

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**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**

Claudia Bezerra da Silva

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**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**

CLAUDIA BEZERRA DA SILVA

Sob a orientação do professor

Carlos Luiz Massard

e Co-orientação do professor

Huarrisson Azevedo Santos

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Ciências**, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2016

636.7089692

S586d

T

Silva, Claudia Bezerra da, 1984-

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 / Claudia Bezerra da Silva. - 2016. 109 f.: il.

Orientador: Carlos Luiz Massard.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Cão - Infecções - Teses. 2. Cão - Parasito - Teses. 3. Anaplasrose - Diagnóstico - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 4. Anaplasrose - Diagnóstico - Cuba - Teses. 5. Diagnóstico molecular - Teses. 6. Carrapato como transmissor de doenças - Teses. I. Massard, Carlos Luiz, 1947- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

CLAUDIA BEZERRA DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 11 / 03 / 2016

Dr. Carlos Luiz Massard. UFRRJ
(Orientador)

Dr^a. Irene da Silva Coelho. UFRRJ

Dr. Daniel da Silva Guedes. FIOCRUZ-RJ

Dr. Jairo Dias Barreira. UNIRIO

Dr. Daniel de Barros Macieira. UFF

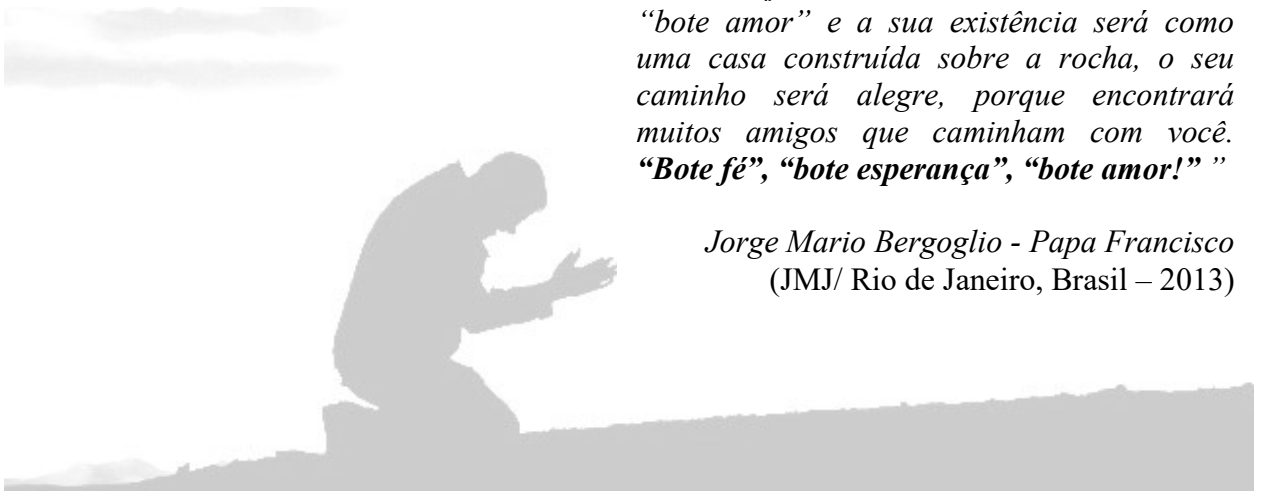
DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus que sempre esteve à frente abrindo meus caminhos e mostrando que há um tempo certo para tudo, e aos meus amados pais Jane Bezerra da Silva e Claudio Severino da Silva, que batalharam muito para que eu e minha irmã tivéssemos as oportunidades que temos hoje. Agradeço em especial a minha irmã e amiga Gláucia Bezerra da Silva e minha avó Diraci Nogueira Bezerra que estiveram sempre ao meu lado me apoiando e vibrando com as minhas conquistas. Amo vocês!

*“Porque quando estou fraco, então sou forte”
(2 Coríntios 12:10)*

*“Queridos jovens: se queremos que nossa vida tenha realmente sentido e plenitude, digo a cada um e a cada uma de vocês: “bote fé” e a vida terá um sabor novo, terá uma bússola que indica a direção; “bote esperança” e todos os seus dias serão iluminados e o seu horizonte já não será escuro, mas luminoso; “bote amor” e a sua existência será como uma casa construída sobre a rocha, o seu caminho será alegre, porque encontrará muitos amigos que caminham com você. **“Bote fé”, “bote esperança”, “bote amor!”**”*

*Jorge Mario Bergoglio - Papa Francisco
(JMJ/ Rio de Janeiro, Brasil – 2013)*



AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me surpreende com seu infinito amor e misericórdia, que me deu força e determinação, sendo meu sustento durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, assim como em todos os momentos de minha vida.

Com carinho, agradeço à minha família, em especial minha mãe Jane Bezerra da Silva, meu pai Claudio Severino da Silva, minha irmã Glaucia Bezerra da Silva, e minha avó Dirací Nogueira Bezerra, que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas, estando presentes com sua dedicação, compreensão, incentivo, orações e amor incondicional.

A Jonas Mendes da Silva, meu noivo, amigo, companheiro, e sempre compreensivo nas fases de estresse e alterações de humor, sempre a disposição nos momentos em que precisei de ajuda e apoio nas minhas decisões.

Ao meu orientador e amigo prof. Dr. Carlos Luiz Massard, “pai científico” que depositou sua confiança em meu trabalho e que defende seus “orientados” como seus próprios filhos. Sinto-me muito honrada em fazer parte dessa família. Um pesquisador brilhante, com conhecimento vasto não só em parasitologia, mas diria que uma enciclopédia sempre a postos. Alguém que tem a vocação e dom para identificar onde podemos caminhar e desenvolver um novo trabalho, uma pesquisa, uma visão de águia no mundo científico, que está sempre se atualizando com o passar do tempo.

Ao meu co-orientador e amigo prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos, que idealizou a padronização do teste diagnóstico descrito nesta tese, e que foi esteio durante todo este doutorado. Uma pessoa extremamente inteligente, e que muito me ajudou nos momentos em que tive dúvidas e dificuldades. Esteve sempre presente e solícito às minhas necessidades, e é uma pessoa desprendida de egoísmos, sempre compartilhando seu conhecimento e com certeza, na torcida para que nós da equipe possamos crescer e evoluir como profissionais.

À equipe do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (LHV/DPA/IV-UFRRJ), que com certeza sem seu apoio não conseguiria dar continuidade aos trabalhos e às escritas dos artigos. Gostaria de agradecer com todo carinho a Marcus Sandes Pires, mais que um companheiro de trabalho, um amigo que sei que posso contar em todas as horas, tanto em aspectos relacionados ao trabalho como na vida, com quem aprendi muito. Agradeço carinhosamente também à Maristela Peckle Peixoto, Renata Lins da Costa, Gabriela Lopes Vivas Vitari e Daniela Coelho, que além de me ajudarem muito, fazem os dias serem mais suaves na rotina de trabalho que temos no Laboratório, em meio a momentos de seriedade, mas também de muita descontração e amizade. “Essa equipe vale ouro!” Agradeço também aos bolsistas e estagiários que passaram pelo LHV, em especial, Nelson Meireles, Larissa Amorim e Monique Davel, que se dedicaram durante a organização das amostras de DNA manipuladas nesta tese.

Agradeço também as meninas que compõe a equipe do Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE/DESP/UFRRJ), orientadas pelo professor Huarrisson Azevedo Santos, que sempre estiveram na torcida para que eu alcançasse os melhores resultados: Thamires Sampaio Vilela, Thais de Araujo Camilo, Roberta Caroline Tolomeli, Luisa de Oliveira, Débora Martins, Patricia Paulino e Danielle Godinho.

À Dr^a e minha amiga Joice Aparecida Rezende Vilela por todo auxílio durante as coletas das amostras a campo, onde me acompanhou em maior parte das visitas às residências e com quem aprendi muito sobre o que é ser médica veterinária por amor e vocação.

Ao Allan Felipe Marciano, Larissa Clara, e aos demais estagiários que passaram pelo laboratório de Doenças Parasitárias (DESP/IV). Eles me ajudaram durante as coletas na microrregião de Itaguaí. Sei que aprenderam junto comigo em termos de trabalho a campo, mas eu também aprendi com eles, ao ver nos seus olhos a sede de aprendizado que temos durante a graduação que foi um estimulante para continuar o trabalho.

Ao professor Dr. Argemiro Sanavria, que foi apoio durante minha passagem

acadêmica, e que também contribui para a realização desse estudo. Meu orientador na graduação, co-orientador no mestrado e um amigo que sei que torce pelo sucesso de quem passou pelo seu laboratório.

Ao professor Dr. Eugenio Roque López que foi meu supervisor/orientador durante o período de doutorado sanduíche desenvolvido na Universidad Agraria de la Habana (UNAH) em Cuba, um amor de pessoa, muito solícito e atencioso durante nossa estadia no país.

À minha amiga Dr^a Carla Carolina Dias Uzedo Ribeiro que foi uma excelente companhia durante nossa passagem por Cuba, minha companheira de “vida cubana”, onde tudo partilhamos desde os alimentos, às opiniões, às decisões, e as aventuras durante as coletas. Suportando nossas saídas sob o sol caribenho, durante muitas caminhadas pelas ruas das cidades que passamos. Com certeza, sua companhia foi essencial para que nossa estadia no país fosse feliz. Tenho convicção que nossa passagem deixou marcas, e fizemos muitos amigos por onde passamos, pois nossa vida foi muito intensa, já que por alguns meses nos tornamos irmãs cubanas no tom de pele, queimadas no sol, e na vivência diária.

Ao professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, que foi um apoio antes, durante e depois de nossa viagem à Cuba. Sempre nos orientando sobre como seriam os locais por onde passaríamos, disponibilizando contatos importantes para que nós tivéssemos uma qualidade de vida boa pelo tempo que por lá ficamos. Agradeço pelos materiais e reagentes disponibilizados para a realização dos trabalhos, e também pela companhia amiga durante meu doutorado.

Agradeço a Dr^a Belkis Gonzales Corona e Dr^a Siomara Martinez, que disponibilizaram estrutura e materiais necessários ao desenvolvimento da extração de DNA do sangue coletado de cães na ilha de Cuba, no laboratório de biologia molecular do CENSA (Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria), onde trabalhei durante o doutorado sanduíche.

À equipe de funcionários do CENSA, em Cuba, que foram muito amistosos e que me acolheram como parte do grupo.

Agradeço de maneira especial a Dr^a Maylin Gonzales Navarrete, Maykelin Zaldivar Fuentes, Yasmin, Alejandro, professor Mario, professores Júlio César e Júlio Martins, que foram amigos essenciais durante minha vivência em Cuba, sempre solícitos, ajudaram-me nas coletas e abordagem das residências, propiciando a proximidade com cubanos moradores das cidades estudadas.

À Dr^a Mildrey Sóca Perez, que além de ser uma amiga muito estimada, foi também um apoio e amparo durante a passagem pela Estación Indio Hatuey, localizado em Matanzas, Cuba. Agradeço também a equipe do laboratório de Parasitologia desta mesma localidade, incluindo Yoel Lopes-Levy e Javier Arece, que foram receptivos, protetores, e que me fizeram sentir em minha casa durante o tempo que passei por lá.

A Cecilio Silva de Sousa, Jonas Mendes da Silva, Osvaldo Fonseca Rodríguez e Adrian Alberto Diaz Sanchez pela gentileza em confeccionar e formatar os mapas apresentados neste estudo.

Aos animais que mais uma vez foram meu objeto de estudo, e espero que de alguma forma essa tese possa ser útil a minizar a dor e sofrimento desses amáveis seres que sempre nos recebem de maneira sincera, e geralmente de forma carinhosa. Com eles aprendi muito, e sem eles não haveriam resultados neste trabalho.

Agradeço a República de Cuba que permitiu nossa entrada, estudo e a investigação de hemoparasitos de importância veterinária no país através de parceria estabelecida com o Brasil (CAPES), propiciando uma experiência inesquecível e muito rica, onde pude trocar ensinamentos em qualidade científica, e aprender muitas outras quanto à cultura e vivência. Vivência que faz lembrar um trecho dito por Frei Anselmo Fracasso: “*É sempre gratificante a conquista de uma alegria após longa e dolorosa luta, assim como é grande a satisfação de se chegar ao pico da montanha depois de uma difícil e estafante escalada*”.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que nos acolhe como mãe, tanto na

graduação como no mestrado, e agora finalizando o doutorado, uma segunda casa para mim.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que pela concessão da bolsa durante o Doutorado, ajudou-me a desenvolver este projeto, tanto no período em território nacional (Brasil), como em Cuba.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Claudia Bezerra da Silva, filha de Jane Bezerra da Silva e Claudio Severino da Silva, nasceu em 16 de setembro de 1984, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro. Iniciou o ensino fundamental na Escola Santa Clara, localizada em Guaratiba, dando continuidade na Escola Rural São Vicente de Paulo; e no Colégio Nossa Senhora do Rosário, em Campo Grande, concluiu o Ensino Médio, em 2002.

No ano de 2004 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo o curso em 2009.

Durante a graduação realizou estágios na área de Clínica médica no Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVGA), assim como no Laboratório de Doenças Parasitárias no Instituto de Veterinária, e Laboratório de criação de Dípteros da Estação para Pesquisas Parasitológica W.O.Neitz, na UFRRJ. Participou de diversos projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública.

Em 2007 foi aprovada em concurso público como acadêmica bolsista em Medicina Veterinária no Esquadrão Escola de Cavalaria (EEC) da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro, exercendo atividade na área de Clínica Médica de equinos.

Entre os anos de 2007 e 2009, foi bolsista de Iniciação Científica (Pibic/Balcão - CNPq) com projeto visando controle de *Haematobia irritans* em sistemas de produção orgânica e convencional de bovinos de aptidão leiteira.

Obteve o X Prêmio de Iniciação Científica da XVII Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, 2007, com o trabalho intitulado por “Ação *in vitro* de extratos etanólico e hexânico da cutieira (*Joannesia princeps*) sobre as larvas de terceiro estágio de strongilídeos de equino”.

Em março de 2010 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Parasitologia Veterinária, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, sendo contemplada com bolsa do CNPq. Em fevereiro de 2012 concluiu seu mestrado e defendeu sua dissertação intitulada por “Diagnóstico sorológico e aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Canina na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro” com êxito, obtendo o título de mestra.

Em março de 2012 iniciou o Doutorado no mesmo Programa de Pós-graduação da UFRRJ, sendo contemplada com bolsa da CAPES. Desenvolveu sua tese com o objetivo de padronizar um novo método de diagnóstico através da PCR quantitativa com base no gene *gltA* para detectar *Anaplasma platys* em cães, e através deste resultado caracterizar aspectos epidemiológicos desta doença na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. Uma outra parte do doutorado foi desenvolvida em Cuba, estudando hemoparasitos de importância veterinária, incluindo *A. platys*, sendo esta a primeira evidência e caracterização deste agente em Cuba.

