

Primeira deteção de DNA de *Borrelia burgdorferi sensu lato* em javalis

First detection of Borrelia burgdorferi sensu lato DNA in wild boars

Ana Sofia Faria

Departamento de Ciências Veterinárias, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD); Laboratório de Ecologia, Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB), UTAD, Vila Real, Portugal
asofia.andrade@gmail.com

Maria das Neves Paiva-Cardoso

Departamento de Ciências Veterinárias, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD); Laboratório de Ecologia, Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB), UTAD, Portugal

Mónica Nunes

Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) Universidade NOVA de Lisboa (UNL), Lisboa, Portugal

Teresa Carreira

Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) Universidade NOVA de Lisboa (UNL), Lisboa, Portugal

Hélia Marisa Vale-Gonçalves

Departamento de Ciências Veterinárias, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD); Laboratório de Ecologia, Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB), UTAD, Vila Real, Portugal

Octávia Veloso

Departamento de Ciências, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias; Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal

Catarina Coelho

Escola Superior Agrária de Viseu (ESAV), Instituto Politécnico de Viseu (IPV), Viseu, Portugal, Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV), UTAD, Vila Real, Portugal, Laboratório de Inspeção Sanitária, UTAD, Vila Real, Portugal

João Alexandre Cabral

Laboratório de Ecologia, Centro de Investigação e de Tecnologias Agro-Ambientais e Biológicas (CITAB), UTAD, Vila Real, Portugal

Madalena Vieira-Pinto

Departamento de Ciências Veterinárias, Escola das Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD); Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV); Laboratório de Inspeção Sanitária, UTAD, Vila Real, Portugal

Maria Luísa Vieira

Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, Unidade de Microbiologia Médica, Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) Universidade NOVA de Lisboa (UNL), Lisboa, Portugal

Resumo

A borreliose de Lyme (BL) é a zoonose associada a carraças mais comum no hemisfério norte, mas em Portugal, apesar de doença de declaração obrigatória, continua sub-diagnosticada e sub-reportada.

Esta doença emergente é causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato*, transmitidas pela mordedura de carraças infetadas do género *Ixodes*, em particular *I. ricinus*, o principal vetor na Europa.

Vários vertebrados são hospedeiros de carraças, entre os quais se inclui o javali, espécie cinegética de grande valor económico na região de Trás-os-Montes, e cujo papel no ciclo epidemiológico da BL permanece indeterminado.

Soros de 90 javalis abatidos na referida região (época venatória 2011/12) foram recolhidos e analisados por *nested*-PCR. DNA de *Borrelia* foi detetado pela primeira vez em três animais, tendo os resultados de sequenciação mostrado 100% de similaridade com *B. afzelii*, geralmente associada a pequenos mamíferos (roedores, etc.).

Estes resultados sugerem o javali como potencial reservatório desta espiroqueta, representando a sua circulação nesta região um risco de infeção para grupos ocupacionais relacionados com a caça (caçadores, gestores, etc.) e seus cães, devido ao contacto recorrente com animais e vegetação infestados por carraças.

Este trabalho enfatiza a necessidade de uma abordagem "One Health" quanto a estratégias de prevenção e controlo de doenças zoonóticas emergentes, nomeadamente a BL.

Palavras Chave:

Complexo *Borrelia burgdorferi*, *Sus scrofa*, Reação em Cadeia da Polimerase, Portugal, Doença de Lyme.

Abstract

Lyme borreliosis (LB) is the most common tick-borne zoonosis in northern hemisphere, but in Portugal, despite being a notifiable disease it remains under-diagnosed and reported.

This emerging disease is caused by *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex spirochetes, transmitted through the bite of infected *Ixodes* genus ticks, particularly *I. ricinus*, the main vector in Europe.

Several vertebrates serve as hosts for ticks, including large hunting species like wild boars, with great economic value for hunting and food sectors in the Trás-os-Montes region, whose role in the epidemiological cycle of LB remains undetermined.

Sera from 90 wild boars shot in the Trás-os-Montes region (hunting season 2011/12) were collected and tested by *nested*-PCR. *Borrelia* DNA was detected for the first time in three sera, and sequencing results showed 100% similarity with *B. afzelii*, usually associated with small mammals (rodents, etc.).

