



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JOSÉ LUÍS MENEZES VARJÃO

**EPIDEMIOLOGIA DE *Anaplasma platys* EM CÃES HÍGIDOS
NO MUNICÍPIO DE PORTO SEGURO, BAHIA**

**ILHÉUS, BAHIA
27/02/2023**

JOSÉ LUÍS MENEZES VARJÃO

**EPIDEMIOLOGIA DE *Anaplasma platys* EM CÃES HÍGIDOS
NO MUNICÍPIO DE PORTO SEGURO, BAHIA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de pesquisa: Clínica, Sanidade Animal e Biodiversidade

Sub-área da dissertação: Doenças Parasitárias dos Animais

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Dias Munhoz

**ILHÉUS, BAHIA
27/02/2023**

JOSÉ LUÍS MENEZES VARJÃO

**EPIDEMIOLOGIA DE *Anaplasma platys* EM CÃES HÍGIDOS NO MUNICÍPIO DE
PORTO SEGURO, BAHIA**

Data: Ilhéus – Bahia, 27/02/2023

**Alexandre Dias Munhoz – DSc
UESC/DCAA
(Orientador)**

**Renata Santiago Alberto Carlos – DSc
UESC/DCAA**

**Marcos Rogério André – DSc
Unesp-Jaboticabal/DPA**

**ILHÉUS, BAHIA
27/02/2023**

Dedico este trabalho a Deus por todo o amparo concedido, conferindo pessoas extraordinárias e forças para chegar até o fim desta etapa importante em minha vida em todos os âmbitos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a ti, Deus, por inúmeras vezes ter concedido sua graça, permitindo chegar a este momento marcante em minha vida. Sou profundamente grato ao Senhor por colocar pessoas incríveis em meu caminho.

À minha esposa, amiga, companheira e conselheira que participou ativamente desta jornada intensa e cheia de emoções. Também gostaria de agradecer ao meu filhinho lindo, cheio de vida e risadas, o qual é minha força motriz especial.

À minha querida mãe por abraçar minhas lutas, mesmo nas situações mais desafiadoras da vida. Mãe, você é um verdadeiro exemplo de força de vontade e determinação. Agradeço também ao meu Pai por todo seu cuidado, carinho e apoio incansável. Por fim, agradeço a todos os meus familiares, os quais são uma base sólida em minha vida.

Aos meus queridos amigos de São Paulo, que tornaram minha vida muito mais significativa. Também agradeço aos amigos em Ilhéus, que me receberam com tanto calor e com quem tenho amizades sinceras e duradouras.

Agradeço imensamente ao meu amigo, André (*In memoriam*), por ser o primeiro a conversar comigo sobre Medicina Veterinária. Foram anos de diálogos, amizade e companheirismo. Um amigo que levo em meu coração.

Agradeço profundamente ao meu Orientador, que inspira um respeito imenso onde quer que passe. Sua dedicação, paciência e cuidados foram fundamentais para a realização deste projeto e estou muito agradecido por todas as oportunidades que me foram concedidas. Sem dúvida, o senhor é o orientador que muitos desejam.

Quero agradecer de coração à Professora Roueda, que sempre tem as palavras certas e uma sensibilidade incrível para com todos ao seu redor. Obrigado por suas palavras de força e apoio!

Aos meus colegas do Laboratório de Análises Clínicas Veterinária, agradeço profundamente por toda a ajuda e apoio. Vocês são verdadeiros companheiros e tenho muita gratidão por estarem ao meu lado durante esse período. Assim, agradeço os meninos do Iniciação Científica: Larissa, Fernando e Vinicius. A Milena sempre aplicada e Cris também.

À minha amiga, Gabriela Mota Sena de Oliveira, uma grande amiga incrível e sábia, agradeço muito a Deus pela sua vida. Desejo todas as bênçãos sobre ti e família.

À Jamille Pinto Carvalho dos Santos por toda a paciência e ensino, sendo fundamental para a realização deste projeto. Hellen Ferraz pela sua incrível solicitude, meus muito

obrigados. Eliege pelo companheirismo do dia a dia. Fran que veio para somar em um momento bem crítico do projeto, realmente sou muito grato e pode contar comigo no que precisar. Inês que me ensina a levar uma vida mais leve e simples.

À Luciana Carvalho Lacerda, Aísla Nascimento da Silva, Uillians Volkart de Oliveira, Rebeca Dáley Santos Cruz, Jéssica de Souza Freitas e Paula Fernanda Costa de Souza pela amizade construída ao longo dos anos. Vocês sempre estiveram disponíveis quando precisei de uma ajuda e são certamente pessoas referenciais para mim, com quem tenho tanto orgulho e respeito.

À Ana Paula Calazans, João Calazans e Jéssica Freitas, pois sem o trabalho de vocês não teríamos esse projeto.

Ao Pastor Cidraco e família por tamanho carinho e amor.

Igreja Evangélica Assembleia de Deus — Cotia, minha primeira família na fé que tenho muitas saudades. Também a Igreja Evangélica Assembleia de Deus — Salobrinho, por ter me acolhido e se tornado minha segunda família aqui na Bahia. São duas famílias ricas de amor, fé e esperança, e sou imensamente grato por fazer parte de vocês.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Ao colegiado da Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aos membros da banca em participar desta avaliação, contribuindo enriquecedoramente o trabalho.

Gratidão a todos que participaram direta ou indiretamente durante esse projeto. Desejo toda sorte de bençãos sobre cada um de vocês.

“A glória de Deus é ocultar certas coisas; tentar descobri-las é a glória dos reis.”

Provérbios 25:2

EPIDEMIOLOGIA DE *Anaplasma platys* EM CÃES HÍGIDOS NO MUNICÍPIO DE PORTO SEGURO, BAHIA

RESUMO

Anaplasma platys é uma bactéria com distribuição mundial, possuindo tropismo plaquetário, tendo o cão como hospedeiro reservatório causando Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC). A transmissão do patógeno ocorre durante o repasto sanguíneo pelo carrapato marrom, sugerido como principal vetor, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Objetivou-se neste estudo determinar a ocorrência de infecção por *A. platys* em cães hígidos domiciliados, assim como a identificação dos fatores de risco e o perfil hemato-bioquímico dos animais, em Porto Seguro, Bahia, Brasil. Foram coletados 396 amostras de sangue de cães selecionados por conveniência no período de março a novembro de 2017. Um questionário foi aplicado aos tutores para determinar os fatores de risco associados à infecção de *A. platys*. Os dados de hemograma completo, leucograma e bioquímica sérica dos animais foram submetidos ao teste *t* de Student. A presença de anemia, leucopenia e trombocitopenia associada a infecção de *A. platys* foram avaliadas através do teste Qui-quadrado com correção de *Yates*. Os fatores de risco associados à infecção de *A. platys* foram submetidos a regressão logística não condicional. As amostras de sangue foram submetidas a extração e pesquisa de DNA de *A. platys* através da técnica *nested-PCR*. Observou-se uma prevalência de 38,63% (153/396). No modelo final as variáveis “acesso à rua” (*Odds Ratio* [OR] = 0,51; intervalo de confiança [IC]: 0,33 – 0,80; valor de *p* = 0,003 e “mora em zona urbana” ([OR] = 0,60; intervalo de confiança [IC]: 0,33 – 0,76; valor *p* = 0,001) foram identificadas como fatores de proteção. Por fim, a elevada positividade para *A. platys* associada aos fatores de proteção pode ser fundamental para futuras pesquisas compreenderem a dinâmica da transmissão de *A. platys*, contribuindo na implementação de medidas de prevenção e controle da doença em cães, e possivelmente, em outros animais.

Palavras- chaves: *Anaplasma platys*; Cão; Fatores de proteção; Frequência; PCR.

EPIDEMIOLOGY OF *Anaplasma platys* IN HEALTHY DOGS IN THE MUNICIPALITY OF PORTO SEGURO, BAHIA

ABSTRACT

Anaplasma platys is a bacterium with worldwide distribution, possessing platelet tropism, with the dog as the reservoir host causing infectious cyclic thrombocytopenia in dogs (ICCT). The pathogen's transmission occurs during blood feeding by the brown tick, suggested as the main vector, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. The aim of this study was to determine the occurrence of *A. platys* infection in healthy domestic dogs, as well as to identify the risk factors and the hematological-biochemical profile of the animals, in Porto Seguro, Bahia, Brazil. 396 blood samples were collected from dogs selected by convenience from March to November 2017. A questionnaire was applied to the guardians to determine the risk factors associated with *A. platys* infection. The data from the complete blood count, leukogram, and serum biochemistry of the animals were subjected to the Student's *t*-test. The presence of anemia, leukopenia, and thrombocytopenia associated with *A. platys* infection was evaluated through the Chi-squared test with *Yates* correction. The risk factors associated with *A. platys* infection were subjected to unconditional logistic regression. The blood samples were subjected to DNA extraction and search for *A. platys* through the nested-PCR technique. A prevalence of 38.63% (153/396) was observed. In the final model, the variables "access to the street" (*Odds Ratio* [OR] = 0.51; confidence interval [CI]: 0.33 – 0.80; *p-value* = 0.003) and "living in an urban area" ([OR] = 0.60; confidence interval [CI]: 0.33 – 0.76; *p-value* = 0.001) were identified as protective factors. Finally, the high positivity for *A. platys* associated with the protective factors, can be critical for future research to understand the dynamics of *A. platys* transmission, contributing to the implementation of disease prevention and control measures in dogs, and possibly other animals.

Keywords: *Anaplasma platys*; Dog; Protective factors; Frequency; PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo celular intracelular de Anaplasmataceae.....	22
Figura 2	Mapa de localização do Município de Porto Seguro, Bahia.....	32
Figura 3	Eletoforese em gel de agarose a 2%. Resultado da <i>nested</i> -PCR para <i>A. platys</i> apresentando um produto de 678 pb. Canaleta 1: marcador de peso molecular de 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen®); Canaleta 2: controle positivo, Canaleta 3: negativo (água ultrapura); Canaleta 4-6,8 e 10 amostras positivas; Caneletas 7, 9 e 11 negativas.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudos de prevalência e frequência de infecção por <i>Anaplasma platys</i> em cães diferentes estados do Brasil.....	18
Tabela 2	Resumo dos estudos demonstrando manifestações clínicas por <i>Anaplasma platys</i>	25
Tabela 3	Descrição das sequências de oligonucleotídeos, tamanho dos produtos da PCR e referências utilizadas para detecção de <i>Anaplasma platys</i> e GAPDH.....	36
Tabela 4	Frequência dos animais portadores da infecção por <i>Anaplasma platys</i> de acordo a localidade em Porto Seguro, BA.....	38
Tabela 5	Valores médios e desvio padrão dos valores hematológicos de cães naturalmente infectados e não infectados, por <i>Anaplasma platys</i> no Município de Porto Seguro, BA.....	39
Tabela 6	Valores médios e desvio padrão das análises bioquímicas de cães naturalmente infectados e não infectados, por <i>Anaplasma platys</i> no Município de Porto Seguro, BA.....	40
Tabela 7	Análise bivariada das variáveis “Tem anemia”, “Tem Leucopenia” e “Tem Trombocitopenia” associados à infecção por <i>Anaplasma platys</i> em cães naturalmente infectados no município de Porto Seguro, BA.....	40
Tabela 8	Fatores com plausibilidade biológica associados à infecção por <i>Anaplasma. platys</i> em cães naturalmente infectados no município de Porto Seguro, BA.....	41
Tabela 9	Modelo preliminar da regressão logística não-condicional dos fatores associados à infecção por <i>Anaplasma platys</i> em cães em Porto Seguro, BA.....	42
Tabela 10	Modelo final da regressão logística não-condicional dos fatores associados à infecção por <i>Anaplasma. platys</i> em cães em Porto Seguro, BA.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO GERAL	15
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1 Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina	16
4.1.1 Agente etiológico	16
4.1.2 Epidemiologia.....	17
4.1.3 Fatores associados.....	19
4.1.4 Patogenia e aspectos imunológicos	21
4.1.5 Alterações laboratoriais.....	23
4.1.6 Manifestações clínicas	25
4.1.7 Hospedeiros, vetores e reservatórios	26
4.1.8 Diagnóstico	28
4.1.9 Tratamento.....	30
4.1.10 Prognóstico	31
5 MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Diretrizes éticas	32
5.2 Local do estudo	32
5.3 População amostral	33
5.4 Coleta de dados, anamneses e exame clínico dos animais	33
5.5 Obtenção de amostras biológicas	33
5.6 Processamento e análise das amostras	34
5.6.1 Hemograma	34
5.6.2 Bioquímica sérica	34
5.7 Extração de DNA	34
5.7.1 Quantificação e pureza do DNA.....	35
5.7.2 <i>Nested</i> -PCR para detecção de DNA de <i>Anaplasma platys</i>	35
5.7.3 PCR do GAPDH: Avaliação da integridade do DNA	36
5.8 Eletroforese de DNA em gel de agarose	37
5.9 Análise estatística	37
6 RESULTADOS	38
6.1 Diagnóstico molecular	38
6.2 Achados laboratoriais	39
6.3 Fatores associados	40
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÃO	46
ANEXO	11

1 INTRODUÇÃO

A anaplasmose é uma hemoparasitose cujo agente etiológico são *Anaplasma* sp., bactéria Gram-negativa intracelular (STELLA *et al.*, 2021) caracterizada por infectar principalmente leucócitos e hemácias, formando agregados bacterianos Gram-negativos intracitoplasmáticos ligados à membrana, chamados de mórulas. A depender do hospedeiro vertebrado possui tropismo pelos eritrócitos, monócitos/macrófagos, granulócitos ou plaquetas presentes no sangue periférico (SILAGHI *et al.*, 2017). *Anaplasma platys* possui distribuição mundial, sendo um microrganismo plaquetário-específico, tendo o cão como hospedeiro reservatório (LABRUNA *et al.*, 2005), e causa a Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC), transmitida durante o repasto sanguíneo pelo carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) (GAUNT *et al.*, 2010).

Rhipicephalus sanguineus s.l. possui distribuição cosmopolita com capacidade de parasitar animais silvestres (MARTINS *et al.*, 2021), domésticos e humanos (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006) e é o vetor biológico para os seguintes hemoparasitas: *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, *Anaplasma platys* (PASCHOAL *et al.*, 2020), *Hepatozoon canis* (SPOLIDORIO *et al.*, 2011). Indubitavelmente, a presença do cão, do homem e do vetor preocupa tanto a saúde pública como a medicina veterinária (EL HAMIANI KHATAT *et al.*, 2022).

Um cão sem a devida proteção contra ectoparasitas, permite o crescimento populacional do carrapato, bem como o desenvolvimento de todos os estágios do vetor (SAINZ *et al.*, 2015). Instalada a parasitemia com *A. platys*, o cão apresenta sinais subclínicos ou clínicos como febre, letargia, anorexia, perda de peso, membranas mucosas pálidas, petéquias, secreção nasal mucopurulenta, distúrbios hemorrágicos e linfadenomegalia. Além disso, nos achados laboratoriais pode apresentar anemia, trombocitopenia, leucocitose e leucopenia, sendo os distúrbios mais comuns (BOUZOURAA *et al.*, 2016).

Uma característica específica desta hemoparasitose no cão é seu aparecimento cíclico intraplaquetário, apresentando períodos alternados da manifestação clínica e laboratorial com trombocitopenia cíclica (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

O exame hematológico do esfregaço sanguíneo pode revelar inclusões basofílicas de *A. platys* nos trombócitos, que podem ser confirmadas posteriormente por análise molecular, como a PCR mesmo quando não há anticorpos específicos para o patógeno, essa confirmação é possível

(DYACHENKO *et al.*, 2012). Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão ajuda na identificação ultraestrutural do organismo (ARRAGA-ALVARADO *et al.*, 2003).