RESUMO GERAL

SILVA, Claudia Bezerra da. **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. 109p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Este trabalho objetivou padronizar um novo método de diagnóstico da infecção por *Anaplasma platys*, e investigar a circulação deste agente em cães na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil, e cães e carrapatos em duas províncias da ilha de Cuba, analisando aspectos epidemiológicos associados à infecção causada por esta bactéria em cães. Um novo método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi padronizado com alvo no gene citrato sintase (*gltA*) para a identificação de *A. platys* em cães naturalmente infectados. Os oligoiniciadores e a sonda foram desenhados para amplificar um fragmento de 84 pares de base baseado em sequências do gene *gltA* de *A. platys* disponíveis no *GenBank*. 186 amostras de sangue de cães da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil, foram testadas pela qPCR. As mesmas amostras foram testadas pela citologia e reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR, 16S *rDNA*) para determinar o desempenho da qPCR frente à essas técnicas. 17,20% das amostras testadas pela qPCR foram positivas, significativamente mais do que detectado pela nPCR (13,98%). A técnica de qPCR foi mais específica que a citologia, em virtude dos resultados falso-positivos obtidos pela microscopia óptica. A prevalência de *A. platys* em cães da microrregião de Itaguaí foi de 14,4%. Cães com menos de seis meses, infestados por carrapatos, que possam maior tempo restrito ao ambiente doméstico e sem abrigo são fatores associados a infecção por este hemoparasito em cães na região do estudo. Durante investigação de *A. platys* realizada em Cuba, 100 amostras de sangue foram coletadas de cães residentes em quatro cidades localizadas nas províncias de Habana e Mayabeque. Ao inspecionar os animais, carrapatos encontrados foram coletados, identificados e criteriosamente agrupados, formando um total de 49 *pools*. Amostras de DNA extraídas do sangue dos cães e de carrapatos foram submetidas a nPCR (16S *rDNA*). Amostras positivas na nPCR foram também submetidas a PCR convencional (gene *gltA*), e os produtos foram sequenciados. Somente a espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato foi encontrada em cães cubanos, e 10,2% (n=5/49) desses carrapatos somado aos 16,0% (n=16/100) de cães foram considerados positivos para *A. platys*. Todas as sequências analisadas dos genes *gltA* e 16S *rDNA*, respectivamente, mostraram uma identidade de 99-100% com sequências de *A. platys* reportadas em outros países. A análise filogenética mostrou dois *clusters* definidos para o gene 16S *rDNA* e três *clusters* definidos para o gene *gltA*. Com base no gene *gltA*, a sequência de aminoácidos deduzidos demonstrou dois pontos de mutações não-sinônimas nas posições 88 e 168 comparados com sequência de referência DQ525687. Um estudo preliminar sobre os aspectos epidemiológicos associados com a infecção por *A. platys* demonstrou nenhuma associação estatística com as variáveis avaliadas ($p > 0,05$). O presente estudo além de relatar a primeira evidência de *A. platys* em ambos cães e carrapatos em Cuba, também apresenta pela primeira vez o desenvolvimento de um novo método de qPCR que contribui para o avanço da pesquisa envolvendo *A. platys*. O estudo epidemiológico realizado no Brasil permitiu identificar fatores importantes na ocorrência da anaplasmoze canina, enquanto em Cuba, pode-se concluir que mais investigações são necessárias para avaliar quais os fatores decisivos na transmissão e dispersão de *A. platys* nesse país.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*; cães; diagnóstico molecular; qPCR; *nested* PCR; filogenia; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Claudia Bezerra da. **Diagnostic of *Anaplasma platys* in dogs and ticks: standardization of qPCR and epidemiological analysis in the state of Rio de Janeiro, Brazil and in the western region of Cuba.** 2016. 109p. Tesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

This work aimed to standardize a new method of diagnosis of infection by *Anaplasma platys*, and investigate the circulation of this agent in dogs in the Itaguaí microregion, Rio de Janeiro, Brazil, and dogs and ticks in two provinces of the island of Cuba, analyzing epidemiological aspects associated with infections caused by this bacterium in dogs. A new real-time polymerase chain reaction method (qPCR) was patterned to target the citrate synthase gene (*gltA*) for the identification of *A. platys* in naturally infected dogs. The primers and probe were designed to amplify a fragment of 84 base pairs based on *gltA* gene sequences of *A. platys* available in GenBank. 186 blood samples of dogs from Itaguaí microregion, Rio de Janeiro, Brazil, were tested by qPCR. The same samples were tested by cytology and nested polymerase chain reaction (nPCR, 16S *rDNA*) to determine the performance of qPCR front of these techniques. 17.20% of the samples tested positive by qPCR were significantly more than that detected by nPCR (13.98%). The qPCR technique was more specific than cytology, due to false-positive results obtained by optical microscopy. The prevalence of *A. platys* in dogs from Itaguaí microregion was 14.4%. Dogs less than six months, infested by ticks, that spend the most of the time restrict to domestic environment and without shelter are factors associated with infection by this hemoparasite in dogs in the study area. During research, *A. platys* held in Cuba, 100 blood samples were collected from residents dogs in four cities located in the provinces of Havana and Mayabeque. When inspecting the animals, found ticks were collected, identified and carefully grouped, forming a total of 49 pools. DNA extracted from blood samples from dogs and ticks were subjected nPCR (16S *rDNA*). Positive samples in nPCR were also subjected to conventional PCR (*gltA* gene), and the products were sequenced. Only the species *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato was found in Cuban dogs and 10.2% (n=5/49) of these ticks added to 16.0% (n=16/100) dogs were considered positive for *A. platys*. All sequences analyzed of the *gltA* and 16S *rDNA* genes, respectively, showed a 99-100% identity with sequences from *A. platys* reported in other countries. Phylogenetic analysis showed two clusters defined for the 16S *rDNA* gene and three clusters defined for the *gltA* gene. Based on the *gltA* gene, the deduced amino acid sequence showed two points of non-synonymous mutations at positions 88 and 168 compared to the reference sequence DQ525687. A preliminary study on the epidemiological aspects associated with infection with *A. platys* showed no statistical association with the variables studied ($p > 0.05$). This study also to report the first evidence of *A. platys* in both dogs and ticks in Cuba also presents for the first time the development of a new qPCR method that contributes to the advancement of research involving *A. platys*. The epidemiological study in Brazil allowed us to identify significant factors in the occurrence of canine anaplasmosis, while in Cuba, it can be concluded that more research is needed to assess what the deciding factors in the transmission and spread of *A. platys* in that country.

Keywords: *Anaplasma platys*; dogs; molecular diagnostic; qPCR; nested PCR; phylogeny; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

Lista de Abreviaturas

A: Adenina
ALT: alanina aminotransferase
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
COMEP/UFRRJ: Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ
C(β): Coeficiente do modelo
Cq: cycle quantification
DNA: ácido desoxirribonucleico
DP: desvio padrão
dUTP: desoxiuridina trifosfato
dTTP: desoxitimina trifosfato
EDTA: ácido etileno-amino-tetracético
EP: erro padrão
EUA: Estados Unidos da América
Exo IPC: Controle interno positivo exógeno
FAM: 6-carboxifluoresceína
G: Guanina
gltA: gene citrato sintase
GroESL: gene induzido por choque térmico
GroEL: gene induzido por choque térmico
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC: Intervalo de Confiança
Km: quilometro
LHV / E.E.P.P. W.O. Neitz: Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz
N: número de cães
nPCR: *nested* PCR
OR: *Odds Ratio*
P: p-valor
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
pb: pares de base
p44: gene que codifica a proteína de superfície
P44: proteína de superfície
p30: peptídeo de proteínas de *Ehrlichia canis*
p30-1: peptídeo de proteínas de *Ehrlichia canis*
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
RF: Razão de frequência
R²: Coeficiente de determinação
rDNA: ácido desoxirribonucleico ribossomal
SRD: Sem raça definida
TAMRA: tetrametilrodamina
Tm: temperatura de dissociação
 ΔRn : *Reporter* normalizado
 μ L: microlitro
°C: Celsius
 χ^2 : Teste de Qui-quadrado

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1.	Condições para o teste de otimização da concentração dos oligoiniciadores.....	15
Tabela 2.	Determinação do valor médio de Cq e ΔRn em relação as diferentes concentrações dos oligoiniciadores (<i>gltA</i> : 84F e 84R; sensu e anti-sensu) avaliadas durante a padronização da qPCR.....	20
Tabela 3.	Determinação do valor médio de Cq e ΔRn em relação as diferentes concentrações da sonda (PLATYSp) avaliadas durante a padronização da qPCR.....	23
Tabela 4.	Relação entre a quantificação do ciclo (Cq) e o número de cópias do fragmento do gene <i>gltA</i> de <i>Anaplasma platys</i> obtidos da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) usando amostras de cães naturalmente infectados.....	24
Tabela 5.	Análise da discordância entre os testes qPCR e nPCR, bem como qPCR e esfregaço sanguíneo, comparando os resultados obtidos quando amostras de DNA de cães diluídas a 100ng/uL foram submetidas ao diagnóstico de <i>A. platys</i> neste estudo, considerando a avaliação 1 da metodologia de padronização da extração de DNA.....	26
Tabela 6.	Análise da discordância entre os testes qPCR e nPCR, bem como qPCR e esfregaço sanguíneo, comparando os resultados obtidos quando amostras de DNA de cães diluídas até 100ng/uL foram submetidas ao diagnóstico de <i>A. platys</i> neste estudo, considerando a avaliação 2 da metodologia de padronização da extração de DNA.....	26

CAPITULO II

Tabela 1.	Análise descritiva e bivariada das características intrínseca aos cães infectados por <i>Anaplasma platys</i> , diagnosticados através da qPCR na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016.....	57
Tabela 2.	Análise descritiva e bivariada das características extrínsecas relacionadas aos cães infectados por <i>Anaplasma platys</i> , diagnosticados através da qPCR na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016.....	58
Tabela 3.	Análise bivariada da frequência de <i>Anaplasma platys</i> em cães analisados, através da PCR em tempo real, em função da infestação por artrópodes observados nos animais da microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016.....	59
Tabela 4.	Modelo de regressão logístico final dos fatores associados à infecção dos cães por <i>Anaplasma platys</i> na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016.....	60
Tabela 5.	Alterações clínicas observadas nos cães em função do diagnóstico da	

infecção por <i>Anaplasma platys</i> , no estado do Rio de Janeiro, 2016.....	61
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Análise bivariada da frequência de <i>Anaplasma platys</i> determinada pela <i>nested</i> PCR (<i>nPCR</i>) em cães, em relação aos fatores associados como sexo, idade, ração, infestação por carrapatos, tipo de área da propriedade, hábitos e desordens de coagulação em quatro cidades de Cuba.....	87
Tabela 2. Identificação e classificação de amostras deste estudo de acordo com o gene alvo analisado filogeneticamente, <i>cluster</i> , hospedeiro analisado e cidade de origem, Cuba.....	91

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1.** Alinhamento dos nucleotídeos referente fragmento do gene *gltA* de *A. platys*. Em amarelo: oligoiniciador sensu; em vermelho: sonda; em azul: oligoiniciador anti-sensu..... 20
- Figura 2.** Curva de amplificação do DNA alvo (*gltA*) a partir do controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 600nM/600nM (amarelo) e de 900nM/900nM (verde)..... 21
- Figura 3.** Curva de dissociação a partir da amplificação de um fragmento de 84pb do gene *gltA* no controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 600nM/600nM (amarelo) e de 900nM/900nM (verde). Pico de dimerização (seta)..... 22
- Figura 4.** Curva padrão com Exo IPC plotada a partir de diluições seriadas decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do gene *gltA* de *Anaplasma platys*. O valor de Cq obtido pela qPCR utilizando sonda de hidrólise foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios..... 24
- Figura 5.** Curva padrão sem Exo IPC plotada a partir de diluições seriadas decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do gene *gltA* de *Anaplasma platys*. O valor de Cq obtido pela qPCR utilizando sonda de hidrólise foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios..... 25
- Figura 6.** Inclusões basofílicas encontradas em plaquetas, durante avaliação de esfregaço sanguíneo (setas). Coloração Giemsa, microscopia óptica, aumento de 1000X. (Escala: 20µm)..... 27

CAPITULO II

- Figura 1.** Localização geográfica da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, evidenciando os municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba. (Fonte: SILVA, 2012)..... 53

CAPITULO III

- Figura 1.** Mapa menor: Ilha de Cuba. Mapa maior: localização das cidades nas quais as coletas foram realizadas nas províncias de Habana (Cotorro, Boyeros e Habana del Este) e Mayabeque (San José de las Lajas). Barra de escala = 20 Km..... 82
- Figura 2.** Infestações por diferentes estágios evolutivos de carrapatos foram

	encontradas no ambiente durante visita às residências. A esquerda: presença de incontáveis larvas na janela de acesso ao quarto de uma das residências visitadas. A direita: presença de ninfas de <i>R. sanguineus</i> s.l. sob o peitoril da janela (setas) da mesma residência.....	86
Figura 3.	Fotografia de gel de Agarose contendo amostras negativas (ausência de bandas) e positivas apresentando bandas respectivas ao fragmento de 678 pb do gene 16S <i>rDNA</i> de <i>A. platys</i> amplificados durante a <i>nPCR</i>	86
Figura 4.	Análise filogenética de <i>Anaplasma platys</i> isolado de cães baseada na comparação da sequência do gene <i>gltA</i> (501 pares de base).....	89
Figura 5.	Análise filogenética de <i>Anaplasma platys</i> isolado de cães baseada na comparação da sequência do gene 16S <i>rDNA</i> (679 pares de base).....	90
Figura 6.	Alinhamento de aminoácidos a partir da sequência parcial do gene <i>gltA</i> de <i>Anaplasma platys</i>	92
Figura 7.	Alinhamento de aminoácidos a partir da sequência parcial do gene <i>gltA</i> de <i>Anaplasma platys</i>	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPITULO I - Padronização da PCR em tempo real para o diagnóstico de <i>Anaplasma platys</i> em cães, com base no gene <i>gltA</i>	3
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Breve histórico sobre a trombocitopenia cíclica canina.....	7
2.2 Posição Taxonômica.....	8
2.3 Ciclo Biológico e Formas de Transmissão.....	8
2.4 Manifestações Clínicas.....	9
2.5 Distribuição mundial.....	10
2.6 Diagnóstico Laboratorial.....	10
2.6.1 Parasitológico.....	10
2.6.2 Imunológico.....	11
2.6.3 Molecular.....	11
2.7 Tratamento.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Padronização da PCR em tempo real (qPCR).....	14
3.1.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sonda de hidrólise.....	14
3.1.2 Controle positivo.....	14
3.1.3 Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores e sonda de hidrólise.....	15
3.1.4 - Sensibilidade e especificidade analítica da qPCR para <i>Anaplasma platys</i>	15
3.2 Amostragem.....	16
3.2.1 Extração do DNA total.....	17
3.2.1.1 Padronização das alíquotas de DNA a serem utilizadas na qPCR.....	17
3.2.2 O ensaio de PCR em Tempo Real (qPCR).....	17
3.2.3 Cuidados tomados para evitar contaminações.....	18
3.2.4 Nested PCR (<i>n</i> PCR).....	18
3.3 Avaliação do esfregaço sanguíneo.....	18
3.4 Análise estatística.....	18
3.5 Considerações éticas.....	19
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPITULO II - Aspectos epidemiológicos de <i>Anaplasma platys</i> em cães domiciliados na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, Brasil	44
1 INTRODUÇÃO	47

