *I. ricinus* e *R. sanguineus*, sendo *I. ricinus* a que apresentou o maior número de *pools* positivos para ambos os grupos de agentes em estudo.

No total foram detetadas três espécies de borrélias e oito espécies de rickettsias: *Borrelia afzelii* (1,4%; N=1), *B. garinii* (2,8%; N=2), *B. lusitaniae* (4,2%; N=3); *Rickettsia aeschlimannii* (12,7%; N=9), *R. conorii* (7,0%; N=5), *R. helvetica* (4,2%; N=3), *R. massiliae* (19,7%; N=14), *R. monacensis* (33,8%; N=24), *R. raoulti* (9,9%; N=7), *R. rioja* (1,4%; N=1) e *R. slovacica* (2,8%; N=2). A presença de *Rickettsia* spp. foi detetada em 91,5 % dos *pools* positivos (Quadro 4 e Quadro 5).

Da análise dos dados referentes a 2013, destaca-se a detecção de cinco espécies de bactérias associadas a doença no Homem. Este é o caso de *B. lusitaniae*, *B. garinii* e *B. afzelii*, agentes implicados

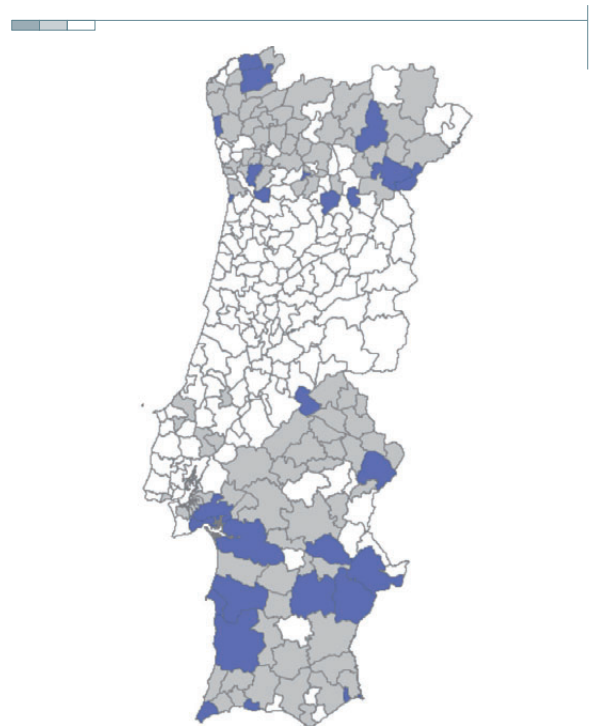


Figura 30 – Concelhos com identificação de agentes infecciosos

42. de Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato C, Torgal J, Walker D, Bacellar F. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. Emerg Infect Dis. 2006 Jul;12(7):1103-8.

na borreliose de Lyme, de *R. slovaca* agente responsável por TIBOLA e de *R. conorii*, agente etiológico da febre escaro nodular. Salienta-se ainda que 50% dos ixodídeos infetados com estes agentes foram removidos de humanos mas que apenas um dos utentes veio a desenvolver doença, pelo que nas restantes situações a remoção atempada das carraças terá evitado a transmissão. Estes dados comprovam a importância que o programa REVIVE-Ixodídeos pode ter na prevenção da ocorrência de doenças associadas a carraças e sublinham a importância de desenvolver o programa com o envolvimento de hospitais e centros de saúde.

Relativamente às borrélias, as três genoespécies detetadas estão associadas à borreliose de Lyme e são consideradas patogénicas para o Homem.

De referir a deteção de *R. conorii* em carraças removidas de cães, o que reforça a importância da monitorização das carraças destes animais que, no ambiente doméstico, funcionam em simultâneo como sentinelas e como factor de risco para a transmissão de agentes patogénicos para o Homem (Quadro 5). A análise da distribuição geográfica dos agentes etiológicos detetados permite ainda a identificação de áreas de risco, o que permitirá às autoridades competentes o estabelecimento atempado de medidas que permitam a prevenção, controlo e mitigação do impacto dos agentes transmitidos por carraças em Saúde Pública.

Na pesquisa molecular apenas duas das três rickettsias associadas a ixodídeos, que causam doença no Homem e ocorrem no país, foram identificadas. Efectivamente, *R. sibirica* estirpe *mongolotimanae*, agente responsável pela LAR,

não foi identificada em nenhuma das carraças estudadas. Este facto não é surpreendente pois esta rickettsia está associada a *R. pusillus*, uma carraça pouco abundante no resultado das colheitas REVIVE em 2013.