O presente estudo abordou a determinação dos fatores relacionados à infecção do agente com potencial zoonótico, *A. platys*, em uma das principais cidades turísticas do Extremo Sul da Bahia, com o objetivo de compreender a epidemiologia da Trombocitopenia Cíclica Infeciosa Canina. Além disso, foi realizada uma análise do perfil hemato-bioquímico dos animais positivos na detecção molecular de DNA de *A. platys*. Este estudo é pioneiro na investigação deste patógeno zoonótico no estado da Bahia, contribuindo para compreensão da epidemiologia da TCIC e suas implicações para a saúde pública e veterinária.

2 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência e fatores associados à *Anaplasma platys* em cães hígidos no município de Porto Seguro, Bahia.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar, por meio da *nested*-PCR, a frequência de *Anaplasma platys* em cães hígidos residentes da zona rural e da zona urbana de Porto Seguro, Extremo Sul da Bahia;
- Determinar alterações hematológicas e bioquímicas em cães infectados por *Anaplasma platys*;
- Verificar os fatores associados à infecção por *Anaplasma platys*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1.1 Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina

4.1.2 Agente etiológico

O gênero *Anaplasma* foi descrito pela primeira vez por Theiler (1910) quando encontrou “manchas marginais” em eritrócitos de gado sul-africano. Ele denominou essas manchas como *Anaplasma marginale*. Posteriormente, descreveu a subespécie *A. centrale*, presente no centro das hemácias (KOCAN *et al.*, 2003; PALMER, 2009; THEILER, 1911). Desde então, outras espécies do gênero *Anaplasma* foram descobertas: *Anaplasma ovis* (LESTOQUARD, 1924), *Anaplasma bovis* (DONATIEN; LESTOQUARD, 1936), *Anaplasma phagocytophilum* (JENKINS *et al.*, 2001), *Anaplasma platys* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978; HARRUS *et al.*, 1997), *Anaplasma odocoilei* (TATE *et al.*, 2013) e *Anaplasma capra* (LI *et al.*, 2015).

Anaplasma platys é uma das oito espécies incluídas no gênero *Anaplasma*, na família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales, classe Alphaproteobacteria, filo Proteobacteria e domínio Eubacteria. É uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, pleomórfica, cocoide e elipsoidal, possuindo 0,3-0,4 µm de diâmetro (LLANES; RAJEEV, 2020), possuindo tropismo plaquetário em cães, provocando a Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC) (DUMLER *et al.*, 2001; ATIF *et al.*, 2021). No esfregaço sanguíneo é caracterizada como pequena Anaplasmataceae com coloração basofílica em vacúolos de plaquetas (DYACHENKO *et al.*, 2012), sendo o cão hospedeiro reservatório (LABRUNA *et al.*, 2005).

O DNA de *Anaplasma platys* foi isolado pela primeira vez de amostras sanguíneas de cães infectados experimentalmente nos Estados Unidos das Américas (EUA). Este patógeno resultou nos animais TCIC com destruição das plaquetas em período de oito a 15 dias após inoculação. Tal estudo possibilitou associar alterações hematológicas nos animais pós-infecção (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978). Inicialmente, essa espécie foi denominada *Ehrlichia platys* com base nas semelhanças biológicas e morfológicas com *Ehrlichia canis* (*E. canis*) e *A. marginale*, sendo classificada no gênero *Ehrlichia*. Entretanto, Anderson *et al.* (1992) compararam a sequência do gene 16S *rDNA* obtida de *E. canis* com outras espécies do gênero *Ehrlichia*, através da amplificação, clonagem e sequenciamento do gene 16S *rDNA*. Foi observado uma divergência na sequência de RNAr 16S entre *E. canis* e *E. platys*, fornecendo bases sólidas para separação das duas espécies. Posteriormente, Dumler *et al.* (2001), reclassificando rickettsias intimamente

relacionadas na árvore filogenética, incluiu *E. platys* na família Anaplasmataceae, gênero *Anaplasma* e, desde então, como espécie *Anaplasma platys*.

4.1.3 Epidemiologia

Anaplasma platys predomina em áreas subtropicais e tropicais, associando-se com a presença do vetor *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) (IRWIN, 2002; PÉREZ-MACCHI *et al.*, 2019) que também possui distribuição mundial (LABRUNA *et al.*, 2005) e está frequentemente associado à *E. canis* por possuírem provavelmente o mesmo vetor (CICUTTIN *et al.*, 2015; PÉREZ-MACCHI *et al.*, 2019).

Anaplasma platys foi descrita em várias regiões do mundo, incluindo América do Norte (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978); América Central (SANTAMARIA *et al.*, 2014); América do Sul (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2013); Norte da África (BEN SAID; BELKAHIA; MESSADI, 2018); Sul da África (THEILER, 1911); Oriente Médio (SELIM *et al.*, 2021); Ásia (MOKHTAR; LIM; TAY, 2013), Europa (SAINZ; AMUSATEGUI; TESOURO, 1999) e Oceania (MARTIN *et al.*, 2005).

De acordo com estudos realizados em países da América Latina, foram encontradas as seguintes prevalências: Colômbia 16,1% (35/116) (MCCOWN *et al.*, 2014), México 3,0% (3/100) (ALMAZÁN *et al.*, 2016), Uruguai 4,2% (8/191) (CARVALHO *et al.*, 2017), Panamá 21,4% (43/201) (SANTAMARIA *et al.*, 2014), Venezuela 16,3% (7/43) (HUANG *et al.*, 2005), Paraguai 10,67% (41/384) (PÉREZ-MACCHI *et al.*, 2019) e Costa Rica 6,3% (19/300) (ÁBREGO *et al.*, 2009).

No Brasil, *A. platys* foi identificado nas cinco regiões geográficas através da técnica de diagnóstico molecular, a saber: Norte (BRANDÃO *et al.*, 2019); Nordeste (RAMOS *et al.*, 2010); Centro-Oeste (SOARES *et al.*, 2017); Sudeste (SANTOS *et al.*, 2009) e Sul do país (PASCHOAL *et al.*, 2020). Esses estudos sugerem que *A. platys* é endêmico no país (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2013) com prevalências entre 0,9% no Sudeste e 68,9% no Centro-Oeste (Tabela 1). Os resultados variam conforme a metodologia utilizada na pesquisa (RAMOS *et al.*, 2009), assim como, variáveis categorizadas como vetor, hospedeiro, fatores abióticos e habitat (STICH *et al.*, 2014).

Tabela 1- Estudos de prevalência e frequência de infecção por *Anaplasma platys* em cães diferentes estados do Brasil

LOCAL	POPULAÇÃO DE ESTUDO	PREVALÊNCIA	TÉCNICA DIAGNÓSTICA	REFERÊNCIAS
Rio de Janeiro (RJ)	Clínica Veterinária	0,9% (2/226)	Esfregaço sanguíneo	Macieira <i>et al.</i> (2005)
Rio de Janeiro (RJ)	Diferentes localidades	14,8% (15/101) 15,8% (16/101)	Esfregaço sanguíneo Nested-PCR	Ferreira <i>et al.</i> (2007)
Recife (PE)	Hospital Veterinário	21% (21/100) 55% (55/100)	Esfregaço sanguíneo Nested-PCR	Ramos <i>et al.</i> (2009)
Cuibá (MT)	Hospital Veterinário	68,9% (53/77) 9,1% (7/77)	Esfregaço sanguíneo Nested-PCR	Witter <i>et al.</i> (2013)
Ribeirão Preto (SP)	Hospital Veterinário	14,9% (33/221)	Nested-PCR	Santos <i>et al.</i> (2009)
Recife (PE)	Hospital Veterinário	48,8% (100/205)	Nested-PCR	Ramos <i>et al.</i> (2010)
Porto Alegre (RS)	CCZ e semi-domiciliados	14,1% (28/199)	Nested-PCR	Lasta <i>et al.</i> (2013)
Belém (PA)	CCZ e campanha vacinação	23,1% (64/276)	Nested-PCR	Brandão <i>et al.</i> (2019)
Campo Grande (MS)	Clínicas Veterinárias	9,9% (18/181)	Nested-PCR	Soares <i>et al.</i> (2017)
Belo Horizonte (MG)	Zona rural Zona urbana	13,9% (23/165) 5,1% (5/98)	qPCR qPCR	Costa-Júnior <i>et al.</i> (2013)
Londrina (PR)	Domiciliados	19,4% (49/256)	PCR	Silva <i>et al.</i> (2012)
Campo Grande (MS)	CCZ	1,6% (1/60)	PCR	Sousa <i>et al.</i> (2013)
Pato Branco (PR)	Não domiciliados e abrigados (ONG)	32,9% (60/182)	PCR	Ribeiro <i>et al.</i> (2017)
Pantanal (MT)	Domiciliados	7,2% (23/320)	PCR	Melo <i>et al.</i> (2016)
Londrina (PR)	Hospital Veterinário	15,1% (13/86)	PCR	Paschoal <i>et al.</i> (2020)

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase; qPCR = PCR em tempo real; RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta; CCZ = Centro de Controle de Zoonoses; ONGs = Organizações não Governamentais.

A anaplasiose tem caráter zoonótico e pode ser diagnosticada em humanos, incluindo profissionais veterinários. Há cerca de duas décadas, foram realizadas investigações para detecção de DNA de *A. platys* em humano na Venezuela (ARRAGA-ALVARADO *et al.*, 1999; JORDÁN, 2002; TAMÍ; TAMÍ-MAURY, 2004). Em Grenada, uma médica veterinária apresentou enxaquecas, convulsões e outras alterações neurológicas após contato com vetores presente nos

animais durante o trabalho. Após a realização dos exames moleculares, foi amplificado DNA de *A. platys*, juntamente com outros patógenos provavelmente transmitidos pelo carrapato *R. sanguineus* s.l. (MAGGI *et al.*, 2013). Breitschwerdt *et al.* (2014), conseguiram amplificar e sequenciar o DNA de *A. platys* tanto no cão quanto na tutora, porém não na filha, que entre os membros da família foram as principais cuidadoras. Com isso, infecções em animais de companhia sugerem a presença do vetor infectado no ambiente, ao qual os humanos também podem estar expostos (DINIZ; AGUIAR, 2022).

4.1.4 Fatores associados

Os principais fatores associados à infecção por *A. platys* são mudanças climáticas (BEN SAID; BELKAHIA; MESSADI, 2018; RAMZAN *et al.*, 2021), desmatamento, (RAMZAN *et al.*, 2021), faixa etária, número de contactantes, atendimento veterinário, ectoparasiticidas (PÉREZ-MACCHI *et al.*, 2019), sexo (BEN SAID; BELKAHIA; MESSADI, 2018), acesso à rua (SILVA *et al.*, 2012), carrapato (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2013) e raça (HARRUS *et al.*, 1997) que podem contribuir na transmissão da anaplasiose.

Entre os fatores de risco, as mudanças climáticas são conhecidas pelos seus efeitos no *R. sanguineus* s.l. Durante períodos frios, a fase parasitária do carrapato é prolongada, resultando no atraso nas outras fases e diminuindo ocorrência de novas infecções (GRAY *et al.*, 2013).

De acordo com Costa-Júnior *et al.* (2013), cães localizados em áreas rurais apresentam maior frequência de infecção por *A. platys* durante o período de chuvas em comparação com animais de áreas urbanas. Além disso, eles também descobriram que há maior infestação de *R. sanguineus* s.l. nos cães localizados nas áreas rurais com temperatura média anual acima de 20°C e maior umidade, em comparação com cães inseridos em áreas urbanas com temperatura média anual abaixo de 17°C e menor umidade. Ao reavaliar os animais, foi observado maior incidência de infecção por *A. platys* apenas em cidades com temperatura acima de 20°C com maior umidade, sugerindo a importância do clima na interferência do comportamento do vetor para transmissão de *A. platys*.

Com efeito, as mudanças climáticas desempenham um papel importante na alteração do comportamento e/ou seleção da linhagem do carrapato presente na região (GRAY *et al.*, 2009). Além disso, um dos principais fatores para a transmissão de doenças transmitidas por carrapatos (DTCs) são desmatamento, perda de habitat, urbanização, turismo e perda da biodiversidade. Tais

ações contribuem para o aumento de vetores, pois os carrapatos têm a capacidade de extensão mesmo que limitado (RAMZAN *et al.*, 2021), em busca de alimento e condições de microclima ideais para seu desenvolvimento (GRAY *et al.*, 2009).

Pérez-Macchi *et al.* (2019) identificaram que cães que possuíam contactantes da mesma espécie apresentavam potencial fator de risco para infecção de *A. platys*, sugerindo que maiores densidades populacionais contribuem para maiores infestações do vetor e, conseqüentemente transmissão do patógeno.

Selim *et al.* (2021) avaliaram o impacto do uso de ectoparasiticidas no risco de infecção por *A. platys*. Os resultados mostraram que o grupo que não utilizou o tratamento apresentou-se como um fator de risco para a infecção, corroborando os achados de Pérez-Macchi *et al.* (2019). A ausência do uso de acaricidas possibilita a exposição e a criação do hábito nidícola do vetor infectado, que mantém aproximadamente 95% do seu ciclo de vida no ambiente (DINIZ; AGUIAR, 2022).

Harrus *et al.* (1997) descreveram que a raça Pastor alemão é mais suscetível à infecção por *A. platys*, e esse achado é corroborado por Selim *et al.* (2021), que também identificaram essa raça como fator de risco ao compará-la com as raças Rottweiler e Pit bull. Além disso, raças de cães com pelagem longa são propensas a infestações de carrapatos, pois a pelagem longa dificulta a remoção durante a coçadura e a visualização pelo tutor (SILVEIRA; PASSOS; RIBEIRO, 2009).

Estudos apontam a predileção de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. por determinadas raças, como no estudo de Louly *et al.* (2009), que notaram maior susceptibilidade da raça Cocker Spaniel inglês em comparação com a raça Beagle. Possivelmente, a predileção por determinadas raças está associado ao comportamento do animal, assim como fatores fisiológicos e imunológicos desencadeados durante o repasto sanguíneo (DANTAS-TORRES, 2010).

Nos estudos epidemiológicos de Silva *et al.* (2012), Costa-Júnior *et al.* (2013) e Pérez-Macchi *et al.* (2019), não foi observada associação entre sexo dos cães e infecção por *A. platys*. No entanto, Selim *et al.* (2021) identificaram o sexo feminino como fator de risco. De acordo com Konto *et al.* (2014), as fêmeas, após o período de amamentação, podem adquirir um hábito sedentário, facilitando a exposição ao vetor infectado.

De acordo com Silva (2016), os animais com idade inferior a seis meses têm uma maior probabilidade de estarem infectados com *A. platys*. O autor sugere que a maior susceptibilidade à infecção nessa fase de vida é provavelmente devido à primo-infecção com agente. Por outro lado,

entre as faixas etárias os animais idosos apresentam maior probabilidade de infecção devido maior ocorrência de exposição ao longo da vida, assim com as reinfecções adquirem um sistema imunológico com capacidade de resolução aprimorada frente ao patógeno. No entanto, outros estudos não observaram a idade como fator de risco (SILVA *et al.*, 2012; COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2013; PÉREZ-MACCHI *et al.*, 2019; SARKER *et al.*, 2021).

Cães de vida livre que circulam pela vizinhança têm uma maior prevalência de ectoparasitas devido à falta de tratamento com ectoparasiticidas e pela exposição aos carrapatos (DANTAS-TORRES, 2010). Portanto, animais que têm acesso à rua podem participar desta exposição individualmente ou pelo agrupamento com outros cães. No entanto, estudos realizados como de Silva *et al.* (2012) e Pérez-Macchi *et al.* (2019) não encontraram associação entre essa variável e infecção de *A. platys*.