2 REVISÃO DE LITERATURA	49
2.1 Ocorrência e prevalência de <i>Anaplasma platys</i> no Brasil.....	49
2.2 Hospedeiros e vetores na transmissão de <i>A. platys</i>	50
2.3 Aspectos Epidemiológicos.....	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Descrição da região estudada.....	53
3.2 Tamanho da amostra e amostragem.....	54
3.3 Visita às residências e aplicação de questionário epidemiológico.....	54
3.4 Investigação de infestação parasitária.....	55
3.5 Coleta de Sangue.....	55
3.6 Esfregaço sanguíneo.....	55
3.7 Extração de DNA, quantificação e pureza das amostras.....	55
3.7 PCR em tempo real (qPCR)	55
3.8 Análise estatística.....	56
3.9 Princípios éticos.....	56
4 RESULTADOS	57
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
CAPÍTULO III - Detecção molecular e caracterização de <i>Anaplasma platys</i> em cães e carrapatos em Cuba	75
1 INTRODUÇÃO	78
2 REVISÃO DE LITERATURA	80
2.1 Região do Caribe.....	80
2.2 Breve histórico da ilha de Cuba.....	80
2.3 Pesquisa veterinária em Cuba.....	80
3 MATERIAL E MÉTODOS	82
3.1 Descrição da área estudada e amostragem.....	82
3.2 Questionário epidemiológico.....	83
3.3 Extração de DNA e nPCR.....	83
3.4 Sequenciamento e análise filogenética.....	84
3.5 Análise estatística.....	84
3.6 Conformidade com as Normas Éticas.....	85
4 RESULTADOS	86
5 DISCUSSÃO	93
6 CONCLUSÕES	95

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	101
ANEXOS.....	102
Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.....	103
Anexo II – Parecer da COMEP/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.....	106
Anexo III – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.....	107
Anexo IV – Certificado Zoosanitário de exportação das amostras (Servicio Veterinario de Frontera – Cuba).....	108
Anexo V – Aprovação do Conselho Científico Veterinário de Cuba (CCVC).....	109

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os agentes da família Anaplasmataceae que infectam leucócitos de cães (*Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum*) e plaquetas (*Anaplasma platys*) são bactérias intracelulares obrigatórias, gram-negativas e pleomórficas (DUMLER; BAKKEN, 1995; MURPHY et al., 1998; PUSTERLA et al., 1999; CHAE et al., 2000; SHIBATA et al., 2000).

Anaplasma platys (anteriormente conhecido como *Ehrlichia platys*) foi identificada pela primeira vez em 1978 na Flórida, como uma bactéria *Rickettsia*-like encontrada nas plaquetas de cães com trombocitopenia infecciosa cíclica (HARVEY et al., 1978). Na descrição original foram observadas semelhanças morfológicas e biológicas com outra bactéria que infecta cães, *E. canis*, e também com *Anaplasma marginale*, bactéria que acomete bovinos, sendo que ambas, atualmente são classificadas como membros da família Anaplasmataceae (HARVEY et al., 1978; DUMLER et al., 2001). A partir dos estudos moleculares iniciados por Anderson et al. (1992) foi possível analisar a sequência do gene 16S *rDNA*, presente em *E. platys* e através dos estudos de Yu et al. (2001) e Huang et al. (2005), os autores observaram a sequência de outro gene, *groEL*, também presente nestas bactérias. Com isso, após análise filogenética destes dois genes citados foi possível demonstrar que *E. platys* estava estreitamente relacionada com *A. phagocytophilum* e *Anaplasma marginale*, levando a uma nova reclassificação destes organismos ao gênero *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001).

Os sinais clínicos da trombocitopenia infecciosa cíclica canina são depressão, febre, e anorexia. A parasitemia e trombocitopenia ocorrem em ciclos de cerca de 10 a 14 dias (FRENCH; HARVEY, 1983). A partir de estudos moleculares foi possível detectar o DNA de *A. platys* no sangue de cães em diversas localidades no mundo (CHANG; PAN, 1996; SAINZ et al., 1999; HUA et al., 2000; BROWN et al., 2001; SUKSAWAT et al., 2001; INOKUMA et al., 2002a,b; SANOGO et al., 2003; UNVER et al., 2003; MYLONAKIS et al., 2004; HUANG et al., 2005; FERREIRA et al., 2007; CARDOSO et al., 2010). *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato tem sido implicado como principal vetor de *A. platys* (INOKUMA et al., 2000; SPARAGANO et al., 2003; SANOGO et al., 2003; RAMOS et al., 2014), contudo, a sua participação na transmissão desta bactéria aos cães ainda não foi comprovada (SIMPSON et al., 1991).

Diferentes métodos de diagnóstico para pesquisa de membros da família Anaplasmataceae vêm sendo utilizados na rotina clínica e em levantamentos epidemiológicos. O diagnóstico morfológico de *A. platys* em lâmina é um método rápido, entretanto, pouco sensível, visto que inclusões de *E. canis* também podem ser encontradas em plaquetas (PEREIRA, 2012), bem como granulações podem surgir devido a ativação plaquetária (FERREIRA et al., 2008), grânulos densos, restos nucleares de megacariócitos (MYLONAKIS et al., 2003), ou até mesmo artefatos técnicos que podem confundir o observador durante o diagnóstico. Em função da existência de reações cruzadas em testes sorológicos (YABSLEY et al., 2008) é difícil afirmar, com segurança, a real etiologia das doenças provocadas por organismos da família Anaplasmataceae em canídeos no Brasil. Sendo assim, a utilização de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) e o sequenciamento são importantes ferramentas de diagnóstico para identificação e caracterização das espécies que ocorrem em cães. Esta técnica apresenta várias vantagens sobre a PCR convencional, incluindo a maior rapidez, simplicidade, sensibilidade, reprodutibilidade, capacidade quantitativa e o baixo risco de contaminação (FENOLLAR; RAOULT, 2004).

Atrelado a esta técnica, o sequenciamento de DNA, utilizando como alvo os genes 16S *rDNA*, citrato sintase (*gltA*), *GroESL*, possibilita a genotipagem das cepas identificadas, podendo ser utilizadas em estudos de filogeografia e evolução (UNVER et al., 2003).

Inokuma et al. (2002a; 2005) utilizou oligonucleotídeos iniciadores mais específicos na detecção do gene *gltA* responsável pela codificação da enzima citrato sintase como forma de diagnóstico do gênero *Anaplasma*. Além disso, Roux et al. (1997) afirmaram que o gene *gltA* pode ser um excelente alvo na qPCR, pois pode ser detectado em todas as espécies de rickettsias.

Em virtude do exposto, o presente estudo teve como objetivo principal padronizar uma nova técnica diagnóstica de *A. platys* em cães do Rio de Janeiro, através da qPCR com alvo no gene *gltA*. A partir deste resultado, objetivou-se confrontar três técnicas de diagnóstico de *A. platys* distintas: a qPCR padronizada, a *nested* PCR e o diagnóstico direto em lâmina de esfregaço sanguíneo. Da mesma forma, utilizou-se da qPCR padronizada para determinar os aspectos epidemiológicos associados à positividade por *A. platys* em cães domiciliados na microrregião de Itaguaí, RJ.

CAPÍTULO I

PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DE *Anaplasma platys* EM CÃES, COM BASE NO GENE *gltA*

RESUMO

SILVA, Claudia Bezerra. **Padronização da PCR em tempo real para a detecção de *Anaplasma platys* em cães, com base no gene *gltA***. 2016. 41p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Anaplasma platys é uma bactéria intracelular obrigatória que afeta principalmente cães, mas também infecta humanos. Este estudo objetivou padronizar um método de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) usando o gene citrato sintase (*gltA*) como um alvo específico para o diagnóstico de *A. platys* em cães naturalmente infectados. Os oligoiniciadores (*gltA84F* e *gltA84R*) e a sonda (PLATYSp) foram desenhados para amplificar um fragmento de 84 pares de base baseado em sequências do gene *gltA* de *A. platys* disponíveis no GenBank. Um total de amostras de sangue de 186 cães originários do estado do Rio de Janeiro, Brasil, foram testados pela qPCR. Além disso, as mesmas amostras foram testadas pela citologia e reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR, 16S *rDNA*) para determinar o desempenho do presente método de qPCR em comparação com as técnicas existentes. Entre as amostras testadas com a qPCR, 17,20% foram considerados positivas, significativamente mais do que detectado pela nPCR (13,98%). Sob microscopia óptica, inclusões foram observadas em plaquetas de 25,27% das amostras, e entre estas amostras, somente 33,91% foram identificadas como positivas para *A. platys* usando a qPCR. A técnica de qPCR provou ser mais específica que a citologia e ter superior sensibilidade que a nPCR para o diagnóstico de *A. platys* em cães. O desenvolvimento deste novo método de qPCR contribui para o avanço da pesquisa envolvendo *A. platys*. Além disso, ele pode ser usado para quantificar a presença dessa bactéria para avaliar a eficiência do tratamento adotado em animais infectados, ou mesmo como uma ferramenta mais sensível e específica para situações em que é possível ter a doença clínica, mas citologia negativa.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*; reação em cadeia da polimerase em tempo real; citrato sintase; cães.

ABSTRACT

SILVA, Claudia Bezerra. **Standardization of PCR in real time for diagnosis *Anaplasma platys* in dogs, based on gene *gltA***. 2016. 41p. Tesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Anaplasma platys is an obligate intracellular bacterium that primarily affects dogs, but it can also infect humans. This study aimed to standardize a real-time polymerase chain reaction (qPCR) method using the citrate synthase gene (*gltA*) as a specific target for *A. platys* diagnosis in naturally infected dogs. The primers (*gltA84F* and *gltA84R*) and the probe (PLATYSp) were designed to amplify an 84 base pair fragment based on the *gltA* gene sequences of *A. platys* available in GenBank. A total of 186 dog blood samples originating from the Rio de Janeiro state, Brazil, were tested by qPCR. Additionally, the same samples were tested by cytology and nested polymerase chain reaction (nPCR, 16S ribosomal DNA) to determine the performance of our qPCR method compared to these existing techniques. Among the samples tested with qPCR, 17.20% were considered positive, significantly more than detected by nPCR (13.98%). Under optical microscopy, inclusions were observed in platelets of 25.27% of the samples, and among these samples, only 33.91% were identified as positive for *A. platys* using qPCR. The qPCR technique proved to be more specific than cytology and to have superior sensitivity to nPCR for diagnosing *A. platys* in dogs. The development of this new qPCR method contributes to the advancement of research involving *A. platys*. Furthermore, it can be used to quantify the presence of this bacterium to evaluate the adopted treatment in infected animals, or even as a more sensitive and specific tool for situations where it is possible clinical disease but negative cytology.

Keywords: *Anaplasma platys*; real-time polymerase chain reaction; citrate synthase; dogs

1 INTRODUÇÃO

Anaplasma platys é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa e pleomórfica, organismo que afeta plaquetas de cães, causando a trombocitopenia cíclica infecciosa canina. Esta bactéria pertenceu ao gênero *Ehrlichia*, mas foi recentemente reclassificada com base em análise filogenética do gene 16S ribossomal DNA (*rDNA*) (DUMLER et al., 2001). Embora este agente seja importante para a clínica de pequenos animais, alguns dados indicam que bactérias *A. platys* têm uma ampla gama de hospedeiros, incluindo gatos (CORREA et al., 2011), vacas (DAHMANI et al., 2015), camelos (LI et al., 2015), e seres humanos (MAGGI et al., 2013; ARRAGA-ALVARADO et al., 2014; BREITSCHWERDT et al., 2014).

Repetidas fissões binárias desta bactéria dentro de vacúolos resultam na formação de mórulas em plaquetas (HARVEY et al., 1978). Os principais sinais clínicos desta infecção são inespecíficos, como a depressão, febre, aumento generalizado de linfonodos, emaciação, e anorexia, apesar de na maioria dos casos, os animais apresentarem-se assintomáticos (HARVEY et al., 1978; WOODY; HOSKINS, 1991; HARVEY, 2011; LI et al., 2015). Trombocitopenia, anemia (DAGNONE et al., 2003), macroplaquetas, e monocitose (HARRUS et al., 1997) são os achados laboratoriais mais comuns. Anteriormente, foi relatado que a diminuição na produção de plaquetas, não esteve associada com a infecção por *A. platys* porque esta bactéria não havia sido encontrada em megacariócitos (RUSSEL; GRINDEM, 2000). No entanto, um estudo mais recente mostrou que *A. platys* pode infectar megacariócitos e promegacariócitos, que são células precursoras de plaquetas (TOMMASI et al., 2014) derivadas de células-tronco pluripotentes da medula óssea. Embora a trombocitopenia seja um achado comum associado com a infecção por *A. platys*, este não é patognomônico das rickettsioses (FERREIRA et al., 2008a), podendo incluir *Ehrlichia canis* como diagnóstico diferencial (DAGNONE et al., 2003).