De referir a primeira deteção em território português de *R. rioja*. Este agente foi identificado num pool de *D. marginatus*, colhido em cabra, no concelho de Penedono. Esta *Rickettsia*, filogeneticamente muito próxima de *R. raoulti*, é transmitida pelo mesmo vetor- *D. marginatus* e está descrita na zona da Rioja, norte de Espanha, tendo sido associada a casos de infeção humana - TIBOLA.

Em 2013 foi ainda possível assinalar uma co-infeção de *B. lusitaniae* e *R. helvetica* num exemplar de *I. ricinus* capturado num utente de Alcácer do Sal. Este achado é importante pois existe a possibilidade de a carraça transmitir as duas bactérias em simultâneo ao Homem e o quadro clínico ser mais complicado, o que dificulta o diagnóstico e altera o esquema de tratamento a aplicar.

De realçar que a maioria das carraças removidas de humanos, positivas por PCR, estavam infetadas por espécies de rickettsias que ainda não foram associadas a casos humanos em Portugal, apesar de já terem sido associadas a casos pontuais de infeção humana noutros países europeus. Este facto reforça a importância da monitorização dos casos de parasitismo ao nível dos centros de saúde e hospitais que procederam à remoção dos artrópodes, com a aplicação de questionários para investigar eventual alteração do estado de saúde no mês imediato à colheita da carraça e eventualmente pedido de confirmação da suspeita clínica através da confirmação laboratorial.

Quadro 4: Número de *pools* positivos detetados por espécie de ixodídeo e grupo de agente infeccioso

Agentes infecciosos	<i>D. marginatus</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>I. ricinus</i>	<i>R. sanguineus</i>	Total
Borrelia					
<i>B. afzelii</i>	-	-	1	-	1
<i>B. garinii</i>	-	-	2	-	2
<i>B. lusitanae</i>	-	-	3	-	3
Rickettsia					
<i>R. aeschlimanii</i>	-	9	-	-	9
<i>R. conorii</i>	-	-	-	5	5
<i>R. helvetica</i>	-	-	3	-	3
<i>R. massiliae</i>	-	-	-	14	14
<i>R. monacensis</i>	-	-	24	-	24
<i>R. raoulti</i>	6	1	-	-	7
<i>R. rioja</i>	1	-	-	-	1
<i>R. slovacica</i>	2	-	-	-	2
Total	9	10	33	19	71

Quadro 5: Agentes infecciosos detetados por concelho, espécie de ixodídeo e hospedeiro/vegetação

Concelhos/Ixodídeos infetados	Hospedeiro/Vegetação	Agente (nº <i>pools</i>)	Observações
Alcácer do Sal			
<i>H. marginatum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. aeschlimanii</i> (3)	
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>B. lusitanae/R. helvetica</i> (1) <i>R. helvetica</i> (1) <i>R. monacensis</i> (1)	agente BL; co-infeção
Arcos de Valdevez			
<i>R. sanguineus</i>	Vegetação	<i>R. massiliae</i> (1)	
Beja			
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. monacensis</i> (1)	
<i>R. sanguineus</i>	Vegetação	<i>R. massiliae</i> (1)	
Castelo de Paiva			
<i>R. sanguineus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>R. massiliae</i> (1)	
Elvas			
<i>H. marginatum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. aeschlimanii</i> (1)	
Espinho			
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. monacensis</i> (1)	
Esposende			
<i>R. sanguineus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. massiliae</i> (1)	
Freixo de Espada à Cinta			
<i>R. sanguineus</i>	Vegetação	<i>R. conorii</i> (1)	agente da FEN
Gavião			
<i>R. sanguineus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. massiliae</i> (1)	
Lagoa			
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. monacensis</i> (1)	
Macedo Cavaleiros			
<i>D. marginatus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. slovacica</i> (1)	agente do TIBOLA
<i>R. sanguineus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>R. conorii</i> (1) <i>R. massiliae</i> (1)	agente da FEN
Mesão Frio			
<i>D. marginatus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. raoulti</i> (1)	
Mirandela			
<i>D. marginatus</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>R. raoulti</i> (1)	