The results suggest that wild boars are a potential reservoir for this spirochete and its circulation in this region represents an infection risk for hunting-related occupational groups (hunters, gamekeepers, etc.) and hunting dogs, due to recurrent contact with tick-infested animals and vegetation.

This work emphasizes the growing need for a "One Health" approach when it comes to emerging zoonotic disease control and prevention strategies, namely in LB.

Key Words:

Borrelia burgdorferi complex, *Sus scrofa*, Polymerase Chain Reaction, Portugal, Lyme disease.

Introdução

Com mais de 360.000 casos reportados nas últimas duas décadas na Europa [1], a Doença de Lyme é a doença causada por agentes transmitidos por vetores mais comum no Hemisfério Norte [2, 3].

Também designada por Borreliose de Lyme (BL), esta zoonose é causada por bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), que são transmitidas através da mordedura de ixodídeos do género *Ixodes*, sendo a espécie *Ixodes ricinus* o principal vetor na Europa [4].

O complexo *B. burgdorferi* s.l. conta atualmente com 20 espécies distintas com ampla dispersão mundial [5, 6].

Durante a refeição de sangue que o vetor faz no hospedeiro, a bactéria migra para as glândulas salivares e é injetada na corrente sanguínea [7]. Dias a semanas depois da mordedura, surge no local um edema em forma de alvo, também designado como Eritema Migrante (EM), que é acompanhado de fadiga, febre, cefaleias, rigidez no pescoço, artralgias e mialgias, muitas vezes compatíveis com um quadro gripal [8]. Sem um diagnóstico e tratamento adequados, a doença pode evoluir e tornar-se crónica, podendo afetar as articulações, a pele, o sistema nervoso e o coração, entre outros órgãos e sistemas [8]. Em Portugal, o primeiro caso descrito de BL ocorreu em Évora e foi relatado por David de Moraes e colaboradores em 1989 [9], seguido pelo primeiro isolamento de *B. lusitaniae* a partir de carraças *I. ricinus* [10] e do isolamento da mesma espécie a partir de uma biópsia de pele de um paciente com suspeita de BL em Lisboa [11]. Apesar de ser de declaração obrigatória desde 1999 em território nacional, a doença encontra-se sub-reportada e sub-diagnosticada [12, 13], com uma incidência estimada de 0,04/100.000 habitantes [14], dados da década anterior e que se têm mantido, dado o referido défice de notificação.

Muitos vertebrados de pequeno e médio porte têm um papel essencial na transmissão dos agentes da BL enquanto hospedeiros reservatórios, em particular pequenos roedores, ratazanas, esquilos, ouriços-cacheiros, lebres e aves passeriformes [7], mas muito pouco se sabe sobre o papel dos mamíferos de maior porte no ciclo epidemiológico destas bactérias, para além de serem importantes fontes de alimento para o vetor (carraça) [3, 15].

O javali (*Sus scrofa*, Linnaeus, 1758) é um mamífero omnívoro de porte médio e com vasta distribuição geográfica pela Europa, Norte de África e Ásia [16, 17]. Em Portugal, sendo considerada uma espécie "Pouco Preocupante" ("Least Concern", LC) de acordo com o Livro Vermelho de Vertebrados de Portugal [18], a sua presença ocorre em todo o país, com um número crescente de animais e de área de ocupação [19]. Este ungulado é uma espécie cinegética de caça maior com importante valor económico em Portugal, em particular nas regiões do interior como é o caso de Trás-os-Montes, quer pela prática da caça quer pelo preço da sua carne, muito apreciada pela sua qualidade [17]. Por ter uma enorme plasticida-

de e se adaptar facilmente a novos habitats em busca de maior disponibilidade de alimento, entra muitas vezes em contacto com animais domésticos e com os humanos, tornando-se uma potencial fonte de infeções de carácter zoonótico [20].

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a relevância do javali como hospedeiro reservatório no ciclo epidemiológico da Borreliose de Lyme. Esta hipótese foi testada através da análise da presença de DNA de *B. burgdorferi* s.l. no soro de javalis. Os resultados deste estudo destinam-se a: *i)* contribuir para a compreensão do papel epidemiológico do javali no ciclo de infeção da LB e *ii)* estabelecer uma associação entre os resultados e as preocupações de saúde pública, em particular para grupos profissionais ligados às atividades cinegéticas.