Os métodos de diagnóstico mais comuns para trombocitopenia infecciosa cíclica canina são a identificação direta de mórulas em esfregaços de sangue, métodos sorológicos para detecção de anticorpos, e amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (FERREIRA et al., 2008a). Estudos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de *A. platys* como técnicas moleculares que se tornaram mais confiáveis devido a uma maior sensibilidade e especificidade. Os genes *GroEsL* (“heat-shock” operon), *23S rDNA*, *16S rDNA*, polinucleotídeo *p44*, e *gltA* (citrato sintase) são também usados como alvos em métodos de diagnóstico e nos estudos de filogenia, bem como na caracterização de cepas de *A. platys* (INOKUMA et al., 2002a; DE LA FUENTE et al., 2006; ABARCA et al., 2007; GAUNT et al., 2010; DAHMANI et al., 2015a). Dois estudos usaram uma *nested* PCR (nPCR), ambos com alvo no gene 16S *rDNA* de *A. platys* (MARTIN et al., 2005; ABARCA et al., 2007). A técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi anteriormente usada para detectar infecção por *A. platys* (GAUNT et al., 2010), mas este ensaio foi baseado no polinucleotídeo *p44* que codifica a proteína de superfície P44 (LIN et al., 2003). Além disso, é importante a busca de novos alvos que são geneticamente menos mutável entre as linhagens e que resultam em o menor número de falsos negativos. Este estudo objetivou padronizar uma técnica de qPCR com alvo no gene *gltA* de *A. platys* para o diagnóstico deste agente em cães naturalmente infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve Histórico sobre a Trombocitopenia Cíclica Canina

Históricamente, organismos da família Anaplasmataceae vem acometendo animais domésticos. Desde 1780, quadros clínicos do que costumavam empiricamente chamar de “febre do carrapato” ocorreram em animais de fazenda, e em alguns momentos levou a morte dos animais, mas sua etiologia ainda não havia sido reconhecida. Existem relatos de que essa mesma “febre” havia sido observada não só em pequenos ruminantes, mas também em cães (RYMASZEWSKA; GREYNDEN, 2008). Cerca de 150 anos mais tarde, relatou-se que a doença em questão havia sido causada por uma pequena bactéria chamada *Ehrlichia phagocytophila* (atualmente conhecido como *Anaplasma phagocytophilum*) mostrando tropismo por granulócitos (JENKINS et al., 2001).

Posteriormente, os primeiros relatos de infecção por *Anaplasma marginale* apareceram quando Salmon e Smith em 1984 detectaram a presença de inclusão em eritrócitos de bovinos. A primeira descrição completa foi realizada por Arnold Theiler, que observou bactérias em eritrócitos de gado da África do Sul em 1910 (KOCAN et al., 2003). Ele discriminou duas subespécies: uma frequentemente formando "pontos marginais" em eritrócitos de bezerros (*A. marginale*), e as outras frequentemente concentrando inclusões na parte central da célula, daí o nome *Anaplasma centrale*. A última das subespécies foi retratada como sendo menos patogênica para animais domésticos (KOCAN et al., 2003). Após esses primeiros achados foram realizadas descobertas de outras espécies do gênero *Anaplasma*, patógeno de animais como *Anaplasma ovis* (LESTOQUARD, 1924; SKERMAN et al., 1980), *Anaplasma bovis* (DONATIEN; LESTOQUARD, 1936) e *Anaplasma platys* (HARVEY et al., 1978), agente causador da trombocitopenia cíclica canina.

A trombocitopenia tem sido relatada em diversos estudos, associados a enfermidades de pessoas e animais, e a observação de inclusões intra-plaquetárias ocorrem em alguns desses casos (CORREA et al., 2011; MYLONAKIS et al., 2003). Harvey et al. (1978) após observarem essas ocorrências, e através da literatura da época reconhecer que vírus podem infectar tanto megacariócitos quanto plaquetas, observaram que esse quadro infeccioso não se limitava somente a esses tipos celulares. Sendo assim, eles iniciaram um estudo experimental onde seu objetivo foi descrever manifestações hematológicas e a ultraestrutura de um organismo *Rickettsia*-like com tropismo por replicar-se em plaquetas de cães. Nesse estudo esses autores obtiveram sucesso na infecção experimental desse organismo, além de assim conseguirem descrever as possíveis alterações hematológicas associadas à sua presença (HARVEY et al., 1978). Foi possível descrever que a parasitemia ocorreu de forma cíclica, assim como as trombocitopenias concomitantes, características que marcaram a clínica dessa enfermidade, sendo esses os principais achados encontrados até hoje (HARRUS et al., 1997). Através de microscopia de luz e eletrônica foram observadas exclusivamente em plaquetas subunidades únicas ou múltiplas, às quais denominaram formação de mórulas. Dessa forma, esse estudo sugeriu que esta era uma *Rickettsia*-like, caracterizada por ser uma bactéria intracelular obrigatória e gram-negativa, sendo esta a primeira descrição de *Ehrlichia platys*, ocorrendo na Flórida, EUA (HARVEY et al., 1978).

Na descrição original foram observadas semelhanças morfológicas e biológicas com outra bactéria que infecta cães, *E. canis*, e também com *Anaplasma marginale*, bactéria que acomete bovinos, sendo que ambas, atualmente são classificadas como membros da família Anaplasmataceae (HARVEY et al., 1978; DUMLER et al., 2001). A partir dos estudos moleculares iniciados por Anderson et al. (1992) foi possível analisar a sequência do gene 16S *rDNA*, presente em *A. platys* e através dos estudos de Yu et al. (2001) e Huang et al.

(2005), os autores observaram a sequência de outro gene, *groEL*, também presente nestas bactérias. Recentemente, análise filogenética da sequência do gene 16S *rDNA* mostrou que a espécie bacteriana esteve proximamente relacionada à *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma marginale*, o que levou a reclassificação do gênero, abandonando a antiga denominação de *Ehrlichia platys* e admitindo-se como *Anaplasma platys* (DUMLER et al., 2001).

Anteriormente, esse organismo era reconhecido por pertencer a um grupo de rickettsias do gênero *Ehrlichia*, de importância tanto para a medicina veterinária quanto humana. A propriedade comum desses organismos de invadir e multiplicar dentro de fagossomos ou células fagocíticas faziam com que eles fossem biologicamente intrigantes (BERAN, 1994). Contudo, *Ehrlichia platys* se diferenciava desses microrganismos por acometer especificamente plaquetas.

Na América do Sul, o primeiro relato sobre *A. platys* ocorreu na Venezuela, determinado através de PCR (HUANG et al., 2005). E desde então, outros estudos e o diagnóstico de *A. platys* em diferentes locais do mundo vem sendo realizados (BROWN et al., 2006; ABARCA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2012).

2.2 Posição Taxonômica de *Anaplasma platys*

A espécie *Anaplasma platys* está inserida na seguinte posição sistemática (GARRITY et al., 2006; DUMLER et al., 2001):

Domínio: EUBACTERIA (Haeckel, 1894) C.R. Woese et al., 1990

Filo: PROTEOBACTERIA Garrity et al., 2005

Classe: ALPHAPROTEOBACTERIA Garrity et al., 2006

Ordem: RICKETTSIALES (Gieszczykiewicz, 1939) Dumler et al., 2001

Família: ANAPLASMATACEAE (Philip, 1957) Dumler et al., 2001

Gênero: *Anaplasma* Theiler, 1910

Espécie: *Anaplasma platys* (Harvey et al., 1978) Dumler et al., 2001

2.3 Ciclo Biológico e Formas de Transmissão

O ciclo biológico de *A. platys* ainda não está bem elucidado, contudo sabe-se que uma das características principais desse agente, assim como outros pertencentes à família Anaplasmataceae é a necessidade de parasitar uma célula do hospedeiro, por se tratar de uma bactéria intracelular obrigatória (HARVEY et al., 1978). A célula de predileção deste microrganismo é a plaqueta, no entanto, foi demonstrado que *A. platys* pode infectar promegacariócitos e megacariócitos, células precursoras provenientes da medula óssea (TOMMASI et al., 2014). Este organismo entra na célula através da aderência à superfície seguida por endocitose, e a membrana vacuolar é provavelmente derivada da membrana externa da plaqueta (HARVEY, 2011), e as repetidas fissões binárias do organismo dentro do vacúolo resulta na formação de uma mórula (HARVEY et al., 1978). Como reflexo pela infecção por *A. platys*, a trombocitopenia ocorre de maneira cíclica, com picos e redução da parasitemia (HARVEY et al., 1978), de forma que esse organismo em determinados momentos esteja menos circulante no sangue do animal infectado. Tal fato ocorre em função da remoção efetiva de plaquetas infectadas por macrófagos no fígado, baço, e medula (EDDLESTONE et al., 2007).

Da mesma forma para todos os agentes patogênicos bacterianos intracelulares que formam vesículas ligadas à membrana das células hospedeiras, assim como *E. canis*, formam-se microcolônias dentro vacúolos celulares (mórulas) que abrigam muitos indivíduos (TENG

et al., 2003). Várias estratégias de sobrevivência foram identificadas em vários agentes patogênicos bacterianos intracelulares, tais como o mecanismo de escape de vacúolos, a fuga da fusão do lisossoma, e da tolerância ao ambiente lisossomal (ERNST et al., 1999). Um exemplo dessa estratégia pode ser observado em mórulas de um membro da família Anaplasmataceae, *Neorickettsia risticii* (*E. risticii*) evitando a fusão lisossômica (WELLS; RIKIHISA, 1988). A membrana de mórula, proporciona um ambiente permissivo não só para a sobrevivência, mas também para a replicação (TENG et al., 2003).

Sabe-se que quanto a forma de transmissão poucos estudos relatam de maneira consistente a participação de vetores e outros mecanismos. Contudo, acredita-se que um artrópode esteja envolvido na sua transmissão. Os carrapatos apresentam como característica a capacidade de sobreviver em ambientes diversificados e por longo período sem se alimentar, além de uma ampla distribuição geográfica, fazendo desses ectoparasitos um dos mais importantes em termos de transmissão de doenças (DANTAS-TORRES, 2008).

Acredita-se que a distribuição de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato contribui para o seu envolvimento no ciclo, porém não foi observado ainda se pulgas, principalmente do gênero *Ctenocephalides* podem participar da transmissão, visto que esse parasito também apresenta predileção por cães. A infestação por pulgas em cães e gatos é reconhecida como uma ectoparasitose comum (RUST; DRYDEN, 1997). Sabe-se que a transmissão mecânica por fômites ou dípteros hematófagos ocorre em casos de infecção por *A. marginale*, membro da família Anaplasmataceae que infecta eritrócitos (SOUZA et al., 2001), mas ainda não foi comprovado se as mesmas vias são utilizadas na transmissão de *A. platys*.

2.4 Manifestações Clínicas

Com relação a patogenia em decorrência da infecção por *A. platys* sabe-se que durante a fase aguda há um elevado percentual de plaquetas parasitadas na circulação. Em alguns dias ocorre um decréscimo do número de plaquetas circulantes e a contagem pode chegar a valores inferiores a 20.000 plaquetas/ μ L, resultado da agregação plaquetária (GAUNT et al., 1990), tornando-se mínima a chance de visualização do parasito (SILVA, 2010). Após o desaparecimento dos microrganismos, a plaquetometria volta ao normal em três ou quatro dias. Sete a quatorze dias após o primeiro episódio ocorre outra parasitemia na qual, novamente, o número de plaquetas decresce. O processo cíclico das trombocitopenias e das parasitemias tende a reduzir com o tempo e com a cronificação da doença, resultando em esporádicas aparições do parasito e trombocitopenias moderadas (HIBLER et al., 1986; WOODY; HOSKINS, 1991).

Os principais sinais clínicos dessa doença são depressão, febre e anorexia. Em relação aos achados laboratoriais, trombocitopenia, anemia (DAGNONE et al., 2003), macroplaquetas, e monocitose (HARRUS et al., 1997; ANTOGNONI et al., 2014) são os mais comuns. Sainz et al. (1999) descreve que os sinais e sintomas clínicos da doença podem variar de acordo com a raça do cão, mas fundamentalmente a trombocitopenia cíclica canina pode causar também um enfraquecimento do animal, incluindo letargia, anorexia, febre (TROTTE et al., 2009), dificuldade respiratória, aumento da secreção de muco, secreção ocular purulenta, esplenomegalia, hiperqueratose no focinho (SAINZ et al., 1999), hemorragia petequiral e trombocitopenia severa.

As alterações patológicas são generalizadas incluindo linfadenomegalia, hiperplasia folicular no baço e linfonodos, e aumento da celularidade na medula óssea (BAKER et al., 1987). Por um tempo, a razão do decréscimo na produção de plaquetas não estava esclarecido, já que *A. platys* não havia sido encontrado em megacariócitos (RUSSEL; GRINDEM, 2000). Entretanto, em estudos recentes realizados por Tommasi et al. (2014) demonstraram que *A. platys* pode infectar promegacariócitos e

megacariócitos, os quais são células precursoras das plaquetas, originados a partir de uma célula-tronco pluripotente da medula óssea.

A trombocitopenia ocorre devido à infecção por *A. platys* ter um caráter cíclico, cerca de 10 a 14 dias, e é considerado o resultado da lesão direta às plaquetas pela replicação do patógeno durante a fase inicial da infecção, o que provavelmente desencadeia mecanismos imunológicos subsequentes à infecção (FRENCH; HARVEY, 1983). Apesar da trombocitopenia ser um achado habitual associado com a infecção por *A. platys*, este não é patognomônico da rickettsiose (FERREIRA et al., 2008), e pode incluir *Ehrlichia canis* como diagnóstico diferencial (DAGNONE et al., 2003). Além deste agente, outros podem ser indicados no diagnóstico diferencial para trombocitopenia cíclica canina como: doenças imunomediadas de natureza idiopática; enfermidade secundária a utilização de drogas; neoplasias; doenças infecciosas (cinomose, leishmaniose); reação pós-vacinal e microangiopatias (hemangioma, hemangiossarcoma) (DUMLER et al., 1995; DUMLER et al., 2001; HARVEY, 2006; MACHADO, 2004; MELTER et al., 2007).

Apesar de cães infectados por *A. platys* usualmente apresentarem sintomas brandos ou serem assintomáticos (HARRUS et al., 1997; SILVA, 2010), alguns casos podem ser sérios ou fatais, particularmente quando ocorrem co-infecções com outros organismos (DANTAS-TORRES, 2008; CASTRO et al., 2004).

2.5 Distribuição Mundial

Quanto à distribuição geográfica de *A. platys*, estudos reportaram a ocorrência de cães soropositivos em diferentes áreas dos Estados Unidos (FRENCH; HARVEY, 1983) e na Bélgica (HEYMAN et al., 2007). A detecção molecular de *A. platys* em cães foi reportada em diferentes países, como Brasil (FERREIRA et al., 2007), Grécia (MYLONAKIS et al., 2004), França (INOKUMA et al., 2002a), Espanha (SAINZ et al., 1999), Portugal (CARDOSO et al., 2010), Taiwan (CHANG; PAN, 1996), China (HUA et al., 2000), Japão (INOKUMA et al., 2002b; UNVER et al., 2003), Tailândia e Venezuela (HUANG et al., 2005; SUKSAWAT et al., 2001), Austrália (BROWN et al., 2001; BROWN et al., 2006), e na República do Congo (SANOGO et al., 2003).