No estudo conduzido por Selim *et al.* (2021), cães sem acompanhamento veterinário foram associados como fator de risco à infecção de *A. platys*. Este foi o único estudo encontrado que identifica essa associação, pois outros estudos como de Pérez-Macchi *et al.* (2019) não encontraram essa relação. Curiosamente, eles notaram que a ausência do acompanhamento do veterinário é um fator de risco para outros membros da família Anaplasmataceae, que também possui *R. sanguineus* s.l. como vetor. Isso pode ser explicado o risco devido falta de cuidados com a saúde dos cães.

4.1.5 Patogenia e aspectos imunológicos

Para o mecanismo de evasão, *A. platys* possui habilidades de infiltração nas plaquetas do hospedeiro, sendo o único patógeno que infecta plaquetas de cão. As plaquetas são pequenos componentes celulares anucleados derivados da medula óssea com função de hemostasia. Logo, a característica trombocitopênica pode ser um agravante devido ao quadro crítico dos trombócitos (plaquetas) disponíveis, levando a hemorragias (LLANES; RAJEEV, 2020).

As plaquetas atuam na hemostasia normal, inflamações, imunidade e cicatrização de feridas. São originárias de células-troncos pluripotentes, derivadas de megacariócitos através do processo de endomitose (DEPPERMAN; KUBES, 2018).

A família Anaplasmataceae é composta por células reticuladas que se multiplicam por fissão binária, formando mórulas e realizam endocitose após aderirem à superfície das plaquetas. Posteriormente, apresentam-se em volta de dupla membrana, provavelmente derivada da

membrana vacuolar, originada da membrana externa plaquetária. Esse mecanismo permite a replicação nos vacúolos plaquetários (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978) (Figura 1).

Apesar de apresentar tropismo plaquetário, um estudo feito por Tommasi *et al.* (2014) encontraram corpos de inclusão e DNA de *A. platys* em precursores de plaquetas, especificamente megacariócitos e promegacariócitos, sendo corroborado por Latrofa *et al.* (2016). Quanto à infecção, pode ser causada por transfusão sanguínea (ALVIM *et al.*, 2019), exposição natural e inoculação experimental (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978), e possivelmente transmissão vertical (LATROFA *et al.*, 2016).

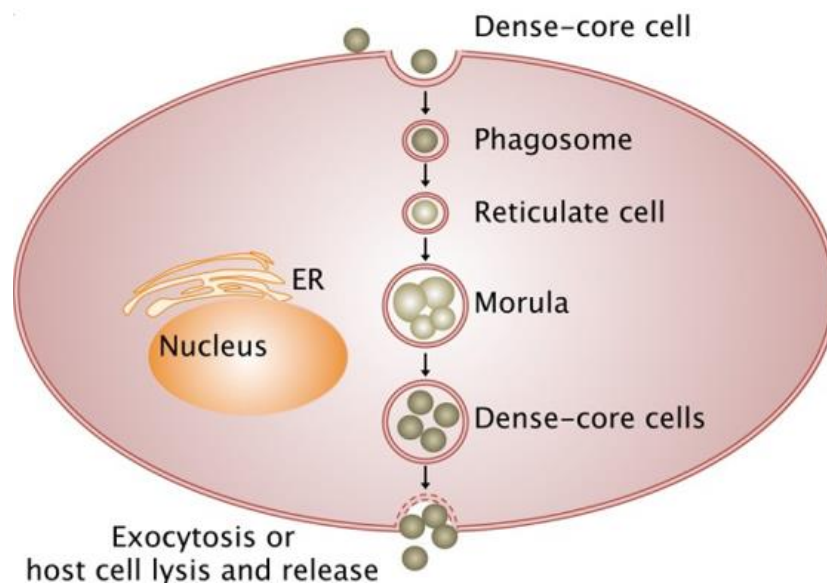


Figura 1. Ciclo intracelular de Anaplasmatóceas. As duas fases principais: uma forma vegetativa (mórulas) e uma forma infecciosa (células de núcleo denso). A fase vegetativa é alcançada através da formação de células reticuladas replicantes no fagossomo, que não se unem ao lisossomo e formam mórulas. Essas células reticuladas, amadurecem em células de núcleo denso que são liberadas através de exocitose ou lise da célula hospedeira. As setas indicam a transição entre as fases e RE representa retículo endoplasmático. Fonte: Pruneau *et al.* (2014) (Adaptado)

De acordo com Pruneau *et al.* (2014), as técnicas de “Omicas” (genômica, proteômica, metabolômica e transcriptômica) podem ser utilizadas para compreender a patogênese das bactérias Anaplasmatóceas. Eles destacam que essas técnicas permitem uma melhor compreensão da interação entre a bactéria e o hospedeiro, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos. Além disso, mencionam estudos recentes que utilizam essas técnicas para caracterizar a resposta do hospedeiro à infecção por Anaplasmatóceas e discutem como podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas.

Lai *et al.* (2011) com uso da técnica genômica conseguiram clonar o *locus* de expressão da proteína presente na membrana externa de *A. platys*. Esse estudo revelou a existência de uma população mista de alelos P44 de *A. platys* e demonstrou que o par de iniciadores p44 HVF e HVR podem ser usados para obter um repertório mais completo de sequências p44 de *A. platys* em várias regiões geográficas, permitindo o estudo da diversidade do antígeno P44 entre as cepas de *A. platys*. Essa descoberta impulsiona novas investigações sobre o tropismo da célula hospedeira de *Anaplasma spp.*

As informações sobre o tropismo das *Anaplasma spp.* para tipos específicos de células em seus hospedeiros ainda são escassas. Isso também se aplica para *A. platys*, que pode modificar a expressão de moléculas de superfície reconhecidas pelo sistema imunológico, uma vez que as plaquetas possuem receptores de superfície e de reconhecimento de padrões, como TLR2 e TLR4. Além disso, o mecanismo pelo qual *A. platys* entra nas plaquetas e, conseqüentemente, causa trombocitopenia cíclica, ainda é pouco compreendido (DEPPERMANN; KUBES, 2018).

Em estudo recente foi realizado o primeiro rascunho do genoma de *A. platys*, trazendo novas evidências em relação à ausência de uma proteína importante para a sobrevivência em ambientes frios. Esse estudo também identificou diferenças significativas no número e na organização dos genes ao comparar com outras *Anaplasma spp.*, lançando bases sólidas sobre a biologia de *A. platys* (LLANES; RAJEEV, 2020).

4.1.6 Alterações laboratoriais

A infecção por *A. platys* pode causar anormalidades laboratoriais, principalmente TCIC associada concomitante com anemia normocítica normocrômica leve a moderada não regenerativa (SAINZ *et al.*, 2015), monocitose, hipoalbuminemia e macroplaquetas (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

Conseqüentemente, após infecção por *A. platys*, pode ocorrer trombocitopenia cíclica concomitante a episódios parasitêmicos durante período de sete a 14 dias durante a infecção aguda (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978). Além disso, no estudo feito por Gaunt *et al.* (2010), no qual cães foram inoculados com *A. platys* e *E. canis* em cães, foi sugerido que o mecanismo patofisiológico desencadeado pela *A. platys* ocorre diferentemente da *E. canis*, pois a diminuição da concentração plaquetária ocorre em um período mais curto em resposta aos patógenos. No entanto, é importante ressaltar que os resultados desse estudo podem ter sido afetados por diferentes cepas de *A. platys*, dosagens ou isolados específicos. Outro aspecto relevante sobre *A. platys* é que

este agente interage especificamente com as plaquetas, afetando a meia-vida circulante dessas células (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

A remoção plaquetária do organismo ocorre pela sua eliminação através baço, fígado, medula (EDDLESTONE *et al.*, 2007), bem como devido à diminuição pela lesão direta do patógeno em replicação (fase inicial) e dos macrófagos pelo mecanismo imunomediado (anticorpos antiplaquetários) nas trombocitopenias cíclicas (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

Dentre as possíveis alterações laboratoriais, Kelly *et al.* (2013) observaram que os cães positivos para *A. platys* pelo teste de imunocromatografia e pela PCR não apresentaram anormalidades laboratoriais. Esses resultados corroboram com Lasta *et al.* (2013) que não encontraram associação entre as anormalidades hematológicas e a infecção por *A. platys* nos cães naturalmente infectados no Sul do Brasil. Ademais, Kelly *et al.* (2013) descreveram que outros cães foram diagnosticados com coinfeção para *E. canis*, sendo que um deles apresentou trombocitopenia e hiperglobulinemia. Além disso, outros cães apresentavam coinfeção por *A. platys*, *E. canis* e *Babesia vogeli*. Nesse caso, dois estavam assintomáticos, embora um deles apresentasse anemia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia.

Já Harrus *et al.* (1997) relataram presença de trombocitopenia, plaquetas gigantes, hematócrito baixo, monocitose e hipoalbuminemia. Expressivamente, no estudo realizado por Bouzouraa *et al.* (2016) na Europa, foi observado que cães positivos para *A. platys* apresentavam distúrbios hematológicos, como anemia isolada ou combinação de anemia com trombocitopenia, pancitopenia ou trombocitopenia isolada, enquanto uma pequena porcentagem não apresentava anormalidades.

Além disso, foi observada elevação da atividade enzimática hepática e hiperbilirrubinemia na bioquímica sérica. Outros casos com severidade clínica foram relatados por Glaze e Gaunt (1986) em cães da raça Chow chow, que foram positivos para *A. platys* pelo esfregaço sanguíneo e confirmados por sorologia, apresentando uveíte, anemia não regenerativa e trombocitopenia. No estudo por Sainz, Amusatogui e Tesouro (1999), um cão da raça Drahthaar de três anos foi relatado com pancitopenia, além dos principais achados clínicos característicos para *A. platys*.

Gaunt *et al.* (2010) relataram que em cães infectados com *A. platys* e posteriormente desafiados com *E. canis*, tiveram um aumento inesperado na elevação nos níveis de anticorpos anti *Anaplasma*, mesmo em um cão que não apresentava anticorpos séricos de *A. platys*. Isso sugere que *E. canis* pode estimular uma resposta imunológica que leva ao aumento da memória

imunológica para antígenos já reconhecidos, no caso, *A. platys*. Vale destacar que a presença de anticorpos contra *A. platys* é encontrada majoritariamente em episódio trombocitopênico inicial. Além disso, este foi o primeiro estudo a monitorar em longo prazo a progressão da depuração imunológica com detecção molecular de *A. platys* por até 160 dias pós infecção. Semelhantemente, Breitschwerdt *et al.* (2014) detectaram a presença de DNA de *A. platys* por aproximadamente 182 dias através da amplificação e sequenciamento do material genético.

4.1.7 Manifestações clínicas

De acordo com Harrus *et al.*, (1997), a principal característica da doença é TCIC, que pode apresentar sinais subclínicos na fase aguda em cães. Todavia, no estudo experimental, os autores relataram que dois cães na fase aguda apresentaram febre moderada (39,4°C) a elevada (40,2°C). Além disso, os cães infectados podem apresentar mucosas hipocoradas (com um 22% de hematócrito), inapetência, letargia, anorexia, perda de peso, epistaxe e descarga nasal mucopurulenta (Tabela 2) (HARRUS *et al.*, 1997; SAINZ; AMUSATEGUI; TESOURO, 1999; ORIÁ; PEREIRA; LAUS, 2004; AGUIRRE *et al.*, 2006).

Tabela 2. Resumo dos estudos demonstrando manifestações clínicas por *Anaplasma platys*

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	ANAPLASMA PLATYS	REFERÊNCIAS
Síndrome	Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina.	Nair <i>et al.</i> (2016)
Curso da doença	Aguda ou Subclínica.	Gaunt <i>et al.</i> (2010)
Gravidade clínica	Geralmente leve a moderado.	Bouzouraa <i>et al.</i> (2016)
Principal achado histórico	Nenhuma anormalidade clínica na maioria dos casos no EUA. Quando presente pode ocorrer letargia, inapetência, anorexia, perda de peso, epistaxe, descarga nasal mucopulenta, uveíte, dificuldade respiratória e secreção ocular purulenta	Harrus <i>et al.</i> (1997); Sainz; Amusatogui; Tesouro (1999); Oriá; Pereira; Laus (2004); Aguirre <i>et al.</i> (2006)
Sinais principais	Febre, linfadenopatia, petéquias, equimose, membranas mucosas pálidas.	Lara <i>et al.</i> (2020)
Principais achados laboratoriais	Trombocitopenia, leucocitose com neutrofilia, linfocitose e monocitose.	Abarca <i>et al.</i> (2007)
Diagnóstico diferenciais	Outras doenças transmitidas por vetores (anaplasnose, erliquiose, entre outras), trombocitopenia imune.	Baker <i>et al.</i> (1987)

Fonte: Diniz; Aguiar (2022) (Adaptado)

Usualmente, as manifestações clínicas em infecções isoladas variam de leves a assintomáticas, principalmente nos EUA (GAUNT *et al.*, 2010; NAIR *et al.*, 2016). No entanto, na

Europa e América do Sul, essas manifestações clínicas podem variar de leves a graves (SAINZ; AMUSATEGUI; TESOURO, 1999; ABARCA *et al.*, 2007; ULUTAŞ; BAYRAMLI; KARAGENÇ, 2007; ALHASSAN *et al.*, 2021).

Anteriormente, não estava claro se diferentes cepas apresentavam variação na patogenicidade (SAINZ; AMUSATEGUI; TESOURO 1999), mas atualmente sabe-se que algumas cepas são mais virulentas (M'GHIRBI *et al.*, 2009), o que pode levar a sinais clínicos exacerbados. Essa variação de virulência pode estar relacionada ao estresse, estado imunológico, predisposição racial e variabilidade de cepas (AGUIRRE *et al.*, 2006).

As infecções por *A. platys*, quando concomitantes com outros patógenos, podem predispor quadros clínicos mais severos, pois somente a presença de *A. platys* pode atenuar resposta imune e aumentar susceptibilidade para outras infecções (LARA *et al.*, 2020).

É de suma importância que os animais de companhia sejam avaliados regularmente por um médico veterinário e tratados em casos de infecção por *A. platys* (M'GHIRBI *et al.*, 2009). Os animais que apresentam anaplasmose por *A. platys* correm risco de morte, especialmente quando submetidos a cirurgia ou trauma contundente (DINIZ; AGUIAR, 2022).

4.1.8 Hospedeiros, vetores e reservatórios

Os cães são considerados reservatórios primários para *A. platys* (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978; FRENCH; HARVEY, 1993; KORDICK *et al.*, 1999; BREITSCHWERDT *et al.*, 2014). No entanto, nos últimos anos, pesquisadores têm sugerido outras espécies como possíveis hospedeiros, como gatos (LIMA *et al.*, 2010; CORREA *et al.*, 2011; QUROLLO *et al.*, 2014; HEGARTY *et al.*, 2015), e camundongo listrado (*Apodemus agrarius*) que foi encontrado infectado por *A. platys* com uma prevalência de 16% na Coreia e os carrapatos retirados (*Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes persulcatus*) desse pequeno mamífero apresentaram em todas as fases, infecção para a bactéria (KIM *et al.*, 2006). Paralelamente, 14,5% das raposas vermelhas (*Vulpes vulpe*) foram diagnosticadas com DNA de *A. platys* em Portugal (CARDOSO *et al.*, 2015). Os resultados desses estudos indicam que animais silvestres podem contribuir para a dinâmica da transmissão e podem ser potenciais fontes de infecção.

O DNA de *A. platys* também foi detectado em outras espécies, como ovelhas (CHOCHLAKIS *et al.*, 2009), impalas (DU PLESSIS *et al.*, 1997), veados vermelhos, javalis e cabras (PEREIRA *et al.*, 2016), camelos (RASSOULI *et al.*, 2020), bovinos (ANDRÉ *et al.*, 2020) e humanos (MAGGI *et al.*, 2013; BREITSCHWERDT *et al.*, 2014).

O carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus* sensu lato) é sugerido como o principal vetor biológico para *A. platys* (PASCHOAL *et al.*, 2020). Esses carrapatos são ativos e predominam em áreas urbanas devido ao seu hábito nidícola (procura abrigo perto do hospedeiro) e endófilo (adaptado à vida interna), principalmente em domicílios nas cidades. No entanto, eles também podem ser encontrados em áreas rurais, quando os cães são criados em ambientes semelhantes ao urbano, possibilitando sua presença (LABRUNA *et al.*, 2001). *R. sanguineus* s.l. também consegue sobreviver em ambientes externos, como paredes de pedra calcária (DANTAS-TORRES, 2010) e, quando há habitats úmidos disponíveis, permanece na vegetação ao ar livre para emboscar seus hospedeiros (GRAY *et al.*, 2013). Em temperaturas mais quentes, *R. sanguineus* s.l. apresenta um período de atividade prolongado e pode adquirir comportamento mais agressivo, aumentando a propensão de atacar humano (BACKUS; LÓPEZ PÉREZ; FOLEY, 2021; PAROLA *et al.*, 2008).

Rhipicephalus sanguineus s.l. (Latreille, 1806) foi reavaliado em sua taxonomia nos últimos anos (MORAES-FILHO *et al.*, 2011; ZEMTSOVA *et al.*, 2016; NAVA *et al.*, 2018), sendo caracterizado em duas linhagens dominantes com diferenças e, por vezes, sobreposição nas distribuições geográficas (BROPHY *et al.*, 2022). Recentemente, a linhagem temperada, *R. sanguineus sensu stricto* (ss) presente em regiões de clima frio e seco com temperatura média abaixo de 20°C (ZEMTSOVA *et al.*, 2016), teve uma redefinição de suas características morfológicas e moleculares com designação de um neótipo por Nava *et al.* (2018). Por sua vez, a linhagem tropical, *R. sanguineus* s.l. presente em clima quente e úmido com temperatura média acima de 20°C (ZEMTSOVA *et al.*, 2016), está atualmente passando por revisão taxonômica (ŠLAPETA; CHANDRA; HALLIDAY, 2021; BROPHY *et al.*, 2022). *Rhipicephalus sanguineus* s.l. possui distribuição mundial e no Brasil a linhagem tropical está presente em todo território (exceto Rio Grande do Sul) e a linhagem temperada localizada no sul do país (NAVA *et al.*, 2018).

As informações sobre a manutenção de *A. platys* no *R. sanguineus* s.l. eram limitadas até a descoberta de evidências que a linhagem tropical de *R. sanguineus* s.l. faz transmissão horizontal e transestadial, ou seja, transmissão aos estágios subsequentes, neste caso de larva para ninfa e ao adulto de *A. platys* (AKTAS; OZUBEK, 2018). Já a linhagem temperada de *R. sanguineus* ss apresentou competência vetorial, através da manutenção de infecções por *A. platys* para outras gerações pelas vias transestadial, coalimentação e até mesmo transovariana, envolvendo coelhos brancos da Nova Zelândia (SNELLGROVE *et al.*, 2020).

Anaplasma platys já foi detectado em diversos carrapatos como *Rhipicephalus turanicus* (HARRUS *et al.*, 2011), *Rhipicephalus bursa* (PAPA *et al.*, 2017), *Rhipicephalus camicasi* (MATEI *et al.*, 2016), *Rhipicephalus evertsi evertsi* (BERGGOETZ *et al.*, 2014), *Ixodes persulcatus* (JAVKHLAN *et al.*, 2014), *Ixodes ricinus* (PAPA *et al.*, 2017), *Dermacentor nuttalli* (JAVKHLAN *et al.*, 2014) e *Amblyomma cajennense* (MELO *et al.*, 2016), *Dermacentor auratus* (PAROLA *et al.*, 2003), *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes persulcatus* (KIM *et al.*, 2006) e *Haemaphysalis leachi* (KAMANI *et al.*, 2013).

Rhipicephalus sanguineus s.l. também transmite outros patógenos como *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Babesia vogeli* (PASCHOAL *et al.*, 2020; SPOLIDORIO *et al.*, 2011).

4.1.9 Diagnóstico

A identificação de mórulas baseia-se, principalmente, no diagnóstico direto pela avaliação do esfregaço sanguíneo de sangue periférico (SOARES; SOUZA; FELICIANO, 2006; RUCKSAKEN *et al.*, 2019). Além disso, pode ser realizada citologia a partir da capa leucocitária, linfonodo e medula óssea. A principal vantagem é custo – benefício, assim como o fato de ser um ensaio que pode ser realizado no local do atendimento ou em laboratório (DINIZ; AGUIAR, 2022). A limitação é que exige avaliação cuidadosa, sistematizada, prolongada, além de identificar a mórula na fase aguda. Em relação *A. platys*, ainda deve-se considerar a aparição cíclica da doença, tornando-se um desafio para os clínicos (HARRUS *et al.*, 1997), pois o percentual de plaquetas parasitadas varia de 0% a 2% para 14% em episódio parasitêmico inicial e, nas parasitemias subsequentes, somente 5,5% a 8% (HARVEY; SIMPSON; GASKIN, 1978).

Em comparação aos outros métodos, o esfregaço sanguíneo possui baixa sensibilidade (AKTAS *et al.*, 2015), variando de 0% a 10%, e com moderada sensibilidade quando realizado a partir da capa leucocitária, medula óssea ou linfonodo (DINIZ; AGUIAR, 2022). Um exemplo da baixa sensibilidade foi constatado por Rucksaken *et al.* (2019) que teve 0% (0/49) de cães negativos no esfregaço sanguíneo e 30,61% (15/49) positivos na PCR convencional. Em outro estudo realizado por Ramos *et al.* (2009), a frequência de cães infectados foi baixa, de 21% (21/100), ao ser comparada com os resultados obtidos na *nested*-PCR, que apresentou uma frequência de positividade de 55% (55/100). Por ora, um resultado expressivo de frequência de *A. platys* no esfregaço sanguíneo, como no estudo de Witter *et al.* (2013) 68,9% (53/77), pode estar associado a falsos-positivos devido à semelhança das estruturas com corpúsculos de inclusão relacionados a ativação plaquetária (FERREIRA *et al.*, 2007).

De acordo com Rucksaken *et al.* (2019), a baixa qualidade dos esfregaços sanguíneos confeccionados durante o estudo foi questionada, sendo recomendado o uso da PCR para diagnóstico de hemoparasitas, devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, Ferreira *et al.* (2007) relataram experiências satisfatórias com esfregaços sanguíneos, nos quais identificaram corpos de inclusão em 14,85% dos animais positivos, característico de *A. platys* e demais inclusões inespecíficas consideraram negativas. Na PCR, encontraram 15,84% de animais positivos, sem diferenças estatísticas entre os testes.

Na detecção de *A. platys*, pesquisadores recomendam a *nested*-PCR devido sua maior sensibilidade e especificidade, além de contribuir para a classificação taxonômica desta e de outros agentes infecciosos (RAMOS *et al.*, 2009; CORREA *et al.*, 2011).

A PCR pode ser utilizada no diagnóstico de infecção aguda, entretanto não é propícia para monitoramento durante período de tratamento, devido ao risco de falso positivo ocorrer mesmo na eliminação do patógeno alvo (ROSENBLATT; RELLER; WEINSTEIN, 2009).

O teste sorológico SNAP 4DX Plus (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME) e o VetScan Flex4™ são testes de ELISA rápido e útil na clínica, que fornecem resultados em apenas oito minutos. Esses testes apresentam diferenças significativas em suas sensibilidades. Enquanto o SNAP tem 83,3% de sensibilidade para detecção de anticorpos contra *A. platys*, o VetScan Flex4 apresenta 33,3%. Em relação à especificidade, ambos variam de 96,2% a 98,7% para *A. platys* (LIU *et al.*, 2018). No entanto, vale ressaltar que há a possibilidade de reatividade cruzada sorológica entre os anticorpos contra *A. phagocytophilum* e *A. platys*, conforme relatado por Chandrashekar *et al.* (2010) e Sacchi *et al.* (2012). A interpretação de um resultado sorológico positivo pode ser complexa devido à persistência de anticorpos após a resolução da infecção, portanto, é essencial realizar testes adicionais, pois uma sorologia positiva é somente sugestiva de exposição para *Anaplasma* spp. (SAINZ *et al.*, 2015).

Quando os animais são soronegativos para *A. platys*, isso provavelmente se deve à fase aguda da doença, na qual os anticorpos contra *A. platys* ainda não foram detectados (FERREIRA *et al.*, 2008). Isso pode ter ocorrido com Harrus *et al.* (1997), que identificaram inclusões plaquetárias em 11 cães, mas notaram soroconversão somente em cinco animais.

4.1.10 Tratamento

O tratamento recomendado por diversos autores consiste no uso de antibióticos, sendo a doxiciclina o fármaco de eleição (HARRUS *et al.*, 1997; NEER *et al.*, 2002; DINIZ; AGUIAR, 2022). A doxiciclina é um fármaco da família das tetraciclinas e possui ação bacteriostática de amplo espectro, ação de longa duração e por ser lipossolúvel apresenta ampla distribuição nos tecidos (VALENTÍN *et al.*, 2009).

Alguns estudos observaram atividade anti-inflamatória da doxiciclina, pois ela inibe a secreção de citocinas como fator de necrose tumoral α e interleucinas tipo 1β presentes nas infecções por bactérias Gram-negativas e positivas intracelulares (SHAPIRA *et al.*, 1996; KRAKAUER; BUCKLEY, 2003). Além disso, foi observado que a doxiciclina consegue restaurar habilidade fagocítica do organismo, pois inibe a proteína bacteriana de retardo de fusão do lisossomo com o fagossomo (GRENNE, 2006).

Estudos têm confirmado a eficácia do tratamento com doxiciclina (10 mg/kg SID 8 dias) para *A. platys*. Por exemplo, Teng; Palaniappan e Chang, (2003) observaram que animais infectados foram curados após o tratamento com doxiciclina, com a eliminação do patógeno pelo exame direto de inclusões em plaquetas e em ensaios de PCR. Quando o tratamento com doxiciclina não apresenta resposta rápida e os sinais clínicos persistem, se faz necessário reavaliar o animal para outras doenças infecciosas ou patologias com sintomas semelhantes, como neoplasias ou doenças imunomediadas (SAINZ *et al.*, 2015). Uma atualização sobre anaplasmoze ratifica o uso da doxiciclina (5 mg/kg VO a cada 12 h por 28 dias ou 10 mg/kg VO a cada 24 h, por 28 dias) como terapia de primeira escolha. Esse regime terapêutico tem se mostrado efetivo na eliminação do patógeno do sangue em um período de quatro semanas, tanto em casos agudos quanto subclínicos (DINIZ; AGUIAR, 2022).

Em um ensaio sobre protocolos de tratamento com doxiciclina (10 mg/kg VO SID 28 dias) ou imidocarb (5 mg/kg SC BID 14 dias de intervalo) em cães infectados com *A. platys*, foi demonstrado a eficácia do tratamento de um cão que apresentava coinfeção com *E. canis* e *Babesia* spp. com doxiciclina associada com dipropionato de imidocarb (SAINZ *et al.*, 2000).

Além da doxiciclina, existem outros antibióticos pertencentes à classe das tetraciclinas que também são eficazes no tratamento da anaplasmoze, incluindo minociclina e oxitetraciclina. Minociclina (cães: 5–10 mg/kg VO a cada 12 h por 28 dias) quando a doxiciclina não estiver

disponível. Já a oxitetraciclina (7.5–10 mg/kg IV a cada 12 h por 28 dias) é usada quando os antibióticos causam sinais gastrointestinais (DINIZ; AGUIAR, 2022).

4.1.11 Prognóstico

Quando os cães são tratados na fase aguda da anaplasmosse, observa-se uma melhora dentro de 24 48 horas, e o prognóstico é bom quando todo o curso da terapia é administrado para alcançar a cura (SAINZ *et al.*, 2015). Além disso, a trombocitopenia desaparece após uma semana mais ou menos (CHANG; SU; PAN, 1997). Em relação aos títulos de anticorpos, foi observado que eles diminuem consistentemente após a terapia a terapia em cães infectados experimentalmente com *A. platys* (GAUNT *et al.*, 2010). O prognóstico é reservado quando presente TCIC com coinfeções de DTCs, além de trauma e cirurgias. Nessas situações, a gravidade da condição subjacente pode influenciar o prognóstico e requer cuidados adicionais por parte do médico veterinário (DINIZ; AGUIAR, 2022).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Diretrizes éticas

Este estudo concorda com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UESC), regulamentado com o protocolo de número 004/21.

5.2 Local do estudo

O estudo é do tipo observacional transversal feito no município de Porto Seguro situado na região Extremo Sul da Bahia (Latitude $-16^{\circ}27'04''$ S e Longitude $-39^{\circ}03'53''$ W). Região caracterizada pelo clima tropical com temperatura média de 25°C e pluviosidade anual variando entre 1.100 e 2.000 mm. Porto Seguro pertence ao bioma Mata Atlântica. A população estimada é de 152.529 habitantes em uma área total de 2.285,734 km^2 , com densidade de 52,70 habitantes/ km^2 (Figura 2) (IBGE, 2021). Em relação as nove localidades no município, são elas: Porto Seguro – sede, Trancoso, Arraial D’Ajuda, Vale Verde, Caraíva, Vera Cruz, Pindorama, Agrovila e Imbiruçu. Porto Seguro – sede é considerado urbana e as demais localidades são consideradas zona rural do município.

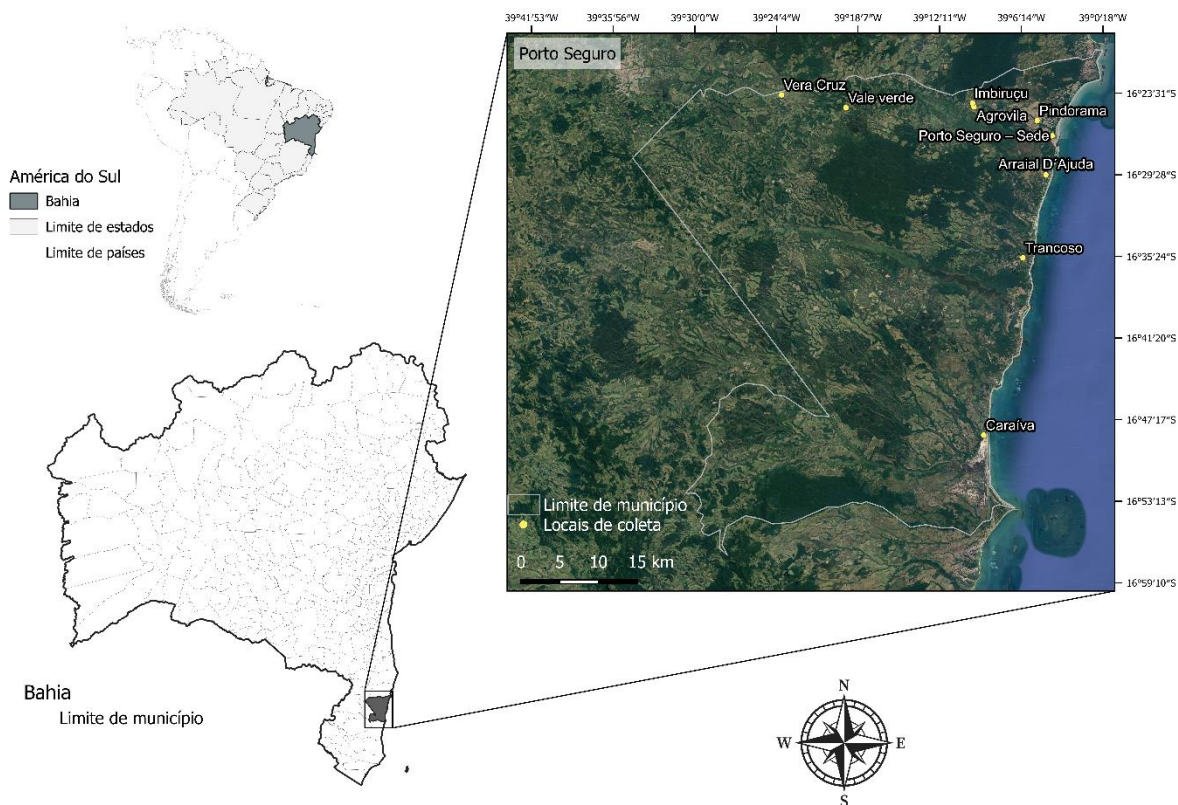


Figura 2 - Mapa do município de Porto Seguro, Bahia, indicando os locais selecionados para amostragem de cães hígidos.