Materiais e métodos

Foi realizada uma amostragem de conveniência em javalis abatidos em montarias realizadas durante a época venatória de 2011/12 nos distritos de Bragança e Vila Real, onde foram recolhidas 90 amostras de sangue e informação complementar sobre cada animal amostrado (sexo, idade e distrito de proveniência) [21].

As amostras foram centrifugadas para extração de soro, posteriormente analisadas por *nested*-PCR, usando o gene da flagelina (*fla*) de *B. burgdorferi* s.l. como alvo molecular para os *primers* usados, devido à sua elevada especificidade face a outros *primers* comumente utilizados [21]. Os produtos da PCR foram sujeitos a eletroforese e sequenciados na StabVida (Lisboa, Portugal). As sequências resultantes foram submetidas ao GenBank (número de acesso KJ810661) e com a ajuda do BLASTN versão 2.2.29+ [22] foram comparadas com estirpes de referência para *B. burgdorferi* s.l. [21] para identificação da(s) genoespécie(s).

Resultados e discussão

A amostra populacional é representada por 61 fêmeas e 29 machos, sendo que 36 eram animais adultos, 30 subadultos e 24 juvenis.

A análise molecular demonstrou a presença de DNA borreliano em três das amostras analisadas (3⁺/90; 3,3%). As amostras positivas pertenciam a animais abatidos no distrito de Vila Real, em particular Montalegre (J26) e Alijó (J30 e J31). As amostras J26 e J31 originaram sequências 100% compatíveis com *B. afzelii* estirpe LO-3.9 (ex.: GenBank KF990318), enquanto os resultados de sequenciação de J30 foram inconclusivos devido à diminuta qualidade da sequência obtida [21]. Esta foi a primeira vez que DNA de *B. burgdorferi* s.l. foi detetado em soro de javali, um marco importante dada a suspeita pré-existente de que o javali é um potencial hospedeiro reservatório para estas espiroquetas [23-25].

A identificação de *B. afzelii* como a espécie circulante no san-

gue destes animais é um achado interessante, por se tratar de uma espécie que tem como hospedeiros preferenciais pequenos mamíferos roedores [7, 26, 27]. *B. afzelii* já havia sido detetada em Portugal, em carraças à procura de hospedeiro em Mafra [28, 29] e na ilha da Madeira [30, 31]. Adicionalmente, foi já detetada a presença simultânea de DNA de *B. afzelii* e de javali em carraças [23, 24, 32], assim como de anticorpos contra *B. burgdorferi* s.l. em javalis em países como a França [33], Bulgária [34] e República Checa [35-37].

Quanto à circulação de outras espécies de *B. burgdorferi* s.l. no país, já havia sido detetada a presença de *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. garinii* e *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) em carraças das espécies *I. ricinus* e *Hyalomma marginatum* [38], *B. valaisiana*, *B. garinii*, e *B. burgdorferi* s.s em carraças *I. ricinus* na ilha da Madeira [14, 30] e *B. lusitaniae* nas espécies *I. ricinus*, *Dermacentor marginatus* e *Hyalomma lusitanicum* capturadas num Parque de Safari no Alentejo [39]. Mais recentemente foi detetada a presença de *B. myamotoi* em carraças *I. ricinus* em Mafra [40], bem como a presença de *B. burgdorferi* s.l. em espécimes *I. ricinus* nos distritos de Vila Real, Lisboa, Setúbal, e Faro, das quais cerca de 50% correspondiam à genoespécie *B. lusitaniae* [40].

Conclusões

Todos estes dados apontam para a circulação de várias espécies patogénicas de *Borrelia* no país, em particular *B. afzelii* e *B. lusitaniae*, e para a probabilidade crescente de o javali ter um papel relevante no ciclo da transmissão de *B. afzelii*, sendo para isso importante realizar estudos serológicos por forma a determinar a existência de anticorpos anti-*Borrelia* nestes animais, que mesmo que não venham a ser confirmados reservatórios, continuam a constituir uma importante fonte de alimento para o vetor da BL e elo de transmissão via *co-feeding* entre carraças infetadas e não infetadas [4].