2.6 Diagnóstico Laboratorial

Segundo Ferreira et al. (2008), os métodos de diagnóstico mais utilizados para a trombocitopenia cíclica canina são: exame direto de esfregaço sanguíneo para identificação de mórula intra-plaquetária; detecção de anticorpos através de imunofluorescência indireta; ou amplificação de um fragmento de DNA alvo pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). É importante que as técnicas de diagnósticos sejam combinadas com o conhecimento de agentes rickettsiais de maneira a distinguir com maior especificidade os agentes etiológicos que acometem pequenos animais (ANDERSON et al., 1991).

2.6.1 Parasitológico

A técnica de esfregaço sanguíneo corada pelo método de Giemsa ou Romanovsky, e subsequente observação sob aumento de 1000 vezes, permite visualizar mórulas no interior de plaquetas (HARVEY et al., 1978; DUMLER et al., 2001; MIRANDA, 2010). Esta técnica apresenta sensibilidade dependente da carga bacteriana e da experiência do observador e, de maneira geral, sabe-se que a especificidade é alta e a sensibilidade baixa (IQBAL et al., 1994; RAMOS et al., 2009; SOUSA et al., 2009).

Esse é considerado um dos métodos de diagnóstico de *A. platys* mais utilizados, onde a busca por mórulas dentro de plaquetas no esfregaço sanguíneo (FERREIRA et al., 2008b) consiste em uma técnica de baixo custo, relativamente de rápida confecção.

Ramos et al. (2009), Ferreira et al. (2007) e Otranto et al. (2010) utilizaram essa metodologia no diagnóstico desse organismo, e ao compararem com outras técnicas relataram o esfregaço de sangue é uma boa alternativa para o diagnóstico de *A. platys*, mesmo que por vezes ocorra discordância entre técnicas moleculares e exame direto em lâmina e seja demonstrado que a PCR seja mais precisa do que a citologia.

2.6.2 Imunológico

A aquisição de antígenos de *A. platys* é dificultada por esse organismo ser de difícil isolamento e cultivo *in vitro*. Contudo, no Brasil é comercializado um *kit* de diagnóstico qualitativo rápido (SNAP 4Dx, *Idexx Laboratories*), o qual consiste na utilização de um peptídeo sintético baseado na proteína imunodominante P44 de *A. phagocytophilum* como antígeno, podendo detectar anticorpos das classes IgM e IgG a partir de 8 dias pós-infecção (BREITSCHWERDT, 2013). Esse mesmo *kit* detecta anticorpo contra o peptídeo de proteínas p30 e p30-1, referente à *E. canis*. O próprio fabricante deste *kit* e outros trabalhos sugerem que podem ocorrer reações cruzadas (GREENE, 2006; BARR, 2009; BREITSCHWERDT, 2013).

Outro teste sorológico baseado em Imunofluorescência Indireta foi desenvolvido pelo laboratório da Escola de Medicina Veterinária da Universidade do Estado da Louisiana, para detectar anticorpos anti-*A. platys*. Apesar desses dados não terem sido publicados, há relato de reação cruzada ao realizar o teste em amostra proveniente de animal infectado por *A. phagocytophilum* (ALLEMAN; COUTO, 2006).

Em estudo realizado por Lasta et al. (2013), observou-se que mais de 50% dos animais sorologicamente positivos para *A. platys* foram negativos de acordo com a *nPCR*, sugerindo que animais que tiveram expostos previamente a esta bactéria apresentavam anticorpos anti-*A. platys* durante o estudo. Resultados discrepantes entre testes sorológicos e moleculares podem ser explicados pela parasitemia cíclica do agente (FERREIRA et al., 2007, 2008b). Neste estudo, a *nPCR* foi capaz de detectar até 10^3 cópia do gene por reação, revelando que animais com baixo número de cópias do DNA de *A. platys* não foram detectados através desta técnica, possivelmente promovendo um resultado falso negativo (LASTA et al., 2013).

2.6.3 Molecular

A tecnologia baseada em análises moleculares está tendo um grande impacto em muitas áreas de parasitologia veterinária. Em particular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem encontrado ampla aplicabilidade, porque a sua sensibilidade permite a amplificação enzimática de fragmentos de genes a partir de pequenas quantidades de ácidos nucleicos derivados de quantidades limitadas de material do parasito (GASSER, 1999).

Essa tecnologia tem demonstrado sua utilidade na identificação de parasitos, caracterização molecular, o diagnóstico de infecções por parasitos, o isolamento e caracterização de genes expressos, e a detecção de resistência a drogas (GASSER, 1999).

Estudos moleculares têm sido desenvolvidos para o diagnóstico de *A. platys*, como as reações do tipo *nested* (*nPCR*) usada por Martin et al. (2005) e Abarca et al. (2007), as quais demandam longo tempo para o diagnóstico devido à necessidade de dois processos de termociclagem, ao processo pós-amplificação, além do risco de contaminação inerente à técnica (PUSTERLA et al., 1999). A PCR em tempo real (*qPCR*) foi previamente utilizada para detectar a infecção por *A. platys* (GAUNT et al., 2010), mas esse ensaio se baseou no

polinucleotídeo *p44*, que codifica a proteína de superfície de membrana P44 (LIN et al., 2003). Este fragmento é variável, e por essa razão, é importante pesquisar novas sequências alvos para permitir um diagnóstico preciso deste hemoparasito. Eddlestone et al. (2007) também estabeleceram um ensaio de qPCR através de sonda de hidrólise para o diagnóstico de *A. platys*, e seu alvo foi o gene 16S *rDNA*. Esse estudo objetivou detectar o fragmento do DNA de *A. platys*, durante a fase aguda da doença, em amostras de cães infectados experimentalmente. Além do DNA extraído a partir de amostras de sangue, foram também adquiridas amostras provenientes de baço e medula óssea desses animais. Segundo Eddlestone et al. (2007), uma das suas principais observações foi que esses tecidos podem ser considerados amostras adicionais para o diagnóstico de *A. platys* em cães através da qPCR, particularmente quando amostras de sangue foram negativas em fases agudas da infecção (EDDLESTONE et al., 2007).

O uso de oligonucleotídeo universal de amplo espectro associado com o sequenciamento permite caracterizar organismos rickettsiais que muitas vezes são sensíveis ou não-cultiváveis (ANDERSON et al. 1991), como no caso de *A. platys*.

Para a detecção de *A. platys* através de técnicas moleculares deve-se considerar os aspectos clínicos que essa enfermidade desencadeia. Dentre eles, a trombocitopenia, que ocorre de maneira cíclica, e imediatamente após as fases de pico e desaparecimento da parasitemia (HARVEY et al., 1978), logo o DNA dessa bactéria deve estar menos presente no sangue nessa etapa da infecção. Isso pode ocorrer devido a remoção efetiva de plaquetas infectadas por macrófagos no fígado, baço e medula (EDDLESTONE et al., 2007).

Quanto à técnica molecular em particular, existem alguns pontos que são importantes para que esta seja funcionalmente satisfatória, como o preparo da amostra para o adequado isolamento e purificação do ácido nucléico (GASSER, 1999). Além disso, para o estabelecimento de qualquer procedimento de PCR são importantes as implementações de precauções rigorosas em laboratório para evitar a contaminação (YAP et al., 1994) e a otimização do protocolo de amplificação (INNIS; GELFAND, 1990).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de diagnosticar a infecção por *A. platys* em cães ou carrapatos em diversas localidades (RAMOS et al., 2014; HUA et al., 2000; INOKUMA et al., 2002a; SANOGO et al., 2003; BROWN et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; OTRANTO et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2013; SPARAGANO et al., 2003), usando como alvo os genes 16S *rDNA*, *gltA*, *GroEL*.

2.7 Tratamento

O prognóstico da trombocitopenia cíclica canina normalmente é favorável, visto que *A. platys* não é um microrganismo considerado patogênico. O tratamento com antibióticos adequados é geralmente bem sucedido depois de quatro semanas. A doxiciclina é considerada um dos antibióticos eficazes (SAINZ et al., 1999).

De acordo com Azevedo (2013) a terapêutica tanto da trombocitopenia cíclica canina quanto da ehrlichiose monocítica canina se faz com o uso de antibióticos, sendo a doxiciclina o fármaco de eleição. No Brasil, seu uso é comumente realizado duas vezes ao dia, durante 21 dias, na dose de 10mg/kg. Este autor ao avaliar diferentes metodologias na terapêutica desses organismos, observou que a eficácia do tratamento com doxiciclina (20 mg/Kg VO SID por 28 dias) e com oxitetraciclina de longa ação (LA) (20 mg/Kg IM a cada 7 dias por 28 dias) foi comprovada através de ensaios de PCR, associados a normalização dos parâmetros hematológicos. Contudo, foram observadas elevações significativas da atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) e uremia nos animais tratados com oxitetraciclina, indicando um possível efeito tóxico deste fármaco para os cães a longo prazo (AZEVEDO, 2013). Em contrapartida, na Turquia, Ulutas et al. (2007) realizaram tratamento de animal infectado por

esse parasito com 5 mg/kg doxiciclina duas vezes ao dia, por 21 dias, sendo observada resposta ao tratamento dentro das primeiras 48 horas.

Antibióticos da família das tetraciclinas como o hclato de doxiciclina e a tetraciclina são os medicamentos de escolha para o tratamento das infecções causadas por *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *A. platys* (MIRANDA, 2010). Esses antibióticos apresentam ação bacteriostática, de amplo espectro (WALKER et al., 2012) e são semi-sintéticos sendo, a tetraciclina de ação curta, e a doxiciclina de ação longa. A doxiciclina por ser lipossolúvel apresenta ampla distribuição nos tecidos (VALENTÍN et al., 2009).

Ainda, este fármaco demonstrou restaurar a habilidade fagocítica do hospedeiro, provavelmente por inibir a proteína bacteriana de retardo de fusão do lisossomo com o fagossomo (GREENE, 2006).

Segundo Maggi et al. (2013), para o tratamento de *A. platys* em humanos a doxiciclina apresentou redução da longevidade dessa bactéria e foi eficiente. Porém, para alcançar uma melhora sintomática e resultado negativo através de PCR em amostras de sangue proveniente da paciente foram necessários 6 meses de antibioticoterapia (MAGGI et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Padronização da PCR em Tempo Real (qPCR)

3.1.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores e sonda de hidrólise

Os oligonucleotídeos iniciadores (oligoiniciadores) e a sonda foram desenhados utilizando o “software” Primer Express 3.0 baseado no alinhamento de sequências do gene *gltA* de *A. platys* disponível no “Genbank” (EU516387, AB058782, KC342665, JN121381, DQ525688, DQ525687, DQ525686, AY077620, AY530807, AF478130). As sequências do gene *gltA* de *Ehrlichia canis* (AY647155), *Anaplasma phagocytophilum* (AY464138), *Ehrlichia ewingii* (DQ365879) e *Ehrlichia chaffeensis* (AF304142) foram acrescentadas ao alinhamento para a escolha de regiões específicas de *A. platys*. O “software” Primer Express foi configurado para que os oligonucleotídeos iniciadores tivessem uma temperatura de dissociação de 60°C admitindo até 2 graus de diferença entre eles. As características dos oligonucleotídeos iniciadores foram testadas usando o “software” Oligo Explorer 1.2 e a especificidade dos foi testada inicialmente através da ferramenta primerBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

3.1.2 Controle positivo

Sangue controle positivo foi obtido de um cão sintomático com inclusões em plaquetas (“Genbank” ID: FJ755157). Inicialmente um fragmento de 580 pb do gene *gltA* de *A. platys* foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *gltA84F* (5'-TGGCGCAGTATACCCTTTTCTC-3') e *gltA69R* (5'-AACAGCGACCGTGCGG-3'). A reação foi realizada em volume final de 25 µL contendo: 2,5 µL do tampão da PCR (10mM Tris-Cl; pH=8,3; 50mM KCl, Invitrogen®), 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂ - 50 mM, Invitrogen®), 0,4 mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100mM) (Invitrogen®), 0,4 µM dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,0 U de *Platinum* Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) e 3 µL de DNA total (300 ng/µL). Água livre de Nuclease (Ambion®) foi usada como controle negativo.

O produto da PCR foi purificado com o uso do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, Madison, WI, EUA), e em seguida clonados e sequenciados (SANGER et al., 1977). A clonagem foi realizada em vetor pGEM-T® Easy Vector System (Promega®, Madison, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial dos clones positivos foram isolados pelo kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Invitrogen®, Carlsband, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA plasmidial contendo o inserto de 580pb do gene *gltA* de *A. platys* foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop ND-2000®, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A concentração serviu como ponto de partida para a obtenção da quantidade de moléculas (Plasmídeo + Inseto) por microlitro, seguindo a fórmula descrita abaixo:

$$NC = \frac{Xg/\mu L \text{ de DNA}}{\text{Tamanho do clone em pb} \times 649} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Tamanho do clone em pb x 649

Onde: NC= Número de cópias por microlitro; Clone = Plasmídeo + Inseto; 649 = Massa molecular média de 1pb de DNA; 6,022 10²³= Número de Avogrado.

Como controle positivo nas reações de PCR em tempo real foi utilizada a penúltima diluição do limite de detecção.

3.1.3 Otimização da concentração de oligoiniciadores e sonda de hidrólise

A otimização da concentração dos oligoiniciadores e sonda, foi realizada com DNA controle positivo obtido no item 3.1.2. As concentrações de oligoiniciadores testadas foram: 300 nM, 600 nM e 900 nM em nove condições descritas na tabela 1. Foi preparada uma PCR com quatro réplicas de cada uma das nove condições de acordo com protocolo comercial (“Getting Started Guide” do “software” Primer Express® 3.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Reações de 20 µL foram realizadas utilizando 1X de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 3 µL do DNA controle positivo (300 ng/µL). As condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, uma curva de dissociação foi adicionada para verificar a especificidade da reação. A concentração ótima dos oligoiniciadores foram as concentrações mínimas que obtiveram o menor “cycle quantification” (Cq) e máximo ΔRn (“Reporter” normalizado) na ausência de picos de temperatura de dissociação (Tm) inespecíficos em relação ao controle positivo utilizado.

Após a padronização da concentração ótima de oligoiniciadores, a concentração ideal de sonda a ser utilizada na qPCR foi determinada. A sonda foi marcada na extremidade 5’ com o “reporter dye” FAM e na extremidade 3’ com o “quencher” TAMRA. Para determinar a concentração ótima de sonda, ensaios foram realizados através da execução de quatro réplicas nas concentrações de 50 nM, 100 nM, 150nM, 200 nM e 250 nM. A PCR para determinar a concentração ótima de sonda foi realizada em volume final de 20 µL contendo 1X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 600 nM de cada oligoiniciador, 3 µL (100 ng/µL) do DNA de *A. platys*, e a respectiva concentração de sonda. A seleção da concentração ótima de sonda para a qPCR foi baseada no resultado de menor Cq e máximo ΔRn obtidos no ensaio de detecção do alvo.