→ continua



Concelhos/Ixodídeos infetados	Hospedeiro/Vegetação	Agente (nº pools)	Observações
Moimenta da Beira			
<i>H. marginatum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. aeschlimanii</i> (1)	
Monção			
<i>D. marginatus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>R. raoulti</i> (2)	
Moura			
<i>R. sanguineus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. massiliae</i> (1)	
Odemira			
<i>H. marginatum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. aeschlimanii</i> (1)	
	Vegetação	<i>R. aeschlimanii</i> (1)	
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>B. garinii</i> (2)	
		<i>R. helvetica</i> (1)	
		<i>R. monacensis</i> (3)	
<i>R. sanguineus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. conorii</i> (1)	agente da FEN
	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. massiliae</i> (1)	
Palmela			
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. monacensis</i> (1)	
Paredes			
<i>R. sanguineus</i>	Vegetação	<i>R. massiliae</i> (1)	
Penedono			
<i>D. marginatus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. raoulti</i> (1)	
	Vegetação	<i>R. rioja</i> (1)	primeira identificação no país
Portel			
<i>R. sanguineus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>R. conorii</i> (1)	agente da FEN
Santiago do Cacém			
<i>D. marginatus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. raoulti</i> (1)	
<i>H. marginatum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. raoulti</i> (1)	
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>B. azfelii</i> (1)	agente BL
		<i>R. helvetica</i> (1)	
		<i>R. monacensis</i> (11)	
<i>R. sanguineus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. massiliae</i> (1)	
	Vegetação	<i>R. massiliae</i> (1)	
Serpa			
<i>H. marginatum</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>R. aeschlimanii</i> (1)	
Setúbal			
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>B. lusitanae</i> (1)	
		<i>R. monacensis</i> (3)	
Sines			
<i>H. marginatum</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. aeschlimanii</i> (1)	
<i>I. ricinus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>B. lusitanae</i> (1)	agente da BL
		<i>R. monacensis</i> (2)	
Torre de Moncorvo			
<i>D. marginatus</i>	Vegetação	<i>R. slovacica</i> (1)	agente TIBOLA
Vila do Bispo			
<i>R. sanguineus</i>	Vegetação	<i>R. massiliae</i> (2)	
Vila Flor			
<i>R. sanguineus</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>R. conorii</i> (1)	agente da FEN
Vila Real de Santo António			
<i>R. sanguineus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>R. massiliae</i> (1)	

BL- Borreliose de Lyme; FEN- Febre escaro nodular; TIBOLA - *Tick-borne lymphadenopathy*



4. Conclusões

Entre Janeiro-Dezembro de 2013 realizaram-se, em 126 concelhos de Portugal continental, 1103 colheitas de ixodídeos.

No laboratório foram identificados 8015 ixodídeos, pertencentes a 12 espécies, autóctones, cuja presença em Portugal está documentada há várias décadas. O conhecimento da caracterização, distribuição geográfica, abundância relativa e períodos de atividade de cada espécie está cada vez mais aprofundado, assim como a identificação dos principais factores ecológicos que condicionam a presença/ausência de determinada espécie num dado local ou época do ano.

O reforço das capturas realizadas em humanos, cujo sucesso se deve à colaboração dos profissionais de saúde dos centros de saúde e hospitais, foi relevante para a constatação que o contacto do Homem com os ixodídeos é mais frequente do que habitualmente referido em estudos realizados no nosso País. Este facto também está de acordo com as referências bibliográficas que mencionam o aumento da incidência das doenças transmitidas por carraças, não só em Portugal, como em toda a Europa.

Na pesquisa de rickettsias e borrelias foram identificados agentes patogénicos para o Homem: *R. conorii*, *R. slovaca*, *B. afzelii*, *B. lusitaniae* e *B. garinii*. O estudo dos exemplares colhidos em humanos permitiu a identificação precoce de um utente infetado com um agente etiológico transmitido por carraças e a detecção de uma carraça co-infetada com dois agentes diferentes, o que comprova a possibilidade de ocorrência de transmissão si-

multânea de vários agentes, o que pode ter consequências graves para o prognóstico da doença.

O ano de 2013 foi o 3.º ano de aplicação do programa REVIVE-Ixodídeos. Nestes três anos o número de concelhos onde têm sido feitas colheitas no âmbito do REVIVE aumentou de 55 para 126, ou seja duplicou, o que demonstra o empenho que as ARS's têm colocado neste programa.

Desde o início que o programa REVIVE-Ixodídeos tem contribuído para o conhecimento ecoepidemiológico de espécies de vetores presentes nas regiões, a sua distribuição e abundância, assim como o esclarecimento do seu papel como vetor de agentes de doença para o Homem.