Fonte: Arquivo Pessoal

5.3 População amostral

Durante o período de março a novembro de 2017, foram realizadas coletadas amostras de sangue de 396 cães domiciliados, hípidos e com idade acima de seis meses no município de Porto Seguro. Com base nos dados da vigilância epidemiológica do município de Porto Seguro (campanha de vacinação antirrábica 2016), estima-se que a população canina do município seja de 16.240 cães, dos quais 11.983 pertencem à zona urbana e 4.257 a zona rural. O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando-se o software Epi Info 3.5.3TM, considerando o tamanho da população canina de Porto Seguro como sendo 10% da população humana no município (CIFUENTES, 1988), uma taxa de prevalência de 50%, com intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5%. As coletas foram realizadas por conveniência, porém para evitar vies, foram feitas por estratos envolvendo os cães da zona rural e urbana, proporcionalmente a população de cada distrito. A zona urbana é considerada Porto Seguro (sede) e zona rural os demais distritos. Foram coletadas 225 amostras em Porto Seguro, 63 em Trancoso, 46 em Arraial D’Ajuda, 17 em Agrovila, 16 em Pindorama, 14 em Vera Cruz, nove em Imbiruçu, quatro em Vale Verde e duas em Caraíva.

5.4 Coleta de dados, anamneses e exame clínico dos animais

Para análise dos fatores de riscos, realizou-se a coleta de informações referentes à identificação do animal (nome, idade, sexo e raça); foram registradas características do local onde residem; histórico do animal: presença de carrapatos (sim/não), uso de ectoparasiticida (sim/não), acompanhamento veterinário (sim/não); estilo de vida do animal: acesso à rua (sim/não), hábito domiciliar (sim/não), dorme dentro de casa (sim/não); e contactantes (sim/não). Essas informações foram obtidas por entrevista semiestruturada realizada com os tutores dos animais (APÊNDICE A). As informações foram coletadas pelo mesmo entrevistador, um médico veterinário. Após a colheita de sangue, prosseguiu-se exame físico dos animais.

5.5 Obtenção de amostras biológicas

Após contenção física dos animais, foi realizada a tricotomia no local de coleta de sangue, a saber veia cefálica ou jugular. Foram obtidos 3 mL de sangue em tubos siliconizado com EDTA

e 2 mL em tubo sem adição de anticoagulante. Essas amostras foram armazenadas em recipientes isotérmicos com gelo reciclável a temperatura entre 2°C a 8°C para serem encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas.

5.6 Processamento e análise das amostras

5.6.1 Hemograma

As amostras sanguíneas foram analisadas em até 8 horas, utilizando o Contador Hematológico URIT 3000 PLUS Veterinário™ para avaliar eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A análise da série vermelha incluiu Contagem de eritrócitos (He), concentração de Hemoglobina (Hb), Hematócrito (HT), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). A série branca foi analisada através da contagem total de leucócitos (CTL) e do diferencial leucocitário. Os esfregaços de sangue foram preparados e corados com Panótico Rápido para realizar o diferencial leucocitário (Neutrófilos, Eosinófilos, Linfócitos e Monócitos), além da observação morfológica das células sanguíneas e pesquisa de hemoparasitas. Além disso, foram realizadas as contagens estimadas de plaquetas pela observação de 10 campos aleatórios em área de monocamada do esfregaço sanguíneo. Para isso, foi utilizada a objetiva de 1000X em óleo de imersão e após a contagem do número médio de plaquetas por campo, o resultado foi multiplicado por 20.000. As Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) foram determinadas por refratometria. Os valores de referência utilizados para o hemograma foram os recomendados por Jain (1993).

5.6.2 Bioquímica sérica

Os níveis séricos de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA) foram determinados a partir de amostras de soro coletadas sem anticoagulante. A bioquímica sérica foi realizada usando kits comerciais e lidos em um analisador bioquímico semiautomático Bioclin® BA88. Os valores de referência para os testes bioquímicos de avaliação renal e hepática são os recomendados por Kaneko; Harvey; Bruss (1997).

5.7 Extração de DNA

Aproximadamente 1 mL de cada amostra com EDTA foi armazenada a -20°C para a extração do DNA e realização de reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*-PCR para

investigação de hemoparasitas. O DNA foi extraído do sangue total usando o kit comercial PureLink® Genomic DNA (Invitrogen™), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi mantido a -20 °C até a realização das PCRs.

5.7.1 Quantificação e pureza do DNA

Após a extração, as amostras de DNA foram analisadas quanto à sua quantidade e pureza (relação 260/280 nm) em um aparelho de espectrofotometria (NanoDrop 2000/c - Thermo Scientific®, USA), usando água ultrapura como branco.

5.7.2 *Nested*-PCR para detecção de DNA de *Anaplasma platys*

Para a amplificação do DNA de *A. platys*, foi realizada uma *nested*-PCR. Na primeira reação, foram usados os *primers* 8-F (5'-AGT TTG ATC ATG GCT CAG-3') e 1448-R (5'-CCA TGG CGT GAC GGG CAG TGT-3'), que amplificam parte do gene 16S rRNA. Na segunda reação, os *primers* PLATYS-F (5'-GAT TTT TGT CGT AGC TTG CTA TG-3') e EHR16S-R (5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3') foram usados para amplificar um produto de 678 pares de bases (pb) conforme a metodologia descrita por Martin *et al.* (2005).

O preparo da mistura de reagentes para a execução da técnica de *nested*-PCR, assim como a programação para os ciclos de temperatura do termociclador foram adaptados e realizados conforme protocolo descrito por Ramos *et al.* (2009).

Cada mistura de reação foi preparada para um volume final de 25 µL e continha 0,2 mM de cada dNTP, 10 X PCR Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 11 pmol de cada *primer* (Tabela 3), 1,5 U de Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen™), 5 µL de DNA purificado e água ultrapura até completar o volume final. Nas reações de *nested*-PCR, os reagentes foram utilizados nas mesmas concentrações e volumes utilizados na primeira reação, exceto o DNA (produto amplificado da primeira reação), o qual foi adicionado no volume de 1 µL por reação, em um volume final de 25 µL. As condições termocíclicas foram as seguintes: uma desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 40 segundos, e uma extensão final de 72°C por 4 minutos. Para a segunda reação, a desnaturação inicial foi realizada por 1 minuto a 94°C, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos da *nested*-PCR foram submetidos

à eletroforese em gel de agarose 2% contendo SYBER™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™). Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Após confirmação de mórula de *A. platys* em esfregaço sanguíneo, a amostra sanguínea devidamente identificada foi utilizada como controle positivo.

5.7.3 PCR do GAPDH: Avaliação da integridade do DNA

As amostras negativas na *nested*-PCR para detecção de DNA de *A. platys* foram submetidas a uma PCR convencional para identificação do gene da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) para avaliar a qualidade do DNA e reduzir o número de resultados falsos negativos devido à presença de inibidores da PCR. Foi utilizado os *primers* GAPDH-F (5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T-3') e GAPDH-R (5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATGACC-3'), que são sequências encontradas em todos os mamíferos que anelam em uma sequência específica do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), resultando em um produto amplificado de 400 pb (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003). A mistura de reagentes e condições termocíclicas foram adaptadas e realizadas conforme o protocolo descrito por Sousa *et al.* (2017).

A PCR foi realizada com 2,5 µL da amostra de DNA em 25 µL de mistura de reação, e continha 0,2 mM de cada dNTP, 10 X PCR Buffer, 2 mM de MgCl₂, 1 µM de cada *primer*, 1,25 U de Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen™) e água ultrapura até completar o volume final. As amostras que apresentaram bandas de 400 pb foram consideradas positivas, indicando que o DNA estava em quantidade e qualidade suficientes, e livres de inibidores de PCR. As condições termocíclicas foram: desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguidos por 3 minutos a 94°C com 40 ciclos de desnaturação, depois anelamento a 52°C por 1 minuto, 72°C por mim para extensão, e 72°C por 5 minutos para extensão final.

As sequências dos *primers* utilizados nas reações de PCR e *nested*-PCR, o tamanho dos produtos da PCR e as referências utilizadas para cada patógeno alvo estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição das sequências de oligonucleotídeos, tamanho dos produtos da PCR e referências utilizadas para detecção de *Anaplasma platys* e GAPDH

Primers (5'-3')	Alvo	Amplicons (pb)	Referências
8-F-5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3'	<i>A. platys</i>	-	(Martin <i>et al.</i> , (2005)
1448-R-5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGT-3'			

PLATYS-F -5'-GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG-3'	<i>A. platys</i>	678	(Martin <i>et al.</i> , (2005)
EHR16S-R -5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'			
GAPDH-F -5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3'	GAPDH	400	Birkenheuer; Levy; Breitschwerdt (2003)
GAPDH-R 5' -CCAAAGTTGTCATGGGATGACC-3'			

5.8 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os *amplicons* obtidos pela *nested*-PCR e GAPDH foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em solução UltraPure™ DNA Typing Grade e adicionado SYBER™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™) em ambiente com pouca luz. Foi utilizado o volume de 10 µL de cada *amplicon* (DNA amplificado) que foi homogeneizado com 2 µL de azul de bromofenol e adicionado a cada poço do gel de agarose. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese com uma potência de 60v e 200mA por 50 minutos para *A. platys* e de 75v, 150 mA, por 40 minutos para GAPDH. Foi utilizado marcador de peso molecular de 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen™) para determinar do tamanho dos produtos amplificados. As leituras foram realizadas em um fotodocumentador para gel de eletroforese L-PIX EX (Loccus®) e as amostras foram consideradas positivas ao amplificar na altura de banda do controle positivo, conforme descrito (Tabela 3).

5.9 Análise estatística

Os dados de hemograma completo, leucograma e bioquímica sérica dos animais positivos e negativos para *A. platys* foram submetidos ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* para confirmação da normalidade. Se a distribuição dos dados foi homogênea, o teste *t* de *Student* foi aplicado. Se houve desigualdade na distribuição, o teste de *Mann-Whitney* foi utilizado. Na presença ou ausência de anemia, trombocitopenia e leucopenia também foram avaliadas em relação à infecção por *A. platys* através do teste qui-quadrado com Correção de *Yates*.

Os resultados da *nested*-PCR para *A. platys* e os dados obtidos na entrevista semiestruturada foram tabulados e analisados através do programa estatístico EPI INFO versão 7.2.5.0™. A chance de ocorrência (*Odds Ratio* – OR) da análise bivariada foi calculada com medidas de associação e intervalos de confiança de 95%. As variáveis com plausibilidade biológica foram submetidas à correlação de *Spearman* para determinação da colinearidade ($p < 0,8$), através do programa estatístico Bioestat 5.0® e, em seguida, compuseram o modelo preliminar da regressão logística não condicional. O modelo final foi construído através da entrada e saída das variáveis (sistema *backward*).

6 RESULTADOS

6.1 Diagnóstico molecular

Neste estudo, foi encontrada uma frequência de infecção por *Anaplasma platys* de 38,4% (153/396) entre as amostras analisadas. A Figura 3 apresenta os resultados da amplificação do DNA de *A. platys* utilizando a *nested-PCR*. Todas as amostras negativas para *A. platys* apresentaram um produto amplificado de 400 pb na PCR convencional do GAPDH, indicando que a extração do DNA nas amostras de sangue foi adequada.

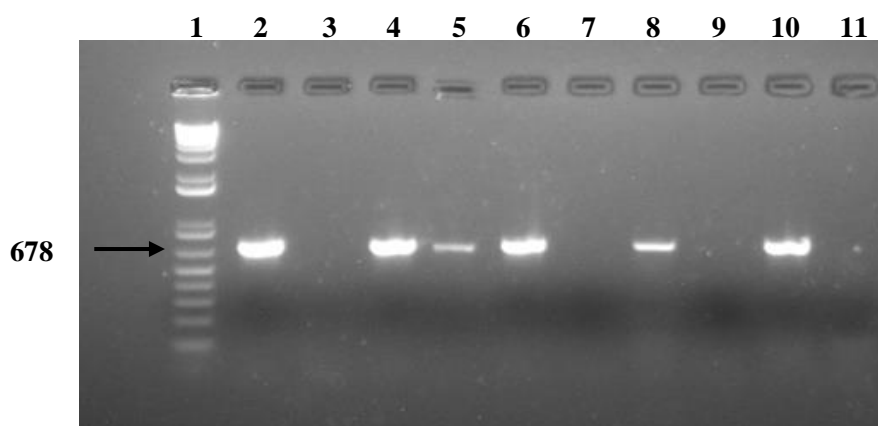


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 2%. Resultado da *nested-PCR* para *A. platys* apresentando um produto de 678pb. Canaleta 1: marcador de peso molecular de 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen®); Canaleta 2: controle positivo, Canaleta 3: negativo (água ultrapura); Canaleta 4-6,8 e 10 amostras positivas; Caneletas 7, 9 e 11 amostras negativas.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, todos os distritos do município apresentaram animais positivos, com uma positividade para *A. platys* variando de 25 a 52,17% (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência dos animais portadores da infecção por *Anaplasma platys* de acordo a localidade em Porto Seguro, BA

LOCALIDADE	FREQUÊNCIA
Porto Seguro - Sede	38,67% (87/225)
Trancoso	30,16% (19/63)
Arraial D'Ajuda	52,17% (24/46)
Agrovila	35,29% (6/17)
Pindorama	25% (4/16)
Vera Cruz	35,71% (5/14)
Imbiruçu	33,33% (3/9)
Vale verde	100% (4/4)
Caraíva	50% (1/2)

6.2 Achados laboratoriais

No hemograma, observou-se uma diminuição significativa nos valores do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume globular nos animais infectados em comparação ao grupo não infectado (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios e desvio padrão dos valores hematológicos de cães naturalmente infectados e não infectados, por *Anaplasma platys* no Município de Porto Seguro, BA

Parâmetros	Animais infectados	Animais não infectados	Valores de referência ¹	Valor de <i>p</i>
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	6,15 (± 1,25)	6,50 (± 1,31)	5,5 – 8,5	0,01*
Hemoglobina (g/dL)	13,60 (± 2,94)	14,40 (± 3,04)	12 – 18	0,01*
Volume globular (%)	40,43 (± 9,42)	43 (± 10,35)	37 – 55	0,01*
VCM (fl)	65,26 (± 4,37)	65,55 (± 4,61)	60 – 77	0,57
CHCM (g/dL)	33,77 (± 1,81)	33,66 (± 2,35)	32 – 36	0,59
PPT (g/dL)	7,80 (± 4,68)	7,40 (± 1,26)	6,0 – 8,0	0,69
Plaquetas (x10 ³ /μL)	181 (± 122)	198 (±117)	200.000 – 500.000	0,15
Leucócitos (/μL)	14.205 (± 5.955)	13.388 (± 4.617)	6.000 – 17.000	0,65
Neutrófilos Segmentados (%)	57,76 (± 13,96)	59,51 (± 15,86)	60 – 77%	0,76
Neutrófilos Segmentados (/μL)	8.172 (± 4.047)	7.723 (± 3.2677)	3.000 – 11.500	0,29
Linfócitos (%)	26,66 (± 13)	25,56 (± 14,18)	12 – 30%	0,44
Linfócitos (/μL)	3.768 (± 2.537)	3.493 (± 2.523)	1.000 – 4.800	0,29
Monócitos (%)	5,73 (± 3,96)	5,36 (± 3,15)	3 – 10 %	0,68
Monócitos (/μL)	8.059 (± 7.261)	7.109 (± 4.862)	150 – 1.350	0,41
Eosinófilos (%)	9,55 (± 7,26)	9,86 (± 7,51)	2 – 10%	0,68
Eosinófilos (/μL)	1.419 (± 1.368)	1.400 (± 1.298)	100 – 1.250	0,89

¹Valores de referência: Jain (1993). VCM = Volume Corpuscular Médio; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; PPT = Proteínas Plasmáticas Totais. * *p* < 0,05.