Tabela 1. Condições para o teste de otimização da concentração dos oligoiniciadores

Oligoiniciador		Anti-sensu		
		300 nM	600 nM	900 nM
Sensu	300 nM	300/300 nM	300/600 nM	300/900 nM
	600 nM	600/300 nM	600/600 nM	600/900 nM
	900 nM	900/300 nM	900/600 nM	900/900 nM

3.1.4 Sensibilidade e especificidade analítica da qPCR para *Anaplasma platys*

A sensibilidade analítica da qPCR foi avaliada através do uso de diluições decimais seriadas do amplicon clonado dentro de um plasmídio (pGEM®-T Easy Vector System). A concentração e pureza do DNA plasmidial foram verificadas usando um espectrofotômetro (Nanodrop ND-2000®). O número de cópias do plasmídio versus valores de Cq foram plotados para determinar a sensibilidade analítica da qPCR baseada em tecnologia comercial (TaqMan® Technology, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O número de cópias variou de 1 a 1×10^4 por μL , com cinco séries de diluições separadas realizadas para cada ponto da curva em triplicata. Esse ensaio foi realizado usando um reagente de controle interno positivo (Exo IPC / TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents (sonda VIC™), Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que contém uma sonda marcada com um “reporter dye” (VIC™, TaqMan® Technology, Applied Biosystems) e um “quencher” (TAMRA™ - carboxitetrametilrodamina, TaqMan® Technology, Applied Biosystems). A regressão linear, juntamente com o coeficiente de determinação (R^2) formado após a determinação de cada ponto da curva, pode ser utilizado para avaliar se o ensaio de qPCR foi otimizado.

Para avaliar a influência da presença do controle interno na sensibilidade analítica, uma reação com as mesmas especificações descritas acima foi realizada, contudo sem a adição do Exo IPC.

A eficiência de cada reação foi determinada considerando o *slope* da curva padrão usando a seguinte fórmula: [Eficiência = $10^{(-1/\text{slope})} - 1$] (SVEC et al., 2015).

- Seleção das amostras para a análise da especificidade da qPCR para *A. platys*:

A especificidade do ensaio foi avaliada usando DNA de organismos relacionados e outros patógenos transmitidos por carrapatos como os seguintes: *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma marginale*, *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Theileria equi*.

Anaplasma phagocytophilum, *Neorickettsia risticii*, e *Rickettsia rickettsii* foram obtidos de cultura celular. O DNA de *A. phagocytophilum* extraído a partir da cultura celular foi submetido a qPCR (SANTOS et al., 2011), e através desta técnica foi quantificado de acordo com a equação gerada pela curva padrão [$f(x) = -3,38x + 37,52$], considerando o Cq 18,77, totalizando 352644,63 cópias. O DNA de *N. risticii* foi obtido cultura celular com taxa de infecção de 80% proveniente de um kit sorológico comercial de Imunofluorescência Indireta (IFI – Fuller Laboratories®, CA, EUA). O DNA de *R. rickettsii* extraído a partir da cultura celular foi submetido a qPCR (STENOS et al., 2005), e através desta técnica foi quantificado de acordo com a equação gerada pela curva padrão [$f(x) = -3,49x + 35,17$], considerando o Cq 23,21, totalizando 2672,60 cópias.

O DNA de *Anaplasma marginale* foi obtido de uma amostra de sangue proveniente de um bovino naturalmente infectado; *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis* e *Hepatozoon canis* obtidos de amostras de sangue de cães naturalmente infectados; e *Theileria equi* obtidos de uma amostra de sangue de equino naturalmente infectado. Todas as amostras de sangue foram obtidas de animais com alta parasitemia, em fase aguda, com infecção diagnosticada através de microscopia e confirmada através de ensaio molecular específico (DE ECHAIDE et al., 1998; FÖLDVÁRI et al., 2005; KIM et al., 2008; MURPHY et al., 1998; OTRANTO et al., 2011).

Quanto a amostra positiva para *E. canis*, agente este pertencente a família Anaplasmataceae, a mesma também foi submetida a reação de qPCR (BANETH et al., 2009), e através desta técnica foi quantificado de acordo com a equação gerada pela curva padrão [$f(x) = -4,74x + 50,84$], considerando o Cq 21,10, totalizando 1880449,19 cópias.

Análise “in silico” usando o algoritmo primerBLAST (NCBI, Bethesda DM, EUA) como ferramenta, permitiu observar que os oligoiniciadores desenhados nesse estudo não foram específicos para o DNA de *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis* e *Theileria equi*.

3.2 Amostragem

No período de junho de 2011 a junho de 2012, foi realizada uma amostragem não probabilística de 186 amostras de sangue de cães domésticos do estado do Rio de Janeiro. As

amostras foram coletadas através de venopunção cefálica, e alocadas em tubos estéreis contendo ácido etileno-amino-tetracético (EDTA). Essas amostras foram utilizadas com o objetivo de determinar o desempenho da PCR em tempo real (qPCR) comparada à análise de esfregaço sanguíneo e a *nested* PCR (*nPCR*, 16S *rDNA*).

As amostras de sangue foram alíquotadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL e mantidas a -80°C até o momento da extração do DNA total.

3.2.1 Extração do DNA total

O DNA genômico foi extraído a partir de 300 µL de cada amostra sanguínea de cão usando kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega®, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, e eluído em 100 µL da solução de reidratação que acompanha o kit. Posteriormente, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND-2000).

3.2.1.1 Padronização das alíquotas de DNA a serem utilizadas na qPCR

Visando padronizar as amostras de DNA a serem utilizadas na avaliação do desempenho da qPCR para o diagnóstico de *A. platys*, adotaram-se nesse estudo duas metodologias afim de avaliar a capacidade da técnica molecular detectar o alvo em amostras com concentrações padronizadas e em amostras com diferentes concentrações.

- Avaliação 1:

Em uma das metodologias, todas as amostras quantificadas foram diluídas a 100 ng/uL. Contudo, aquelas que se encontravam abaixo desta concentração adotada foram descartadas desse grupo de avaliação, totalizando 127 amostras a serem testadas na qPCR, todas a 100 ng/uL.

- Avaliação 2:

Das 186 amostras quantificadas, 68,3% (n=127) que se encontravam em elevadas concentrações de DNA, foram diluídas de maneira a ficarem a 100ng/uL. As demais amostras (n=59), que se encontravam abaixo de 100 ng/uL foram alíquotadas sem sofrerem diluição e incluídas na avaliação da performance da qPCR. Logo, as 186 amostras utilizadas nessa avaliação estiveram diluídas até 100 ng/uL.

Tal metodologia foi empregada em razão do efeito que a doença causa nos animais infectados, como a marcada trombocitopenia cíclica que caracteriza essa enfermidade, e adicionais quadros de anemia e leucopenia (ZAVALA et al., 2007; HARRUS et al., 1997; WOODY; HOSKINS, 1991; SOUSA et al., 2009). Desta forma, esta metodologia objetivou incluir animais que possivelmente estivessem infectados por *A. platys* e com baixa contagem celular, conseqüentemente baixa concentração de DNA na quantificação da amostra proveniente do sangue extraído.

3.2.2 O ensaio de PCR em tempo real (qPCR)

As reações foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *gltA84F* (5'-GACCTACGATCCGGGATTCA-3') e *gltA84R* (5'-TGGCGCAGTATACC CTTTTCTC-3'), e a sonda PLATYSp (5'-FAM-TCTACCGCGGCATGCAGCTCTG-TAMRA-3'). As reações foram realizadas em duplicata no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em volume final de 20 µL, contendo: 1X de Universal PCR Master Mix

(Applied Biosystems), 600 nM de cada oligoiniciador, 250 nM da Sonda e 3 µL do DNA (300 ng).

Com o objetivo de detectar a presença de inibidores nas reações de qPCR um controle interno exógeno (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents VIC™ Probe) com sonda marcada com o *reporter dye* VIC™ e *quencher* MGB foram adicionados na reação de acordo com as instruções do fabricante. As condições de termociclagem foram: 52°C por 2 minutos (ativação da Uracil N-Glycosylase), 95°C por 10 minutos (ativação da *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* e desnaturação) e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 1 minuto. Amostras foram consideradas quando positivas em duplicatas com *Cq* menor que 40 ciclos.

3.2.3 Cuidados tomados para evitar contaminações

Todas as precauções foram adotadas para evitar contaminações, como o uso de ponteiras com filtro em todas as etapas e cada procedimento foi realizado em locais distintos. Além disso, um tubo com todos os reagentes da PCR foi incluído na reação, e o volume de DNA da amostra foi substituído por água ultrapura. A PCR foi realizada em um aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System, considerado um sistema fechado, reduzindo ao mínimo a contaminação.

3.2.4 Nested PCR (nPCR)

As mesmas amostras testadas pela qPCR foram submetidas a nPCR, baseado na descrição de Martin et al. (2005) usando oligoiniciadores com alvo no gene 16S *rDNA*. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de Agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi de 60 minutos a 90 volts (5V/cm), em seguida os géis foram corados com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia).

3.3 Avaliação do Esfregaço Sanguíneo

As amostras de sangue coletadas para este estudo, foram usadas para a confecção de esfregaços sanguíneos. Essas lâminas foram fixadas em metanol, coradas com Giemsa, e submetidas à microscopia óptica com objetiva de imersão (1000x) para possibilitar a visualização direta de inclusões basofílicas em plaquetas. Aproximadamente 100 campos foram avaliados por lâmina.

3.4 Análise Estatística

Para comparar as técnicas utilizadas para o diagnóstico de *A. platys* foi utilizado o teste de McNemar, com o objetivo de medir as proporções de discordância entre a qPCR e os outros testes avaliados. Foi considerada discordância não significativa aqueles que apresentaram $p > 0,05$.

Foi utilizada a Correlação de Spearman a 5% de significância (dados não-paramétricos) para analisar a relação entre a contagem de leucócitos a partir de hemograma de cada animal e o respectivo DNA total extraído.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Biostat 5.0 (AYRES, 2007).

3.5 Considerações Éticas

Estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ (COMEP/UFRRJ), número de protocolo 363/2013, número de processo 23083.003990/2013-93 e sob número de protocolo 001/2014 do Comitê de Ética no Uso de Animais desta mesma Universidade. Todos os comprovantes das aprovações encontram-se em anexo.

4 RESULTADOS

Após o desenho dos oligoiniciadores e sonda a partir de dados já depositados no *GenBank*, observou-se que as sequências apresentaram especificidade ao alvo desejado quando comparada as sequências de outros membros da família Anaplasmataceae (Figura 1).

	Oligoiniciador Sensu	Sonda	Oligoiniciador Anti-sensu
A. platys EU516387	TGACCTACGATCCGGGATTTCATG	CTACTACCGCGGCATGCAGCTCTGAGATAACCTTTATCGACGG	GAGAAAAGGGTATACTGCGCCA
A. platys AB058782			
A. platys KC342665			
A. platys JN121381			
A. platys DQ525688			
A. platys DQ525687			
A. platys DQ525686			
A. platys AY077620			A
A. platys AY530807			A
A. platys AF478130			A
A. phagocytophilum AY464138	C A T C T T C T T T C T T T A A T T C T T A C T A C T A C T A T T		
E. canis AY647155	A T T A T T T T T T T G A G C A T T A T T G A T G T A T A T T		
E. chaffeensis AF304142	A T T A T T T T T T T T G A A A G T A A T T T G A T A T T A T T T		

Figura 1. Alinhamento dos nucleotídeos referente fragmento do gene *gltA* de *A. platys*. Em amarelo: oligoiniciador sensu; em vermelho: sonda; em azul: oligoiniciador anti-sensu.

Durante a padronização da qPCR foi observado que a concentração ótima de ambos oligonucleotídeos iniciadores (oligoiniciadores sensu e anti-sensu) foi de 600 nM, alcançando um *Cq* médio de 16,98 no controle positivo (tabela 2).

Tabela 2. Determinação do valor médio de *Cq* e ΔRn em relação as diferentes concentrações dos oligoiniciadores (*gltA*: 84F e 84R; sensu e anti-sensu) avaliadas durante a padronização da qPCR

Oligoiniciadores	SENSU						
	300 nM		600 nM		900 nM		
	<i>Cq</i>	ΔRn	<i>Cq</i>	ΔRn	<i>Cq</i>	ΔRn	
ANTI-SENSU	300 nM	20,07	0,900	17,57	2,303	17,83	2,247
		20,49	0,857	17,51	2,323	17,86	2,182
		20,47	0,901	17,6	2,302	17,70	2,258
	Média	20,34	0,890	17,56	2,31	17,80	2,23
	600 nM	17,59	1,982	16,96	3,155	17,15	3,51
		17,64	2,002	16,98	3,088	16,92	3,701
		17,51	2,016	17	3,154	16,83	3,868
	Média	17,58	2,000	16,98	3,13	16,97	3,693
	900 nM	17,25	2,148	17,37	3,624	16,56	3,981
17,52		2,098	17,15	3,659	16,78	3,532	
17,42		2,175	16,91	3,708	16,71	3,967	
Média	17,40	2,140	17,14	3,660	16,68	3,830	

Cq: Cycle quantification; ΔRn : Reporter normalizado.

A concentração 900 nM/900 nM (sensu/anti-sensu) também apresentou excelentes resultados quanto ao Cq médio obtido (16,68), além de um valor médio de ΔRn de 3,830. Contudo, ao analisarmos a curva de dissociação dos oligoiniciadores observou-se que apesar desta concentração apresentar ΔRn superior (Figura 2), ocorreu dimerização de oligoiniciadores, como pode ser observado na figura 3.