Paralelamente, tem sido fundamental na identificação dos agentes patogénicos em circulação, sinalizando precocemente a existência de possíveis focos de infeção. A implementação atempada de medidas de prevenção e controlo é um dos principais factores que pode impedir a ocorrência de surtos de doença, por vezes com elevada casuística, e que podem constituir um risco em termos de saúde pública. Para além dos agentes infecciosos já associados a casos clínicos em Portugal, sublinha-se ainda a detecção de outros agentes que, apesar de nunca terem sido isolados de amostras humanas no nosso País, já foram assinalados como patogénicos em outros países europeus. Este resultado deve alertar os clínicos para o facto de existirem várias doenças transmitidas por carraças, com sintomatologia muito diferente da associada à FEN e à borreliose de Lyme, pelo que em caso de suspeita de picada por carraça associada a sintomatologia, devem solicitar o diagnóstico laboratorial.



A prioridade do REVIVE-Ixodídeos é assegurar a vigilância epidemiológica e contribuir para a prevenção das doenças transmitidas por carraças. Os resultados deste projecto permitem informar e alertar as autoridades de saúde para a implementação atempada de medidas adequadas para o controlo de populações de vetores, com o objetivo de mitigar o seu impacto em saúde pública, privilegiando a prevenção em detrimento da resposta à emergência.

4

Considerações finais



O projeto REVIVE, resulta da cooperação interinstitucional e tem contribuído para um conhecimento sistemático da fauna de culicídeos e de ixodídeos de Portugal, e do seu potencial papel de vetor, constituindo uma componente dos programas de vigilância epidemiológica indispensável à avaliação do risco de transmissão de doenças potencialmente graves.

Em 2013 participaram no “REVIVE – Culicídeos” as cinco Administrações Regionais de Saúde, e o Instituto da Administração da Saúde e dos Assuntos Sociais da Madeira, entidades que realizaram colheitas de mosquitos em 128 concelhos de Portugal. Com a exceção da Madeira, onde uma espécie de mosquito invasor, *Aedes aegypti*, está presente pelo menos desde 2005, não foram identificadas espécies de mosquitos exóticas/invasoras no total de 39873 mosquitos. Nas amostras em que foi pesquisada a presença de flavivírus patogénicos para o Homem os resultados foram negativos. No âmbito do “REVIVE – Culicídeos foi feita a vigilância em dois aeroportos internacionais e oito portos de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional.

Em 2013, participaram no “REVIVE – Ixodídeos” quatro Administrações Regionais de Saúde, nomeadamente Alentejo, Algarve, LVT e Norte que realizaram colheitas de carraças em 126 concelhos. Em 8015 carraças foram unicamente identificadas espécies de carraças descritas anteriormente nas regiões. Em 951 ixodídeos foi pesquisada a presença de borrelíias e rickettsias tendo sido observada a prevalência de 0,7% e 6,9%, respetivamente, sobretudo em amostras recolhidas quando parasitavam seres humanos.

O projecto REVIVE, como programa de vigilância de sucesso que já representa, tem sido o resultado do esforço de vastas equipas de trabalho que integram delegados de saúde regionais, técnicos de saúde ambiental e outros, nas Administrações Regionais de Saúde e entomologistas, microbiólogos, e outros técnicos de saúde no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge sem os quais o REVIVE não existiria.

5

Equipas REVIVE no campo e no laboratório



ARS ALENTEJO

Ana Mafalda Franco
Ana Paulino
Andreia Simões
Carlos Estevinha
Cláudia Oliveira
Cristina Dias
Cristina Marques
Daniela Duarte
Diogo Sousa Gomes
Fernando Carvalho
Hortênciã Costa
Humberto Ramos
Inês Lopes
Isabel Cansado
J. Velhinho
Jacinto Martins Guerreiro
João Carrasquinho
Leonel Bucu
Liliana Marques
Luciana Henriques
Luís Ribeiro
Manuel Bucu
Márcia Marques
Márcia Monteiro
Maria João Santos
Maria Miguel Valente
Miguel Valente
Mónica Bettencourt
Natalina Nunes
Paula Abreu
Pedro Bento
Rui Silva
Rute Silva
Sara Pinheiro
Vera Ferreira

ARS ALGARVE

Carlos Lopes
Carmelo Colmenares

Carmen
Eduardo Gonçalves
Hélia Monteiro
José Pereira
Luísa Reis
Maria da Graça Fernandes
Maria Eduarda Gonçalves
Maria João Falcão
Maria José Fontes
Rosário Jorge
Sandra Fáisca
Sara Campos
Sara Santos
Sofia Duarte
Sofia Nunes
Victor Vaz