O contacto frequente do javali com animais domésticos e com os humanos favorece também o contacto com carraças

potencialmente infetadas. Esta interação é particularmente preocupante durante a prática da caça, uma vez que as carraças se podem libertar do corpo do javali morto a meio da refeição sanguínea e procurar o hospedeiro mais próximo, que nesta situação em particular é geralmente o próprio caçador ou mesmo o cão de caça, aumentando exponencialmente a probabilidade de transmissão da bactéria. Sendo reservatórios competentes para *B. burgdorferi* s.l. [41], os cães podem ser a ligação entre a transmissão das espiroquetas dos animais selvagens aos domésticos, expondo o próprio caçador e família a carraças infetadas.

É fulcral a implementação de medidas de alerta e vigilância e epidemiológica para a BL, bem como a sensibilização da comunidade médica, tanto humana como veterinária, por forma a implementar estratégias de prevenção e controlo da doença, eficientes e assentes nos pilares do conceito "One Health".

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Francisco Morinha pela assistência técnica na análise molecular. Gostaríamos também de agradecer a Eduardo Sousa, Bruno Vinhas, e às associações e gestores de caça por toda a sua colaboração e apoio ao trabalho de campo realizado durante a caça ao javali na época venatória de 2011/12 em Trás-os-Montes. Este estudo foi apoiado por financiamento de vários projetos de monitorização ecológica do Laboratório de Ecologia Aplicada (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, UTAD) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através do projeto PEst-OE/AGR/UII4033/2014.

Conflitos de Interesses

Os autores declaram que não existe nenhum conflito de interesses.

Bibliografia

1. WHO Regional Office for Europe/ECDC World Health Day 2014 Fact sheets - Vector-borne diseases (2014). Lyme borreliosis in Europe. Consultado em 10 de setembro de 2015. In: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/world-health-day-2014/Documents/factsheet-lyme-borreliosis.pdf>
2. Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc HG, Neteler M, Rosa R (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 16(27): pii= 19906.
3. EUCALB (2015). European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB). Consultado em 10 de Setembro de 2015. In: http://meduni09.edis.at/eucalb/cms_15/index.php
4. Gern L (2009). Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Curr Probl Dermatol* 37:18-30.
5. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* 2(3): 123-128.
6. Ivanova LB, Tomova A, González-Acuña D, Murúa R, Moreno CX, Hernández C, Cabello J, Cabello C, Daniels TJ, Godfrey HP, Cabello FC (2014). *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ Microbiol* 16(4): 1069-1080.
7. Humair PF, Gern L (2000). The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect*, 2(8): 915-922.
8. Stanek G; Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch

- W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J (2011). Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 17(1): 69-79.
9. David de Moraes JA, Filipe AR, Nuncio MS (1989). Doença de Lyme em Portugal: caso clínico. *Rev Port Doenças Infec* 12: 261-274.
10. Nuncio M, Péter O, Alves M, Bacellar F, Filipe A (1993). Isolamento e caracterização de borrelíias de *Ixodes ricinus* em Portugal. *Rev Port Doenças Infec* 16:175-179.
11. Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Gonçalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C (2004). First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 42(3): 1316-1318.
12. Couceiro S, Baptista S, Franca I, Gonçalves L, Vieira ML, & Collares-Pereira, M (2003). Cultura vs PCR: que apoio ao diagnóstico de Borreliose de Lyme? *Acta Reumatol Port* 28(2): 77-82.
13. Lopes de Carvalho I, Nuncio MS (2006). Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis at the Portuguese National Institute of Health (1990-2004). *Euro Surveill* 11(10): 257-60.
14. Lopes de Carvalho I, Milhano N, Santos AS, Almeida V, Barros SC, de Sousa R, Nuncio MS (2008). Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 8(4): 575-579.
15. Gern L, Estrada-Peña A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TGT, Jongejan F, Kahl