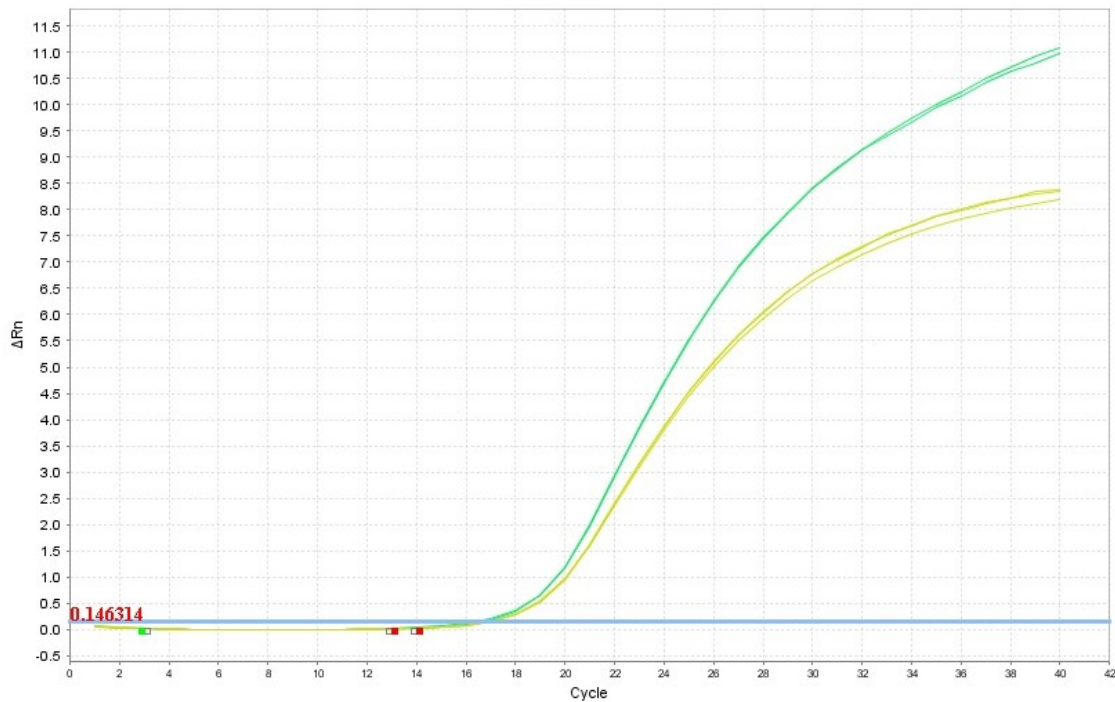


Figura 2. Curva de amplificação do DNA alvo (*gltA*) a partir do controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 600 nM/600 nM (amarelo) e de 900 nM/900 nM (verde).

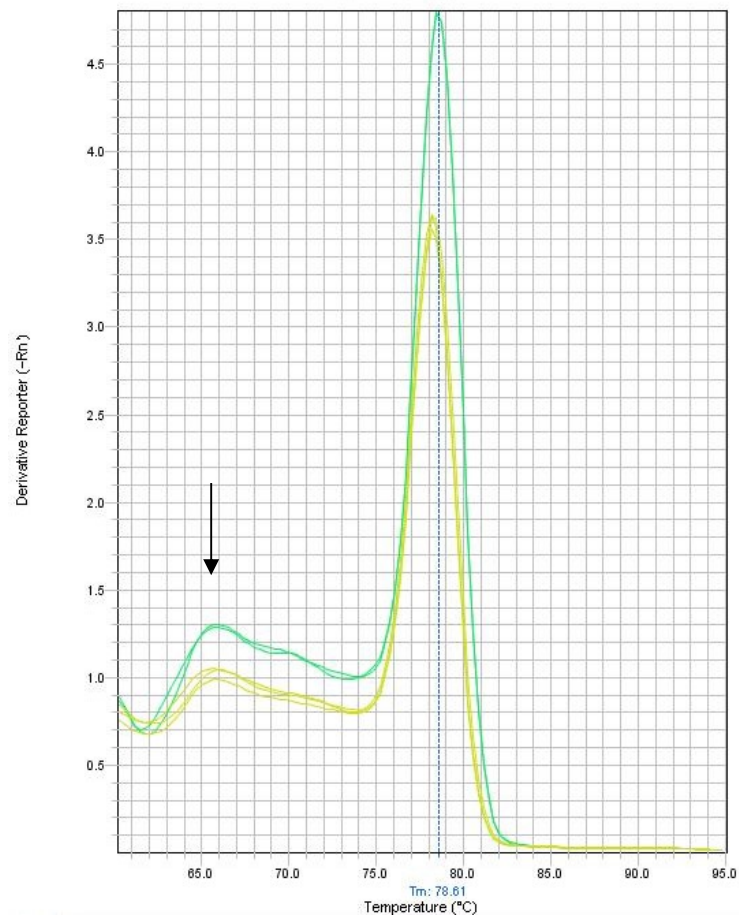


Figura 3. Curva de dissociação a partir da amplificação de um fragmento de 84 pb do gene *gltA* no controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 600 nM/600 nM (amarelo) e de 900 nM/900 nM (verde). Pico de dimerização (seta).

A partir da padronização das concentrações de oligoiniciadores ideais (600 nM/600 nM) para a qPCR, a concentração de sonda foi avaliada, onde, a concentração de 250 μ M de sonda alcançou um Cq de 16,33 no controle positivo (tabela 3), obtendo-se o maior ΔRn em menor valor médio de Cq .

Tabela 3. Determinação do valor médio de *Cq* e ΔRn em relação as diferentes concentrações da sonda (PLATYSp) avaliadas durante a padronização da qPCR

[] SONDA	<i>Cq</i>	ΔRn
50 μM	20,50	0,836
	20,32	0,854
	20,32	0,851
Média	20,38	0,847
100 μM	19,12	1,223
	19,25	1,215
	19,16	1,219
Média	19,17	1,219
150 μM	17,74	2,332
	17,84	2,338
	17,53	2,344
Média	17,70	2,338
200 μM	17,12	3,093
	17,07	3,034
	17,02	3,002
Média	17,07	3,043
250 μM	16,41	4,789
	16,32	4,842
	16,26	4,903
Média	16,33	4,845

Cq: Cycle quantification; ΔRn : Reporter normalizado.

Entre as amostras testadas na qPCR, 17,20% (n=32/186) foram positivas, enquanto na nPCR somente 13,98% (n=26/186) amplificaram o fragmento de DNA alvo. O *Cq* médio observado nas amostras positivas foi de $28,83 \pm 6,48$ ciclos variando de 18,79 a 38,58 ciclos. Em todas as reações, o controle interno utilizado no estudo amplificou adequadamente. Em todas as reações, o Exo IPC amplificou adequadamente produzindo um valor médio de *Cq* de $27,77 \pm 0,06$, de 27,71 a 27,90 ciclos.

O limite de detecção da técnica foi de 1 cópia plasmidial contendo o fragmento do gene *gltA* de *A. platys* em ambas as curvas testadas.

O coeficiente de determinação das cinco diluições testadas na curva padrão foi de 99%, com *Cq* variando de $23,66 \pm 0,17$ ciclos na primeira diluição (1×10^4 cópias de plasmídeo) a $37,77 \pm 0,35$ na última diluição (1 cópia de plasmídeo) (Figura 4). As curvas com Exo IPC tiveram o mesmo desenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 96,06%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos.

Em relação a curva sem o Exo IPC, o mesmo desenho durante a fase exponencial foi observado, mas a eficiência da reação foi de 101,80%. O coeficiente de determinação das cinco diluições testadas na curva padrão sem Exo IPC foi de 99%, com *Cq* variando de $23,52 \pm 0,10$ ciclos na primeira diluição (1×10^4 cópias de plasmídeo) a $36,88 \pm 0,40$ ciclos na última diluição (1 cópia do plasmídeo) (Figura 5). Como antes, mesmo em pontos com poucos alvos, a reação foi eficiente.

De acordo com a equação gerada pela curva padrão, a detecção do número de cópias de *A. platys* nas amostras analisadas pela Avaliação 2 (considerando todas as amostras, sem exclusão de amostras abaixo de 100 ng/ μ L) variaram de 1 a 234.188 com valores de *Cq* de 38,58 e 18,79, respectivamente (Tabela 4).

Quando a especificidade da qPCR foi avaliada em relação a outros patógenos transmitidos por carrapatos, somente nas amostras contendo o DNA de *A. platys* foram observadas ampliações.

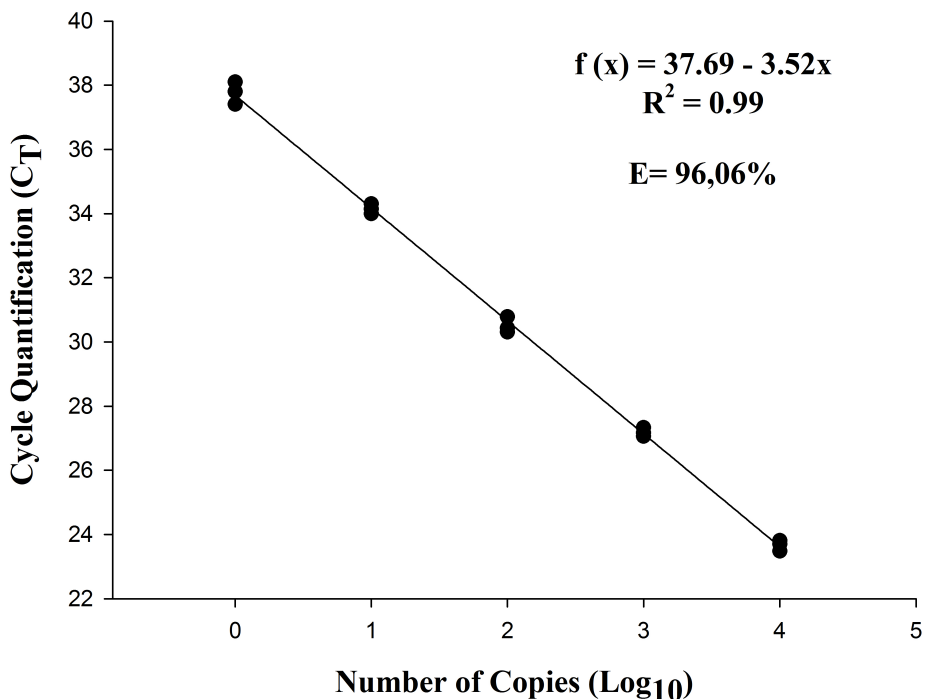


Figura 4. Curva padrão com Exo IPC plotada a partir de diluições seriais decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do gene *gltA* de *Anaplasma platys*. O valor de *Cq* obtido pela qPCR utilizando sonda de hidrólise foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios.

Tabela 4. Relação entre a quantificação do ciclo (*Cq*) e o número de cópias do fragmento do gene *gltA* de *Anaplasma platys* obtidos da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) usando amostras de cães naturalmente infectados

Amostras positivas	Volume de sangue (µL)	Quantificação do DNA (ng/µL) *	<i>Cq</i>	Número de cópias de DNA de <i>A. platys</i> baseado no <i>Cq</i>
96	300	83,4	18,79	234188,30
185	300	369,5	18,91	216173,62
112	300	153,0	19,37	160051,47
183	300	89,7	19,52	145143,93
154	300	152,7	20,45	79260,74
84	300	218	21,09	51933,87
179	300	171,4	21,31	44948,81
20	300	294,0	24,04	7562,98
27	300	72,2	24,75	4743,92
164	300	102,4	24,96	4141,09
46	300	433,1	25,48	2951,83
55	300	3,3	26,05	2025,03

Tabela 4. Continuação

94	300	378,6	26,15	1898,49
36	300	136,8	26,83	1214,79
178	300	69,1	26,85	1199,11
50	300	19,7	27,16	981,56
60	300	48,0	29,41	224,65
184	300	198,3	29,81	173,34
181	300	239,6	30,25	130,11
155	300	104,7	31,56	54,98
47	300	288,2	31,97	42,07
95	300	64,2	33,70	13,56
31	300	3,0	33,79	12,86
4	300	71,6	34,21	9,73
114	300	406,5	34,53	7,90
25	300	82,8	35,36	4,60
122	300	88,0	37,16	1,42
44	300	285,8	37,33	1,26
3	300	40,8	37,73	0,97
5	300	541,0	37,76	0,96
48	300	46,6	37,83	0,91
2	300	17,0	38,58	0,56

Cq: Cycle quantification; *Quantificação do DNA total extraído a partir de 300 µL de sangue, através de espectrofotômetro (Nanodrop 2000®).

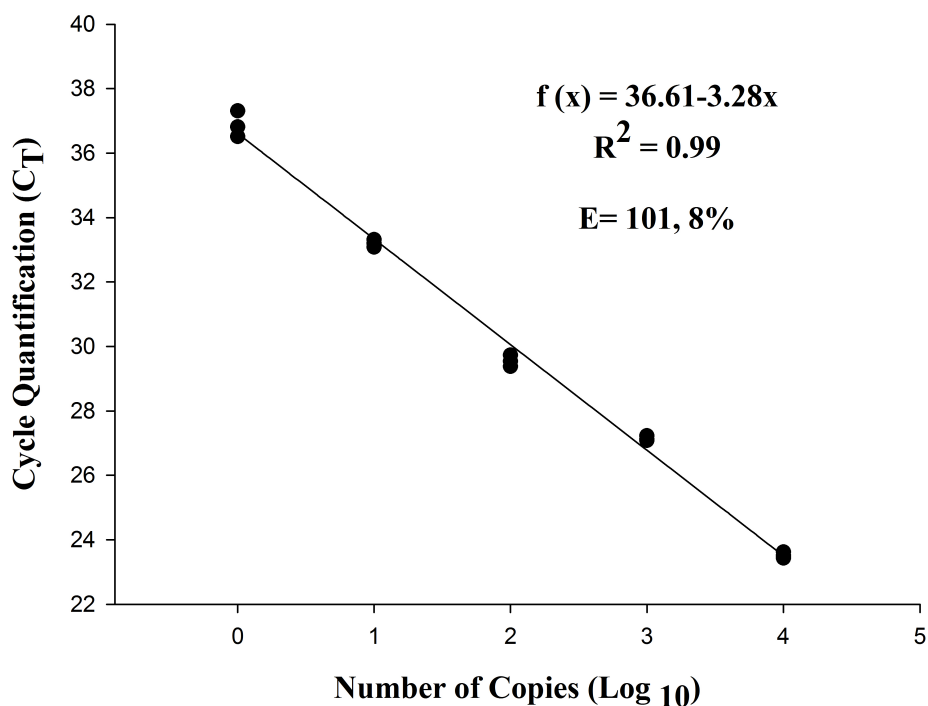


Figura 5. Curva padrão sem Exo IPC plotada a partir de diluições seriais decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do gene *gltA* de *Anaplasma platys*. O valor de *Cq* obtido

pela qPCR utilizando sonda de hidrólise foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios.

Quando seguimos a metodologia de avaliação 1 referente a padronização da diluição do DNA extraído, onde foram consideradas na análise da qPCR somente amostras quantificadas a 100 ng/μL, observamos que todas as amostras positivas na nPCR foram também positivas na qPCR. No entanto, a nPCR não detectou o DNA alvo em duas amostras positivas na qPCR ($p = 0,5000$), resultado sem significância estatística (Tabela 5). Contudo, os resultados da qPCR comparados com os resultados do esfregaço sanguíneo (Tabela 5), apresentaram uma diferença significativa ($p = 0,0311$) dentro dos pares discordantes.