Os resultados das análises bioquímicas séricas dos animais estão descritos na Tabela 6. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros bioquímicos entre os animais positivos e negativos para *A. platys*.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão das análises bioquímicas de cães naturalmente infectados e não infectados, por *Anaplasma platys* no Município de Porto Seguro, BA

Parâmetros	Animais infectados	Animais não infectados	Valores de referência ¹	Valor de <i>p</i>
Ureia (mg/dL)	36,32 (± 15,12)	36,35(± 14,97)	21,4 – 59,9	0,98
Creatinina (mg/dL)	1,10 (± 0,27)	1,02 (± 0,25)	0,5 – 1,5	0,31
ALT (UI/L)	48,10 (± 65)	40,30 (± 30,01)	21 – 73	0,93
AST (UI/L)	39,15 (± 40,34)	36 (± 28,99)	21 – 45	0,91
FA (UI/L)	68,84 (± 124,57)	60,64 (± 57,57)	20 – 156	0,64

¹Valor de referência: Kaneko, Harvey e Bruss (1997). ALT = alanina aminotransferase, AST= aspartato aminotransferase, FA =fosfatase alcalina.

A Tabela 7 apresenta os resultados da análise bivariadas entre variáveis “Tem Anemia”, “Tem Leucopenia” e “Tem Trombocitopenia”. Os dados mostram que não houve associação significativa entre a infecção por *A. platys* e as três variáveis.

Tabela 7 – Análise bivariada das variáveis “Tem anemia”, “Tem Leucopenia” e “Tem Trombocitopenia” associados à infecção por *Anaplasma platys* em cães naturalmente infectados no município de Porto Seguro, BA

VARIÁVEIS	<i>Anaplasma platys</i>				Odds Ratio IC 95%	valor de <i>p</i>
	POSITIVOS		NEGATIVOS			
	N	%	N	%		
Tem anemia						
Sim	49	42,61	66	57,39	1,3 (0,8 – 2,0)	0,40
Não	104	37,01	177	62,99		
Tem leucopenia						
Sim	8	80	2	20	0,4 (0,1 – 1,9)	0,40
Não	151	39,12	235	60,88		
Tem trombocitopenia						
Sim	92	43,19	121	56,81	1,5 (1,0 – 2,3)	0,06
Não	61	33,33	122	66,67		

IC= Intervalo de confiança, N= Número de animais.

6.3 Fatores associados

As análises bivariadas entre as variáveis de exposição, com base nas variáveis de exposição (plausibilidade biológica) e o desfecho (positivo/negativo para *A. platys*), utilizadas neste estudo, são apresentadas na Tabela 8. As variáveis “acesso à rua” e “mora em zona urbana” demonstraram uma relação significativa com a infecção por *A. platys*, com uma redução de chances de ocorrência de 0,5 para ambas as variáveis.

Tabela 8 - Fatores com plausibilidade biológica associados à infecção por *Anaplasma platys* em cães naturalmente infectados no município de Porto Seguro, BA

VARIÁVEIS	<i>Anaplasma platys</i>				<i>Odds Ratio</i>	
	POSITIVOS		NEGATIVOS		IC (95%)	Valor de <i>p</i>
	N	%	N	%		
Acesso à rua						
Sim	40	29,20	97	70,80	0,5 (0,3-0,8)	0,01*
Não	113	43,63	146	56,37		
Idade > 1 ano						
Sim	26	41,94	36	58,06	1,2 (0,7-2,0)	0,66
Não	127	38,02	207	61,98		
Cães contactantes						
Sim	96	40,17	143	59,83	1,18 (0,77-1,77)	0,51
Não	57	36,31	100	63,69		
Mora próximo a área desmatada						
Sim	35	38,89	55	61,11	1,0 (0,6-1,6)	1,00
Não	118	38,69	187	61,31		
Dorme dentro de casa						
Sim	49	32,89	100	67,11	0,7 (0,4-1,0)	0,09
Não	104	42,11	143	57,89		
Possui hábito Domiciliar						
Sim	112	37,46	187	62,54	0,8 (0,5-1,3)	0,47
Não	41	42,27	56	57,73		
Ectoparasita						
Sim	63	40,13	94	59,87	1,1 (0,7-1,7)	0,7
Não	90	37,66	149	62,34		
Área de mata						
Sim	97	39,92	146	60,08	1,1 (0,7-1,7)	0,61
Não	56	36,84	96	63,16		
Tem raça definida						
Sim	43	36,75	74	63,25	0,9 (0,6-1,4)	0,70
Não	110	39,43	169	60,57		
Sexo						
Macho	72	38,50	115	61,50	1,0 (0,7-1,5)	1,0
Fêmea	81	38,76	128	61,24		
Ectoparasiticida						
Sim	10	35,71	18	64,29	0,9 (0,4-1,9)	0,90
Não	143	38,86	225	61,14		
Acompanhamento Veterinário						
Sim	73	34,43	139	65,57	0,7 (0,5-1,0)	0,08
Não	80	43,48	104	56,52		
Zona Urbana						
Sim	71	31,84	152	68,16	0,5 (0,3-0,8)	0,01*
Não	82	47,40	91	52,60		

IC= Intervalo de confiança, N= Número de animais. * $p < 0,05$.

Nenhuma das variáveis de exposição apresentou colinearidade, portanto todas foram incluídas no modelo preliminar da regressão logística não-condicional para *A. platys* (Tabela 9).

Tabela 9 - Modelo preliminar da regressão logística não-condicional dos fatores associados à infecção por *Anaplasma platys* em cães em Porto Seguro, BA

Variáveis	Chance de ocorrer	IC (95%)	Valor de <i>p</i>
Acesso à rua	0,57	0,40 - 0,91	0,02*
Idade > 1 ano	1,04	0,60 - 1,90	0,90
Cães contactantes	0,98	0,63 - 1,50	0,90
Mora próximo a área desmatada	1,04	0,61 - 1,80	0,90
Dorme dentro de casa	0,80	0,50 - 1,28	0,33
Carrapatos	0,97	0,61 - 1,51	0,90
Possui hábito domiciliar	0,91	0,60 - 1,50	0,72
Área de mata	0,98	0,60 - 1,61	0,94
Ectoparasiticida	0,91	0,40 - 2,16	0,82
Tem raça definida	1,02	0,63 - 1,64	0,92
Sexo	0,96	0,62 - 1,50	0,84
Acompanhamento Veterinário	0,80	0,50 - 1,26	0,33
Zona Urbana	0,50	0,32 - 0,80	0,02*

$p < 0,001$ Likelihood = 0,0605. IC= Intervalo de confiança. * $p < 0,05$.

No modelo final (Tabela 10), as variáveis “acesso à rua” e “mora em zona urbana” foram identificadas como fatores de proteção.

Tabela 10 - Modelo final da regressão logística não-condicional dos fatores associados à infecção por *Anaplasma platys* em cães em Porto Seguro, BA

Variáveis	Chance de ocorrer	IC (95%)	Valor de <i>p</i>
Acesso à rua	0,51	(0,33 - 0,80)	0,001*
Mora em zona urbana	0,60	(0,33 - 0,76)	0,001*

$p < 0,001$ Likelihood = 0,0001. IC= Intervalo de confiança. * $p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

A partir dos resultados encontrados em nosso estudo, observa-se uma elevada frequência do patógeno zoonótico *A. platys* nos cães localizados em Porto Seguro, uma cidade turística com clima tropical. Este é o primeiro estudo de frequência para *A. platys* no Extremo Sul da Bahia, no qual foram realizadas associações hematológicas, bioquímicas e investigação dos fatores associados a infecção por esta bactéria. Destaca-se a utilização da técnica de *nested*-PCR, que contribuiu para uma maior sensibilidade na detecção de DNA de *A. platys*. A frequência encontrada no estudo pode estar associada à temperatura média anual acima de 20 °C na região de Porto Seguro, favorecendo o desenvolvimento do ciclo de vida do carrapato e, conseqüentemente, a manutenção da bactéria e sua transmissão pelo repasto sanguíneo em cães (MORAES-FILHO *et al.*, 2011; ZEMTSOVA *et al.*, 2016; AKTAS; OZUBEK, 2018).

A elevada frequência de infecção por *A. platys* em nosso estudo é corroborado por Ribeiro *et al.* (2017), que observaram uma frequência de 32,9% (60/182) de cães infectados no estado do Paraná. No entanto, é importante ressaltar que eles utilizaram a técnica de PCR convencional, a qual é menos sensível do que a utilizada em nosso estudo. Além disso, Ribeiro *et al.* (2017), utilizaram animais de ONGs selecionados durante o período de inverno, o qual inibe o comportamento de emboscada do vetor, reduzindo as chances de novas infecções. Isso contrasta com nossa pesquisa na utilização de animais saudáveis selecionados durante março a novembro, embora bioma de ambos os locais sejam semelhantes. Com isso, sugere-se que Porto Seguro é uma região endêmica para esta doença.

Em relação ao mesmo bioma, foram relatadas frequências elevadas de cães infectados com *A. platys* nos estudos de Ramos *et al.* (2009) e Ramos *et al.* (2010), com 55% (55/100) e 48,8% (100/205), respectivamente. Conforme nosso estudo, ambos utilizaram a mesma técnica *nested*-PCR, adotaram uma amostragem por conveniência com ampla faixa etária, analisaram ambos os sexos e sem restrições de raças. No entanto, há diferenças no perfil da população estudada que podem influenciar nas frequências encontradas. Nesses estudos, foram selecionados cães clinicamente suspeitos de hemoparasitoses atendidos em hospitais veterinários na cidade de Recife (PE). Essa seleção pode ter contribuído para uma maior detecção de casos positivos para *A. platys*, em comparação com nosso estudo.

No presente estudo foi observado que os cães localizados em zona urbana de Porto Seguro apresentaram um fator de proteção significativo ($p=0,001$) em relação à infecção por *A. platys*.

Costa-Júnior *et al.* (2013) relataram maiores frequências de infecções por *A. platys* em áreas rurais, em comparação com áreas urbanas, em um estudo realizado em Belo Horizonte. Os autores também observaram maiores infestações e incidência de *R. sanguineus* s.l. em áreas rurais. Com isso, nossos resultados sugere a participação de outros carrapatos vetores na baixa transmissão de anaplasmoses em zona urbana em comparação com área rural. Outra pesquisa também sugeriu participação de outro carrapato vetor ao não encontrar *R. sanguineus* s.l. em área urbana (Ribeiro *et al.* 2017).

Neste estudo, também identificamos o “acesso à rua” como fator de proteção ($p=0,003$). Isso indica que o grupo com “acesso à rua” teve menos exposição aos carrapatos infectados em comparação ao grupo sem “acesso à rua”. Embora haja poucos estudos sobre os fatores de risco relacionados a infecção de *A. platys* e “acesso à rua”, outros autores, como Silva *et al.* (2012) e Silva (2016), não encontraram associação entre essas variáveis. Portanto, é necessário considerar a influência de outros fatores, como variáveis socioeconômicas e ambientais, por trás dos nossos resultados.

Outro achado importante foi a diminuição do número de eritrócitos ($p=0,01$), volume globular ($p=0,01$) e concentração de hemoglobina ($p=0,01$) entre os animais infectados e o grupo não infectado. Embora houvesse diminuição significativa desses parâmetros, os valores permaneceram na faixa de referência. Esses resultados são consistentes com Kelly *et al.* (2013); Lasta *et al.* (2013) e Ribeiro *et al.* (2017). Portanto, cães clinicamente saudáveis com valores próximos ao limite mínimo da referência podem sugerir a presença desta Anaplasmatidae, como um diagnóstico diferencial.

Nas análises deste estudo, foi observado que cães com idade inferior a um ano apresentaram menor exposição ligeira à infecção por *A. platys* quando comparado aos cães mais velhos. Embora não tenha sido observada diferença significativa ($p=0,66$), entre os cães com menos de um ano e acima de um ano, 41,94% infectados e 58,06%, não infectados, respectivamente. Os resultados apontam para uma exposição precoce dessa população jovem ao vetor infectado por *A. platys*, corroborando com a alta endemia nessa região.

Foi observado no hemograma que o número de plaquetas do grupo infectado e não infectado apresentaram uma leve trombocitopenia sem diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos ($p=0,15$). Além disso, na correlação bivariada para variável “Tem trombocitopenia” apresentou valor de $p=0,06$. Talvez uma maior amostragem da população de estudo resultaria na associação direta para a infecção por *A. platys*.

Por fim, a elevada positividade para *A. platys* nos animais com manifestações subclínicas conforme os resultados encontrados, sugere a presença de infecção crônica no período das coletas. Além disso, a estreita relação entre humanos e cães representam um risco zoonótico, pois uma alta frequência de infecção nessa população permite a infecção por novos vetores. Isso contribui para a manutenção deste patógeno, sendo que os cães estão atuando como sentinelas.

8 CONCLUSÃO

Este estudo pioneiro no estado da Bahia revela alta frequência de infecção por *A. platys* em cães no Nordeste do Brasil. Identificamos a zona urbana e acesso a rua como fatores de proteção. Além disso, os animais infectados apresentaram discretas alterações hematológicas que permaneceram dentro dos intervalos de referência, e em conjunto possuem uma tendência trombocitopênica. Esse achado é importante no diagnóstico diferencial de hemoparasitoses. Portanto, recomenda-se a implementação de políticas públicas para educação sobre cuidados profiláticos e mais pesquisas epidemiológicas para melhor compreensão do vetor na dinâmica e controle de *A. platys* na região Nordeste.