- O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA (1998). European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl Bakteriol* 287: 196-204.
16. Santos P, Fernández-Llario P, Fonseca C, Monzón A, Bento P, Soares AMVM, Mateos-Quesada P, Petrucci-Fonseca F (2006). Habitat and reproductive phenology of wild boar (*Sus scrofa*) in the western Iberian Peninsula. *Eur J Wildl Res* 52: 207-212.
17. Calado M. (2009). *Biologia e parasitoses do javali (Sus Scrofa) e repovoamento de coelho-bravo (Oryctolagus cuniculus)*. Relatório Final de Estágio de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade do Porto, Portugal.
18. Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Delliger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim JM, Queirós AI, Rogado L, Santos-Reis M (2005). Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa, Portugal.
19. Fonseca C, Alves da Silva A, Alves J, Vingada J, Soares AMVM (2011). Reproductive performance of wild boar females in Portugal. *Eur J Wildl Res* 57: 363-371.
20. Gortazar C, Diez-Delgado I, Barasona JA, Vicente J, De La Fuente J, Boadella M (2015). The wild side of disease control at the wildlife-livestock-human interface: a review. *Front Vet Sci* 1: 27.
21. Faria AS, Paiva-Cardoso MdN, Nunes M, Carreira T, Vale-Gonçalves HM, Velloso O, Coelho C, Cabral JA, Vieira-Pinto M, Vieira ML (2015). First detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in serum of the wild boar (*Sus scrofa*) in Northern Portugal by nested-PCR. *EcoHealth* 12(1): 183-187.
22. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2008). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421.
23. Estrada-Peña A, Osácar JJ, Pichon B, Gray JS (2005). Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Exp Appl Acarol* 37: 257-268.
24. Morán Cadenas F, Rais O, Humair P-F, Douet V, Moret J, Gern L (2007). Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J Med Entomol* 44: 1109-1117.
25. Juricová Z, Hubálek Z (2009). Serologic survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 479-482.
26. Humair PF, Rais O, Gern L, (1999). Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* 118(Pt 1): 33-42.
27. Hanincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K (2003). Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 126(Pt 1): 11-20.
28. Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, Etti S, Schäfer SM, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincová K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M (2001). Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol* 67(10): 4926-4929.
29. Baptista S, Quaresma A, Aires T, Kurtenbach K, Santos-Reis M, Nicholson M, Collares-Pereira M (2004). Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol* 293(Suppl 37): 109-116.
30. Matuschka, FR, Klug, B, Schinkel, TW, Spielman, A, Richter D (1998). Diversity of European spirochetes at the southern margin of their range. *Appl Environ Microbiol* 64: 1980-1982.
31. Nuncio MS, Schouls LM, van de Pool I, Almeida V, Filipe AR (2002). Ecoepidemiology of *Borrelia* spp. on Madeira Island, Portugal *Int J Med Microbiol* 291(Suppl. 33): 212.
32. Wodecka B, Rymaszewska A, Skotarczak B (2014). Host and pathogen DNA identification in blood meals of nymphal *Ixodes ricinus* ticks from forest parks and rural forests of Poland. *Exp Appl Acarol* 62: 543-555.
33. Doby J, Rolland C, Barrat J (1991). The large forest mammals reservoirs for *Borrelia burgdorferi* agent of the lyme disease? Serological examination of 543 deers and wild boars. *Rec Med Vet* 167: 55-61.
34. Angelov L, Arnaudov D, Rakadjieva TT, Lichev D, Kostova E (1995). Lyme borreliosis in Bulgaria (epidemiologic and epizootologic review). In: Report of WHO Workshop on Lyme Borreliosis Diagnosis and Surveillance. Warsaw, Poland (June 20-22).
35. Juricova Z, Halouzka J, Forejtek P, Hubalek Z (1996). Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in hares, wild boars and pheasants in the Czech Republic. *Biologia* 51: 331-333.
36. Juricova Z, Halouzka J, Hubalek Z (2000). Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in game animals in south Moravia, Czech Republic. *Vet Med (Czech)* 45: 145-148.
37. Juricová Z, Hubálek Z (2009). Serologic survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 479-482.
38. De Michelis S, Sewell HS, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Schouls LM, Benes V, Holmes EC, Kurtenbach K (2000). Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol* 38(6): 2128-2133.
39. Milhano N, de Carvalho IL, Alves AS, Arroubé S, Soares J, Rodriguez P, Carolino M, Nuncio MS, Piesman J, de Sousa R (2010). Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitanae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks Tick-Borne Dis* 1(4): 172-177.
40. Nunes M, Parreira R, Lopes N, Maia C, Carreira T, Sousa C, Faria S, Campino L, Vieira ML (2015). Molecular identification of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* from Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis* 15(8): 515-517.
41. Mather TN, Fish D, Coughlin RT (1994). Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J Am Vet Med Assoc* 205(2): 186-188.