ARS CENTRO

Eduardo Almeida
Fátima Alho
Maria Fernandes
José Cerdeira
Sónia
Susana Conde

ARS LVT

Álvaro Antas
Ana Micaela
Ana Olivera
Ana Teresa
Anabela Santos
Carlos Lourenço
Carlos Pinto
Carmo Pereira
Cátia Rodrigues
Célia Gomes
Cláudia Purificação
Cláudia Raminhos
Conceição
Cristina Nunes

Daia Monteiro
Daniel Carvalho
Elsa Curado
Helena Correia
Henrique Coelho
Hermes Santos
Isabel Correia
José Manuel Fonseca Peixoto
José Pedro Teixeira
Lígia Alves
Liliana Cristovão
Lúcia Lacerda
Lúcia Pereira
Madalena Correia
Margarida Narciso
Maria Almeida
Maria Antunes
Maria Neves
Marília M.
Marina Antunes
Marta Franco
Nélia Rosa
Paula Bastos
Regina Dias
Rosa Bernardo
Sandra Jorge
Sérgio Lourenço
Sérgio Santos
Sílvia Duarte
Sónia Caeiro Reis
Sónia Guerreiro
Susana Santos
Teresa Meireles
Teresa Nunes
Teresa Pereira
Teresa Rica
Vanda Brito
Vanessa Freitas
Vitor Gomes



ARS NORTE

A. J. Pereira
Altina Pinto
Amâncio Ferreira
Ana Rita Cruz
Ana Sofia Ribeiro
Anabela Fernandes
Andreia Silva
António Alfonseca
António Borges
António Marinho
António Pereira
Ariana Cunha
Bruno Reigada
Carina Andrade
Carla Quintas
Carlos Gonçalves
Carlos Quintas
Catarina Fernandes
Cédric Samorinha
Cidália Sousa
Cláudia Fernandes
Conceição Almeida
Cristina Acabado
Cristina Campeão
Cristina Veiga
Elisa Vicente
Fátima Sousa
Fernanda Vieira
Frederico Freitas
Helena Garcia
Henrique Sebastião
Isabel Miranda
Jesus Fernandes
Joana Correia
João Monteiro
João Paulo Monteiro
Laurentino Pires
Leonel Fernandes
Lucília Reis

Luís Aleixo
Manuel António
Manuel Cerqueira
Manuel Oliveira
Manuela Amorim
Manuela Pinto
Mara Verne
Maria de Fátima Sousa
Maria João
Marinela Cristo
Michelle Sintra
Miguel Cerqueira
Miguel Maia
Nuno Diz
Paula Pereira
Paula Rodrigues
Paulina Rebelo
Piotr Majar
Rui Clemêncio
Rui Figueiredo
Sandra Oliveira
Sandra Pintor
Sandra Santos
Sílvia Silva
Solange Coelho
Susana Gomes

IA SAUDE MADEIRA

Adélia
Bela
Cláudia Sá
Conceição Aguiar
Conceição Reis
Custódio
Daniel
Esmeralda
Fátima
Filipe
Graça Conceição
Helena

Irene Viveiros
Lúcia Freitas
Magda
Margarida
Mira
Paula
Rita
Rute Soares
São Aguiar
São Norte
Sónia

CEVDI/INSA

Ana Borda d'Água
Ana Sofia Santos
Conceição Paliotes
Fátima Amaro
Hugo Osório
Isabel Lopes de Carvalho
Líbia Zé-Zé
Lígia Chainho
Maria Margarida Santos-Silva
Maria Sofia Nuncio
Natacha Milhano
Paulo Parreira
Rita de Sousa
Teresa Luz
Maria João Alves (coordenação)



GOVERNO DE
PORTUGAL

MINISTÉRIO DA SAÚDE



Instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge

_Departamento de **Doenças Infeciosas**

Instituto Nacional de Saúde *Doutor Ricardo Jorge*

Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 526 400

E-mail: ddi@insa.min-saude.pt

Centro de Saúde Pública *Doutor Gonçalves Ferreira*

Rua Alexandre Herculano, n.321 4000-055 Porto, Portugal

Tel.: (+351) 223 401 190

Fax: (+351) 223 401 109

E-mail: inforporto@insa.min-saude.pt

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas

Doutor Francisco Cambournac

Av. da Liberdade, n.5 2965-575 Águas de Moura, Portugal

Tel.: (+351) 265 938 290

Fax: (+351) 265 912 155

E-mail: cevdi@insa.min-saude.pt