REFERÊNCIAS

- ANDRÉ, M. R.; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; ZANATTO, D. C. de S.; HORTA, B. de C. L. S.; TASSO, J. B.; DE SOUZA RAMOS, I. A.; DE MELLO, V. V. C.; MACHADO, R. Z. The co-infection with Ehrlichia minasensis, Anaplasma marginale and Anaplasma platys is not associated with anemia in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, p. 100437, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100437>
- ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. Fine structural characterisation of a Rickettsia-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 991–997, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1099/00222615-48-11-991>
- ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. Ehrlichia platys (Anaplasma platys) in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An Ultrastructural Study of Experimental and Natural Infections. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 2, p. 149–156, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.40-2-149>
- ATIF, F. A.; MEHNAZ, S.; QAMAR, M. F.; ROHEEN, T.; SAJID, M. S.; EHTISHAM-UL-HAQUE, S.; KASHIF, M.; BEN SAID, M. Epidemiology, Diagnosis, and Control of Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia and Granulocytic Anaplasmosis: Emerging Diseases of Veterinary and Public Health Significance. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 12, p. 312, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci8120312>
- BACKUS, L. H.; LÓPEZ PÉREZ, A. M.; FOLEY, J. E. Effect of Temperature on Host Preference in Two Lineages of the Brown Dog Tick, Rhipicephalus sanguineus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 6, p. 2305–2311, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1376>
- BAKER, D.; SIMPSON, M.; GAUNT, S.; CORSTVET, R. Acute Ehrlichia platys infection in the dog. **Veterinary pathology**, v. 24, n. 5, p. 449–453, 1987.
- BEN SAID, M.; BELKAHIA, H.; MESSADI, L. Anaplasma spp. in North Africa: A review on molecular epidemiology, associated risk factors and genetic characteristics. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 543–555, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.003>
- BERGGOETZ, M.; SCHMID, M.; STON, D.; WYSS, V.; CHEVILLON, C.; PRETORIUS, A.-M.; GERN, L. Protozoan and bacterial pathogens in tick salivary glands in wild and domestic animal environments in South Africa. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 2, p. 176–185, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.10.003>
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni (Asian Genotype) and B. canis DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>

BOUZOURAA, T.; RENÉ-MARTELLET, M.; CHÊNE, J.; ATTIPA, C.; LEBERT, I.; CHALVET-MONFRAY, K.; CADORÉ, J.-L.; HALOS, L.; CHABANNE, L. Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1256–1264, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.004>

BRANDÃO, V. M. D.; BARROZO, P. H. M.; SOUSA, L. O.; SANTOS, R. C. dos; SCHWANKE, K.; SAMPAIO, F. D.; PRADO, W. S.; AMARAL, A. S.; CAVALCANTE, G. G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190414>. Acesso em: 16 jan. 2023.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; QUROLLO, B. A.; SAITO, T. B.; MAGGI, R. G.; BLANTON, L. S.; BOUYER, D. H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 298, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298>

BROPHY, M.; RIEHLE, M. A.; MASTRUD, N.; RAVENSCRAFT, A.; ADAMSON, J. E.; WALKER, K. R. Genetic Variation in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Ticks across Arizona. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 7, p. 4223, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph19074223>

CARDOSO, L.; GILAD, M.; CORTES, H.; NACHUM-BIALA, Y.; LOPES, A.; VILA-VIÇOSA, M.; SIMÕES, M.; RODRIGUES, P. A.; BANETH, G. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 144, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0756-y>

CARVALHO, L.; ARMUA-FERNANDEZ, M. T.; SOSA, N.; FÉLIX, M. L.; VENZAL, J. M. *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 241–245, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.005>

CHANDRASHEKAR, R.; MAINVILLE, C. A.; BEALL, M. J.; O'CONNOR, T.; EBERTS, M. D.; ALLEMAN, A. R.; GAUNT, S. D.; BREITSCHWERDT, E. B. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 12, p. 1443–1450, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.12.1443>

CHANG, W.-L.; SU, W.-L.; PAN, M.-J. Two-Step PCR in the Evaluation of Antibiotic Treatment for *Ehrlichia platys* Infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 9, p. 849–851, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.59.849>

CHOCHLAKIS, D.; IOANNOU, I.; SHARIF, L.; KOKKINI, S.; HRISTOPHI, N.; DIMITRIOU, T.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A. Prevalence of *Anaplasma* sp. in Goats and Sheep in Cyprus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 5, p. 457–463, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0019>

- CICUTTIN, G. L.; TARRAGONA, E. L.; DE SALVO, M. N.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Infection with Ehrlichia canis and Anaplasma platys (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 6, p. 724–729, 2015.
- CORREA, E. S.; PALUDO, G. R.; SCALON, M. C.; MACHADO, J. A.; LIMA, A. C. Q.; PINTO, A. T. B.; THIEBAUT, J. T. L.; ALBERNAZ, A. P. Investigação molecular de Ehrlichia spp. e Anaplasma platys em felinos domésticos: altera es clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 899–909, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011001000011>
- COSTA-JÚNIOR, L. M.; REMBECK, K.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Factors associated with epidemiology of Anaplasma platys in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 3–4, p. 321–326, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.011>
- DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 26, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64–67, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000100012>
- SOUSA, K. C. M.; FERNANDES, M. P.; HERRERA, H. M.; BENEVENUTE, J. L.; SANTOS, F. M.; ROCHA, F. L.; BARRETO, W. T. G.; MACEDO, G. C.; CAMPOS, J. B.; MARTINS, T. F.; OTHERS. Molecular detection of Hepatozoon spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal, Brazil with implications in the transmission route. **Veterinary parasitology**, v. 237, p. 37–46, 2017.
- TOMMASI, A. S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E. B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; DE CAPRARIIS, D. Anaplasma platys in Bone Marrow Megakaryocytes of Young Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2231–2234, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00395-14>
- DEPPERMAN, C.; KUBES, P. Start a fire, kill the bug: The role of platelets in inflammation and infection. **Innate Immunity**, v. 24, n. 6, p. 335–348, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1753425918789255>
- DINIZ, P. P. V.; AGUIAR, D. M. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1225–1266, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.07.002>
- DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Rickettsia bovis, nouvelle espece pathogene pour le boeuf. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 29, p. 1057–1061, 1936.

DU PLESSIS, L.; REYERS, F.; STEVENS, K.; OTHERS. Morphological evidence for infection of impala, *Aepyceros melampus*, platelets by a rickettsia-like organism. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 317–318, 1997.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales : unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and ‘ HGE agent ’ as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 22, 2001. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

DYACHENKO, V.; PANTCHEV, N.; BALZER, H.-J.; MEYERSEN, A.; STRAUBINGER, R. K. First case of Anaplasma platys infection in a dog from Croatia. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 49, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-49>

EDDLESTONE, S. M.; GAUNT, S. D.; NEER, T. M.; BOUDREAUX, C. M.; GILL, A.; HASCHKE, E.; CORSTVET, R. E. PCR detection of Anaplasma platys in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 2, p. 205–210, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.08.006>

EL HAMIANI KHATAT, S.; KACHANI, M.; DUCHATEAU, L.; ELHACHIMI, L.; SAHIBI, H.; DAMINET, S. Anaplasma spp in dogs: Is there a danger for humans? **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 57, n. 1, p. 1–15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anicom.2021.10.001>

FERREIRA, R. F.; CERQUEIRA, A. D. M. F.; PEREIRA, A. M.; VELHO, P. B.; AZEVEDO, R. R. M.; RODRIGUES, I. L. F.; ALMOSNY, N. R. P. [Cross-reaction evaluation of PCR-Anaplasma platys positive dogs tested to Anaplasma phagocytophilum antibodies by commercial ELISA]. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 17 Suppl 1, p. 5–8, 2008.

FERREIRA, R. F.; DE MELLO FIGUEIREDO CERQUEIRA, A.; PEREIRA, A. M.; GUIMARÃES, C. M.; DE SÁ, A. G.; DA SILVA ABREU, F.; MASSARD, C. L.; ALMOSNY, N. P. Anaplasma platys diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 5, n. 3, p. 113, 2007.

FRENCH, T.; HARVEY, J. Canine infectious cyclic thrombocytopenia (Ehrlichia platys infection in dogs). **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**, p. 195–208, 1993.

GAUNT, S.; BEALL, M.; STILLMAN, B.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 33, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-33>

GLAZE, M. B.; GAUNT, S. D. Uveitis associated with Ehrlichia platys infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 8, p. 916–917, 1986.

GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 171–180, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>

GRAY, J. S.; DAUTEL, H.; ESTRADA-PEÑA, A.; KAHL, O.; LINDGREN, E. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1155/2009/593232>. Acesso em: 1 fev. 2023.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v. 141, n. 10, p. 247–250, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.141.10.247>

HARRUS, S.; PERLMAN-AVRAHAMI, A.; MUMCUOGLU, K. Y.; MORICK, D.; EYAL, O.; BANETH, G. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus Midichloria mitochondrii* and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, p. 459–463, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03316.x>

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic Thrombocytopenia Induced by a Rickettsia-Like Agent in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182–188, 1978. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.182>

HEGARTY, B. C.; QUROLLO, B. A.; THOMAS, B.; PARK, K.; CHANDRASHEKAR, R.; BEALL, M. J.; THATCHER, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Serological and molecular analysis of feline vector-borne anaplasmosis and ehrlichiosis using species-specific peptides and PCR. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 320, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0929-8>

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M. J.; ORELLANA, N. G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 211–216, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000300002>

IRWIN, P. J. Companion animal parasitology: a clinical perspective. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, ASP Special, p. 581–593, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00361-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00361-7)

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**, 1993.

JAVKHLAN, G.; ENKHTAIVAN, B.; BAIGAL, B.; MYAGMARSUREN, P.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, B. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks from a forest area of Selenge province, Mongolia. **Western Pacific Surveillance and Response**, v. 5, n. 1, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5365/wpsar.2013.4.3.001>.

JENKINS, A.; KRISTIENSEN, B.-E.; ALLUM, A.-G.; AAKRE, R. K.; STRAND, L.; KLEVELAND, E. J.; VAN DE POL, I.; SCHOULS, L. *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* Ticks from Southern Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3666–3671, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3666-3671.2001>

KAMANI, J.; BANETH, G.; MUMCUOGLU, K. Y.; WAZIRI, N. E.; EYAL, O.; GUTHMANN, Y.; HARRUS, S. Molecular Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens in Dogs and Ticks from Nigeria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. e2108, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002108>

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008.

KELLY, P. J.; XU, C.; LUCAS, H.; LOFTIS, A.; ABETE, J.; ZEOLI, F.; STEVENS, A.; JAEGERSEN, K.; ACKERSON, K.; GESSNER, A.; KALTENBOECK, B.; WANG, C. Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53450, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053450>

KIM, C.-M.; YI, Y.-H.; YU, D.-H.; LEE, M.-J.; CHO, M.-R.; DESAI, A. R.; SHRINGI, S.; KLEIN, T. A.; KIM, H.-C.; SONG, J.-W.; BAEK, L.-J.; CHONG, S.-T.; O'GUINN, M. L.; LEE, J. S.; LEE, I.-Y.; PARK, J.-H.; FOLEY, J.; CHAE, J.-S. Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Ticks and Small Mammals in Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 5766–5776, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00431-06>

KOCAN, K. M.; FUENTE, J. de la; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and Alternatives for Control of Anaplasma marginale Infection in Cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698–712, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>

KORDICK, S.; BREITSCHWERDT, E.; HEGARTY, B.; SOUTHWICK, K.; COLITZ, C.; HANCOCK, S.; BRADLEY, J.; RUMBOUGH, R.; MCPHERSON, J.; MACCORMACK, J. Coinfection with Multiple Tick-Borne Pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2631–2638, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.37.8.2631-2638.1999>

KRAKAUER, T.; BUCKLEY, M. Doxycycline Is Anti-Inflammatory and Inhibits Staphylococcal Exotoxin-Induced Cytokines and Chemokines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3630–3633, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3630-3633.2003>

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS JR, T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; GOMES, A. A. B.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C. R.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F. V.; MORATO, R. L. G.; ALHO, C. J. R.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, n. 1–2, p. 149–163, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-005-2563-1>

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES JR., J. S.; PACHECO, R. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 553–556, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000500007>

LAI, T.-H.; ORELLANA, N. G.; YUASA, Y.; RIKIHISA, Y. Cloning of the Major Outer Membrane Protein Expression Locus in *Anaplasma platys* and Seroreactivity of a Species-Specific Antigen. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 12, p. 2924–2930, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00082-11>

LARA, B.; CONAN, A.; THRALL, M. A.; KETZIS, J. K.; BRANFORD, G. C.; RAJEEV, S. Serologic and Molecular Diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in an Endemic Region. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 488, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9060488>

LASTA, C. S.; SANTOS, A. P. dos; MESSICK, J. B.; OLIVEIRA, S. T.; BIONDO, A. W.; VIEIRA, R. F. da C.; DALMOLIN, M. L.; GONZÁLEZ, F. H. D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 360–366, 2013.

LATROFA, M. S.; DANTAS-TORRES, F.; DE CAPRARIIS, D.; CANTACESSI, C.; CAPELLI, G.; LIA, R. P.; BREITSCHWERDT, E. B.; OTRANTO, D. Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 269, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1545-y>

LESTOQUARD, F. Deuxieme note sur les piroplasmoses du mouton en Algerie. L'Anaplasmose: *Anaplasma ovis* nov. sp. **Bull Soc Path Exot**, v. 17, p. 784–787, 1924.

LI, H.; ZHENG, Y.-C.; MA, L.; JIA, N.; JIANG, B.-G.; JIANG, R.-R.; HUO, Q.-B.; WANG, Y.-W.; LIU, H.-B.; CHU, Y.-L.; SONG, Y.-D.; YAO, N.-N.; SUN, T.; ZENG, F.-Y.; DUMLER, J. S.; JIANG, J.-F.; CAO, W.-C. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 663–670, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70051-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70051-4)

LIMA, M. L. F.; SOARES, P. T.; RAMOS, C. a. N.; ARAÚJO, F. R.; RAMOS, R. a. N.; SOUZA, I. I. F.; FAUSTINO, M. a. G.; ALVES, L. C. A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 381–385, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200019>

LIU, J.; DREXEL, J.; ANDREWS, B.; EBERTS, M.; BREITSCHWERDT, E.; CHANDRASHEKAR, R. Comparative Evaluation of 2 In-Clinic Assays for Vector-Borne Disease Testing in Dogs. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 33, n. 4, p. 114–118, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2018.09.003>

LLANES, A.; RAJEEV, S. First Whole Genome Sequence of *Anaplasma platys*, an Obligate Intracellular Rickettsial Pathogen of Dogs. **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 277, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9040277>

LOULY, C. C.; SOARES, S. F.; SILVEIRA, D. N.; NETO, O. J.; SILVA, A. C.; BORGES, L. M. Differences in the susceptibility of two breeds of dogs, English cocker spaniel and beagle, to *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **International Journal of Acarology**, v. 35, n. 1, p. 25–32, 2009.

- MACIEIRA, D. de B.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. de M. F.; FREIRE, I. M. A.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. de O.; ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of Ehrlichia canis infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 1, p. 44–48, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00008.x>
- MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae and Candidatus Mycoplasma haematoparvum in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 103, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-103>
- MARTIN, A. R.; BROWN, G. K.; HUGH DUNSTAN, R.; ROBERTS, T. K. Anaplasma platys: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 3, p. 176–180, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.11.007>
- MARTINS, T. F.; TEIXEIRA, R. H. F.; SOUZA JR, J. C.; LUZ, H. R.; MONTENEGRO, M. M.; JERUSALINSKY, L.; BUENO, M. G.; ONOFRIO, V. C.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S.; DA SILVA, P. D. J.; BITENCOURTH, K.; BORSOI, A. B. P.; MARQUES, S.; MATTOS JR, M. O.; HERNANDES, L. S. I.; SCOFILD, A.; VIEIRA, R. F. C.; PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; DA SILVA, V. P.; SILVA, P. W.; IGAYARA, C. A.; SANCHES, T. C.; NARDI, M. S.; LUGARINI, C.; MAIA, N. L.; DE SIQUEIRA, C. L. M.; FERREIRA, J. M.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Parasitiformes: Ixodida) on new world wild primates in Brazil. **International Journal of Acarology**, v. 47, n. 2, p. 95–106, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1870554>
- MATEI, I. A.; D'AMICO, G.; YAO, P. K.; IONICĂ, A. M.; KANYARI, P. W. N.; DASKALAKI, A. A.; DUMITRACHE, M. O.; SÁNDOR, A. D.; GHERMAN, C. M.; QABLAN, M.; MODRÝ, D.; MIHALCA, A. D. Molecular detection of Anaplasma platys infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 157, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1443-3>
- MCCOWN, M. E.; ALLEMAN, A.; SAYLER, K. A.; CHANDRASHEKAR, R.; THATCHER, B.; TYRRELL, P.; STILLMAN, B.; BEALL, M.; BARBET, A. F. Point prevalence survey for tick-borne pathogens in military working dogs, shelter animals, and pet populations in northern Colombia. **Journal of special operations medicine: a peer reviewed journal for SOF medical professionals**, v. 14, n. 4, p. 81–85, 2014. DOI: <https://doi.org/10.55460/1VBK-JXC7>
- MELO, A. L. T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12139>
- M'GHIRBI, Y.; GHORBEL, A.; AMOURI, M.; NEBAOUI, A.; HADDAD, S.; BOUATTOUR, A. Clinical, serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. **Parasitology Research**, v. 104, n. 4, p. 767–774, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1253-4>

MOKHTAR, A. S.; LIM, S. F.; TAY, S. T. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Babesia gibsoni* in dogs in Malaysia. **Tropical Biomedicine**, v. 30, n. 2, p. 345–348, 2013.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>

NAIR, A. D. S.; CHENG, C.; GANTA, C. K.; SANDERSON, M. W.; ALLEMAN, A. R.; MUNDERLOH, U. G.; GANTA, R. R. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148239, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148239>

NAVA, S.; BEATI, L.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; PETNEY, T.; SARACHO-BOTTERO, M. N.; TARRAGONA, E. L.; DANTAS-TORRES, F.; SILVA, M. M. S.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PÉÑA, A. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573–1585, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.001>

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 309–315, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02374.x>

ORIÁ, A. P.; PEREIRA, P. M.; LAUS, J. L. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1289–1295, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000400055>

PALMER, G. H. Sir Arnold Theiler and the discovery of anaplasmosis: a centennial perspective. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 76, n. 1, p. 75–79, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4102/ojvr.v76i1.68>

PAPA, A.; TSIOKA, K.; KONTANA, A.; PAPADOPOULOS, C.; GIADINIS, N. Bacterial pathogens and endosymbionts in ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 31–35, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.011>

PAROLA, P.; CORNET, J.-P.; SANOGO, Y. O.; MILLER, R. S.; THIEN, H. V.; GONZALEZ, J.-P.; RAOULT, D.; TELFORD, S. R.; WONGSRICHANALAI, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and Other Eubacteria in Ticks from the Thai-Myanmar Border and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1600–1608, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1600-1608.2003>

PAROLA, P.; SOCOLOVSCHI, C.; JEANJEAN, L.; BITAM, I.; FOURNIER, P.-E.; SOTTO, A.; LABAUGE, P.; RAOULT, D. Warmer Weather Linked to Tick Attack and Emergence of Severe Rickettsioses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, p. e338, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000338>

PASCHOAL, A. T. P.; SILVA, A. C. dos S.; BERNARDES, J. C.; CALDART, E. T.; PINTO-FERREIRA, F.; SOARES, J. F.; MATOS, A. C. de; MORAES, N. R.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O.; MITSUKA-BREGANÓ, R. Molecular detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in a hospital population of dogs clinically diagnosed with hemoparasitosis. **Semina: Ciências Agrárias**, p. 2143–2152, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5supl1p2143>

PEREIRA, A.; PARREIRA, R.; NUNES, M.; CASADINHO, A.; VIEIRA, M. L.; CAMPINO, L.; MAIA, C. Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 251, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1535-0>

PEREIRA, A. S. **Porto Seguro - BA: o cotidiano do trabalhador e a espacialidade da cidade-mercadoria**. 2017. Doutorado em Geografia Humana - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.8.2018.tde-12072018-145823>. Acesso em: 28 abr. 2023.

PÉREZ-MACCHI, S.; PEDROZO, R.; BITTENCOURT, P.; MÜLLER, A. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 62, p. 31–39, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.015>

PRUNEAU, L.; MOUMÈNE, A.; MEYER, D. F.; MARCELINO, I.; LEFRANÇOIS, T.; VACHIÉRY, N. Understanding Anaplasmatataceae pathogenesis using “Omics” approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 86, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00086>

QUROLLO, B. A.; BALAKRISHNAN, N.; CANNON, C. Z.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in a cat diagnosed with splenic plasmacytosis and multiple myeloma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 8, p. 713–720, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X13519632>

RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAÚJO, F. R.; GUEDES JÚNIOR., D. S.; SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. e1, p. 58–62, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4322/rbpv.018e1011>

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1115–1120, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1979-7>

RAMZAN, M.; MURTAZA, G.; ABDUL SATTAR, S.; MUNAWAR, N.; ULLAH, A.; EJAZ, A.; AYAZ, F.; ANWAR, S.; JAMEEL, K.; KAMRAN, F. Techniques for Managing Ticks and Tick-Borne Diseases Under Changing Climate; A review. **Egyptian Academic Journal of**

Biological Sciences, B. Zoology, v. 13, n. 1, p. 117–128, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21608/eajbsz.2021.157728>

RASSOULI, M.; ARDEKANI, A. O.; MOJAVER, M. J.; ROOZBEH, M.; BEIKHA, M.; SANI, S. E. R. Molecular detection of *Anaplasma platys* among camels (*Camelus dromedarius*) in Yazd, Iran. **Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports**, v. 22, p. 100462, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100462>

RIBEIRO, C. M.; MATOS, A. C.; AZZOLINI, T.; BONES, E. R.; WASNIESKI, E. A.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LUCHEIS, S. B.; VIDOTTO, O. Molecular epidemiology of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in stray dogs in Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 129–136, 2017.

ROSENBLATT, J. E.; RELLER, L. B.; WEINSTEIN, M. P. Laboratory Diagnosis of Infections Due to Blood and Tissue Parasites. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 7, p. 1103–1108, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1086/605574>

RUCKSAKEN, R.; MANEERUTTANARUNGROJ, C.; MASWANNA, T.; SUSSADEE, M.; KANBUTRA, P. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine blood smear for the detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* in Buriram Province, Thailand. **Veterinary World**, v. 12, n. 5, p. 700–705, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.700-705>

SACCHI, A.; DUARTE, J.; ANDRÉ, M.; MACHADO, R. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 35, n. 4, p. 325–334, 2012.

SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M. A. Ehrlichia Platys Infection and Disease in Dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 4, p. 382–384, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1177/104063879901100419>

SAINZ, Á.; ROURA, X.; MIRÓ, G.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOHN, B.; HARRUS, S.; SOLANO-GALLEGO, L. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 75, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>

SAINZ, A.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; RODRÍGUEZ, F.; MAZZUCHELLI, F.; RODRÍGUEZ, M. Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 2, p. 134–139, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2000\)014<0134:pcsotp>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2000)014<0134:pcsotp>2.3.co;2)

SANTAMARIA, A.; CALZADA, J. E.; SALDAÑA, A.; YABSLEY, M. J.; GOTTDENKER, N. L. Molecular diagnosis and species identification of Ehrlichia and Anaplasma infections in dogs from Panama, Central America. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 5, p. 368–370, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1488>

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of Ehrlichia canis, Anaplasma platys and Babesia spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145–148, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.017>

SELIM, A.; ALMOHAMMED, H.; ABDELHADY, A.; ALOUFFI, A.; ALSHAMMARI, F. A. Molecular detection and risk factors for Anaplasma platys infection in dogs from Egypt. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 429, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04943-8>

SHAPIRA, L.; SOSKOLNE, W. A.; HOURI, Y.; BARAK, V.; HALABI, A.; STABHOLZ, A. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 825–828, 1996.

SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I. A.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; BELL-SAKYI, L.; SPRONG, H.; VON LOEWENICH, F. D.; OTEO, J. A.; DE LA FUENTE, J.; DUMLER, J. S. Guidelines for the Direct Detection of Anaplasma spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 12–22, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1960>

SILVA, C. B. **Detecção de Anaplasma platys em cães e em carrapatos: padronização de qPCR e análise epidemiológica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil e na região ocidental de Cuba**. 2016. Tese - Tese (Instituto de Veterinária Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/jspui/handle/jspui/2107>. Acesso em: 8 jan. 2023.

SILVA, G. C. F.; BENITEZ, A. do N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C. de; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. Occurrence of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in household dogs from northern Parana. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 379–385, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012005000009>

SILVEIRA, J. A. G.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Population dynamics of Rhipicephalus sanguineus (Latrielle, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3, p. 270–275, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.028>

ŠLAPETA, J.; CHANDRA, S.; HALLIDAY, B. The “tropical lineage” of the brown dog tick Rhipicephalus sanguineus sensu lato identified as Rhipicephalus linnaei (Audouin, 1826). **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 6, p. 431–436, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.02.001>

SNELGROVE, A. N.; KRAPIUNAYA, I.; FORD, S. L.; STANLEY, H. M.; WICKSON, A. G.; HARTZER, K. L.; LEVIN, M. L. Vector competence of Rhipicephalus sanguineus sensu stricto for Anaplasma platys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 6, p. 101517, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101517>

SOARES, R.; RAMOS, C. A.; PEDROSO, T.; BABO-TERRA, V.; CLEVELAND, H.; ARAÚJO, F. D. Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 301–306, 2017.

SOUSA, K. C. M. de; ANDRÉ, M. R.; HERRERA, H. M.; ANDRADE, G. B. de; JUSI, M. M. G.; SANTOS, L. L. dos; BARRETO, W. T. G.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, G. P. de. Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 525–531, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400012>

SPOLIDORIO, M. G.; TORRES, M. de M.; CAMPOS, W. N. S.; MELO, A. L. T.; IGARASHI, M.; AMUDE, A. M.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 253–255, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000300015>

STELLA, A. E.; LÚCIA DIAS DA SILVA, V.; NUNES MOREIRA, C.; ANICETO REZENDE JÚNIOR, S.; ALMEIDA LIMA, D.; SEIGERT SCHIMMUNECH, M. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE CÃES INFECTADOS COM EHRlichia SP E ANAPLASMA SP EM JATAÍ-GO, BRASIL. **Veterinária e Zootecnia**, v. 28, p. 1–11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.35172/rvz.2021.v28.526>

STICH, R. W.; BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; CARPENTER, C.; CORTINAS, M.; EWING, S. A.; FOLEY, D.; FOLEY, J. E.; GAFF, H.; HICKLING, G. J.; LASH, R.; LITTLE, S. E.; LUND, C.; LUND, R.; MATHER, T. N.; NEEDHAM, G. R.; NICHOLSON, W. L.; SHARP, J.; VARELA-STOKES, A.; WANG, D. Quantitative factors proposed to influence the prevalence of canine tick-borne disease agents in the United States. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 417, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-417>

TAMÍ, I. del C.; TAMÍ-MAURY, I. M. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 16, p. 345–349, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1020-49892004001100008>

TAMÍ, I.; JORDÁN, L. Identificación de mórulas de *Ehrlichia* en plaquetas de sangre humana en Venezuela. **Antibiot. infecc**, p. 123–128, 2002.

TATE, C. M.; HOWERTH, E. W.; MEAD, D. G.; DUGAN, V. G.; LUTTRELL, M. P.; SAHORA, A. I.; MUNDERLOH, U. G.; DAVIDSON, W. R.; YABSLEY, M. J. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 0, p. 110–119, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.09.005>

TENG, C.-H.; PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.-F. Cloning and Characterization of an *Ehrlichia canis* Gene Encoding a Protein Localized to the Morula Membrane. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2218, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2218-2225.2003>

THEILER, A. **Anaplasma marginale (gen. and spec. nov.): the marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease.**: Pretoria : Government Printing and Stationary Office, 1910. Technical Report. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/10409>.

THEILER, A. **Further investigations into anaplasmosis of South African cattle.** Pretoria : Government Printer and Stationery Office, 1911. Technical Report. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/11310>.

ULUTAŞ, B.; BAYRAMLI, G.; KARAGENÇ, T. First case of Anaplasma (Ehrlichia) platys infection in a dog in Turkey. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 31, n. 4, p. 279–282, 2007.

VALENTÍN, S.; MORALES, A.; SÁNCHEZ, J. L.; RIVERA, A. Safety and efficacy of doxycycline in the treatment of rosacea. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology: CCID**, v. 2, p. 129, 2009.

WITTER, R.; VECCHI, S. N.; PACHECO, T. dos A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A.; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmosse trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 3811–3822, 2013.

ZEMTSOVA, G. E.; APANASKEVICH, D. A.; REEVES, W. K.; HAHN, M.; SNELLGROVE, A.; LEVIN, M. L. Phylogeography of Rhipicephalus sanguineus sensu lato and its relationships with climatic factors. **Experimental and Applied Acarology**, v. 69, n. 2, p. 191–203, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0035-4>.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Entrevista semiestruturada para identificação dos animais e determinação dos fatores associados à infecção por *Anaplasma platys* em cães.

DATA: ____/____/____

Nº: ____

- Zona urbana
 Zona rural

Local: _____ Bairro: _____

IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO E DA CASA.....

Proprietário: _____

Endereço: _____ Cidade: _____

Telefone residencial: _____ Telefone celular: _____

Possui área de mata próximo de casa? Sim Não

Área de desmatamento recente: Sim Não

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL.....

Nome: _____

Idade: _

Sexo: F M

Raça: _____

Pelagem: _____

HISTÓRICO.....

Possui acesso à rua? Sim Não

Cães Contactantes: Sim Não

Presença de carrapato: Sim Não

Possui hábito domiciliar: Sim Não

Dorme dentro de casa: Sim Não

Uso de ectoparasiticida:

Mora em zona urbana: Sim Não

Acompanhamento Veterinário? Sim Não

ANEXO A – Protocolo de extração do DNA genômico (kit PureLink® Genomic DNA-Invitrogen™)

- 1- Colocar 200µl da amostra de sangue fresco ou congelado em um microtubo estéril;
- 2- Adicionar 20 µl de Proteinase K (fornecido com o Kit) na amostra;
- 3- Adicionar 20 µl de RNase A (fornecido com o Kit) na amostra, misturar bem e vortexizar rapidamente e incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos;
- 4- Adicionar 200 µL de PureLink® Genomic Lysis / Binding Buffer e misturar bem e vortexizar para obter uma solução homogênea;
- 5- Incubar a 55° C durante 10 minutos para promover a digestão das proteínas;
- 6- Adicionar 200 µL de etanol 96-100% ao lisado. Misture bem com vortex por 5 segundos para produzir uma solução homogênea;
- 7- Remover uma coluna de rotação PureLink® em um tubo de coleção da embalagem;
- 8- Adicionar o lisado (~ 640 µL) preparado com PureLink® Genomic Lysis / Binding tampão e etanol para a coluna de rotação PureLink®;
- 9- Centrifugar a coluna a 10.000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente;
- 10- Descartar o tubo de recolha e colocar a coluna de rotação num PureLink® limpo tubo de recolha fornecido com o kit;
- 11- Adicionar 500 µL Wash Buffer 1 preparado com etanol na coluna;
- 12- Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 10.000 x g durante 1 minuto;
- 13- Descartar o tubo de recolha e colocar a coluna de rotação em um tubo de recolha PureLink® limpo, o tubo de recolha fornecido com o kit;
- 14- Adicionar 500 µL Wash Buffer 2 preparado com etanol na coluna;
- 15- Centrifugar a coluna na velocidade máxima por 3 minutos à temperatura ambiente. Descartar o tubo de recolha;
- 16- Colocar a coluna de rotação em um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL;
- 17- Adicionar 25-200 µL de PureLink® Genomic Elution Buffer à coluna;
- 18- Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a coluna em velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente. No tubo contém o DNA genômico.