Com relação a avaliação 2, obtivemos um resultado distinto da avaliação 1. Apesar de todas as amostras positivas na nPCR terem sido positivas na qPCR, a nPCR não detectou o DNA alvo em seis amostras positivas na qPCR ($p = 0,0313$) (Tabela 6). Da mesma forma, os resultados da qPCR comparados com os resultados do esfregaço sanguíneo (Tabela 6), apresentaram uma diferença significativa ($p = 0,0455$) dentro dos pares discordantes.

Tabela 5. Análise da discordância entre os testes qPCR e nPCR, bem como qPCR e esfregaço sanguíneo, comparando os resultados obtidos quando amostras de DNA de cães diluídas a 100ng/uL foram submetidas ao diagnóstico de *A. platys* neste estudo, considerando a avaliação 1 da metodologia de padronização da extração de DNA

Teste diagnóstico		nPCR		Esfregaço sanguíneo	
		+	-	+	-
qPCR	+	15	2	8	9
	-	0	110	22	88
p-valor		p = 0,5000		p = 0,0311*	

* $p < 0,05$ = discordância significativa entre os testes (McNemar).

Tabela 6. Análise da discordância entre os testes qPCR e nPCR, bem como qPCR e esfregaço sanguíneo, comparando os resultados obtidos quando amostras de DNA de cães diluídas até 100ng/uL foram submetidas ao diagnóstico de *A. platys* neste estudo, considerando a avaliação 2 da metodologia de padronização da extração de DNA

Teste diagnóstico		nPCR		Esfregaço sanguíneo	
		+	-	+	-
qPCR	+	26	6	15	17
	-	0	154	32	122
p-valor		p = 0,0313*		p = 0,0455*	

* $p < 0,05$ = discordância significativa entre os testes (McNemar).

Do total de amostras, 25,27% (n = 47/186) apresentaram inclusões basofílicas sugestivas de parasitismo em plaquetas na avaliação do esfregaço sanguíneo (Figura 6). No entanto, entre essas amostras, somente 33,91% (n = 15/47) foram positivas para *A. platys* em qPCR (Tabela 6).

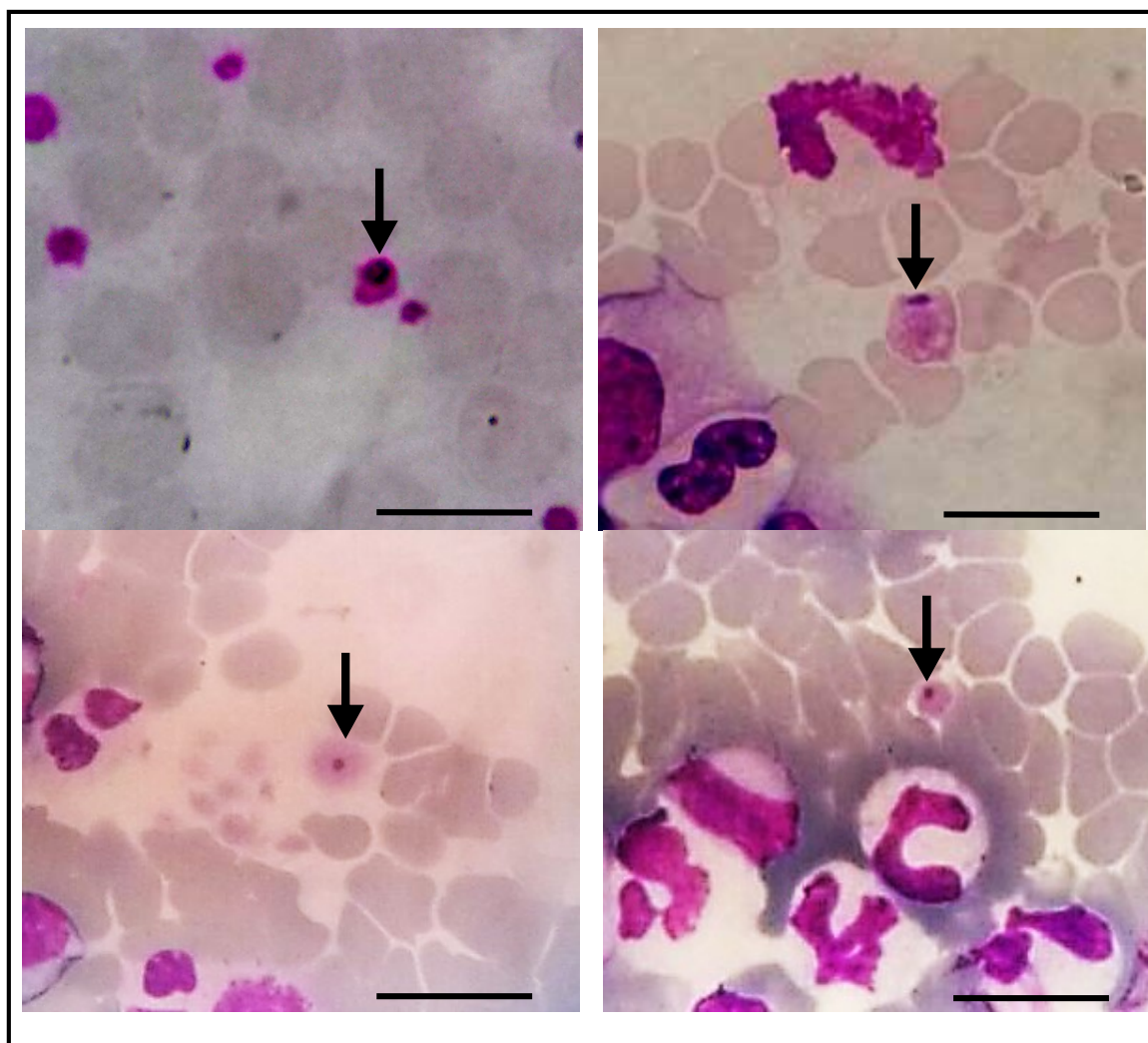


Figura 6. Inclusões basofílicas encontradas em plaquetas, durante avaliação de esfregaço sanguíneo (setas). Coloração Giemsa, microscopia óptica, aumento de 1000X. (Escala: 20 μ m).

5 DISCUSSÃO

Esse estudo apresentou o desenvolvimento de um ensaio de qPCR utilizando sonda de hidrólise com alvo no gene *gltA* de *A. platys* para o diagnóstico e detecção quantitativa de *A. platys* em amostras de sangue de cães. Abordagens usuais para o diagnóstico molecular de *A. platys* concentram no gene 16S *rDNA* como alvo (MARTIN et al., 2005; DE LA FUENTE et al., 2006; ABARCA et al., 2007). Este gene é utilizado nos métodos de diagnóstico molecular devido à sua elevada conservação e as múltiplas cópias no genoma de bactérias, o que torna a técnica molecular mais sensível e confiável. Essas características foram usadas na escolha do gene 16S *rDNA* como um alvo comparativo ao gene *gltA*, usado no desenvolvimento desta técnica. A qPCR baseada no gene *gltA* desenvolvida neste estudo foi mais sensível comparada a nPCR com alvo no gene 16S *rDNA*, mesmo que o gene *gltA* seja de uma cópia, como normalmente é observado em agentes rickettsiais (BALDRIDGE et al., 2010). Este fato demonstra que os iniciadores e sonda desenhados para este estudo apresentaram alta sensibilidade e especificidade na detecção de *A. platys* em amostras de sangue de cães.

Outros testes moleculares são usados no diagnóstico de patógenos riquetsiais transmitidos por carrapatos, incluindo a transcriptase reversa quantitativa-PCR (qRT-PCR) com alvo no RNA ribossomal (16S rRNA) (SIRIGIREDDY; GANTA, 2005; SIRIGIREDDY et al., 2006; REINBOLD et al., 2010). Este teste é considerado um método de diagnóstico robusto porque tanto ribossomos, bem como rRNA estão presente em maior número de cópias que o número de DNA, devido a participação do rRNA na tradução do código genético (REINBOLD et al., 2010). Contudo, uma técnica baseada em RNA deve ser cuidadosamente conduzida devido aos problemas envolvendo a degradação de RNA e a dificuldade de manuseio com amostras de RNA, prejudicando subseqüentes análises (ROMERO et al., 2014). Uma alternativa a essas questões é o uso de um método baseado em DNA para o diagnóstico de hemoparasitos, como optado por este e outros estudos (DAHMANI et al., 2015; DE LA FUENTE et al., 2006; GAUNT et al., 2010; INOKUMA et al., 2002a).

Durante a padronização da qPCR descrita nesse estudo, objetivou-se desenhar oligoiniciadores e sonda que atuassem de maneira a proporcionar maior especificidade e sensibilidade à técnica. Na extremidade da sonda há uma base “G” (Guanina), enquanto nas seqüências respectivas à *E. canis* e *E. chaffeensis* há a base “A” (Adenina), ambas são Purinas. O pareamento entre essas bases dificulta o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre elas por razões estereoquímicas (MALACINSKI, 2005). As purinas apresentam em sua estrutura molecular duplo anel de átomos de carbonos e por isso são demasiadamente volumosas (VERLENGIA et al., 2013). Logo, a hibridização com a fita de DNA torna-se difícil pela distância entre as moléculas do grupo das Purinas quando pareadas. Ao analisarmos os oligoiniciadores utilizados nesse estudo, buscou-se a concentração que propiciasse uma reação com a menor formação de dímeros de oligoiniciadores, fator que interfere na PCR (VERLENGIA et al., 2013).

Quando os dois métodos moleculares utilizados neste estudo foram analisados em paralelo considerando utilizar todas as amostras diluídas até 100 ng/ μ L, pode-se observar que ambos tinham competência para detecção do DNA de *A. platys* em amostras provenientes de animais com alta parasitemia. No entanto, a qPCR foi mais sensível do que a nPCR, sendo capaz de detectar o fragmento de DNA alvo em amostras com baixa parasitemia. O número mais baixo de cópias de DNA alvo em amostras provenientes de animais com baixa parasitemia justifica a dificuldade da detecção do fragmento desejado por nPCR.

Durante a avaliação das metodologias adotadas nesse estudo para seleção das amostras a serem testadas na qPCR com objetivo de observar sua performance, observou-se que descartar amostras com baixa concentração de DNA excluiu animais que estiveram infectados

por *A. platys*, porém com baixa contagem de células, assim como é relatado na literatura (ZAVALA et al., 2007; HARRUS et al., 1997; WOODY; HOSKINS, 1991; SOUSA et al., 2009). Por essa razão, o resultado adotado para a discussão da sensibilidade desta técnica se baseou na utilização de todas as amostras coletadas, considerando que estatisticamente a qPCR obteve mais sucesso no diagnóstico em comparação com a nPCR, de animais naturalmente infectados e debilitados.

Esta técnica de qPCR pode ser utilizada para monitorar os produtos amplificados durante a reação e elimina o processamento pós-amplificação, diminuindo assim o tempo de obtenção do resultado do ensaio (EDDLESTONE et al., 2007). É senso comum que a principal diferença entre qPCR e os ensaios de PCR convencional é a expectativa de que o primeiro apresente o potencial de quantificar com precisão os ácidos nucleicos alvos (BUSTIN et al., 2009). Além das vantagens operacionais, a técnica de qPCR tem uma natureza quantitativa, e é ao mesmo tempo sensível e reprodutível, podendo substituir potencialmente ensaios de PCR convencionais nas rotinas de diagnóstico (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2010).

Trombocitopenia acentuada e baixa parasitemia ocorrem em cães durante o período inicial da infecção causada por *A. platys*, e por esta razão são necessários testes diagnósticos específicos e sensíveis para identificar este agente (EDDLESTONE et al., 2007). Assim, o uso de sondas de hidrólise na qPCR é um mecanismo para aumentar a sensibilidade (EDDLESTONE et al., 2007), bem como a especificidade da técnica (PUSTERLA et al., 1999). Durante a amplificação, o *reporter dye* e o *quencher* são separados por clivagem, resultando em emissão de fluorescência pelo *reporter dye* (PUSTERLA et al., 1999; 2000). As técnicas de esfregaço sanguíneo e nPCR são comumente utilizadas para o diagnóstico de *A. platys*, no entanto elas não fornecem os dados quantitativos (EDDLESTONE et al., 2007). Da mesma forma que a nPCR foi reportada como mais sensível do que ensaios diretos de PCR convencional (MARTIN et al., 2005), nossos resultados demonstraram que a qPCR apresentou elevada sensibilidade utilizando sonda de hidrólise, e além disso, limita o risco de contaminação cruzada da amostra com produtos da nPCR (APFALTER et al., 2005).

A análise da sequência dos genes 16S *rDNA*, citrato sintase e da proteína de choque térmico de *A. platys* já foram utilizados para confirmar as inclusões em plaquetas devido a possibilidade de infecção por outros organismos da família Anaplasmataceae (CHAE et al., 2000; INOKUMA et al., 2001a; INOKUMA et al., 2001b; INOKUMA et al., 2002a; INOKUMA et al., 2002b; AGUIRRE et al., 2006; DE LA FUENTE et al., 2006). Em nosso estudo, o alvo *gltA* foi uma boa opção para o diagnóstico através de qPCR, quando comparado com o teste molecular baseado no gene 16S *rDNA*.

A adoção de uma curva padrão para avaliar a eficiência da qPCR é considerado uma referência de qualidade para o ensaio (SVEC et al. 2015) e é recomendado nas diretrizes para experimentos de qPCR (BUSTIN et al., 2009). Tem sido demonstrado que a eficiência ótima para ensaios de qPCR varia de 90 a 110% (THORNTON et al., 2011). A eficiência encontrada usando o teste molecular desenvolvido neste estudo foi de 96,06%, o que é considerado desejável para uma adequada detecção de alvo em uma reação de qPCR (THORNTON et al., 2011). A curva sem Exo IPC gerada neste estudo apresentou uma maior eficiência (101,80%). Isto demonstra que a presença de IPC pode interferir na reação devido a ocorrência de competição, e assim, diminuir a eficiência da amplificação da qPCR, um achado que foi previamente relatado (HOORFAR et al., 2004). No entanto, isto não diminui o papel do IPC, que no nosso estudo foi útil para confirmar a ausência de inibidores na reação, mantendo a credibilidade do qPCR.

No *mix* utilizado nesse estudo (*Universal PCR Master Mix*), um dos componentes é a Uracil N-glicosilase (AmpErase[®]-UNG), uma enzima que atua hidrolisando a ligação glicosídica e substituindo bases de deoxitimidina por deoxiuridina. Usualmente o *mix* de reação

da qPCR contém desoxiuridina trifosfato (dUTP) ao invés de desoxitimidina trifosfato (dTTP), bem como a UNG. Isso resulta na incorporação de desoxiuridina, possivelmente impedindo contaminações no início da reação com produtos de pós-PCR (PENNINGS et al., 2001), e por essa razão, durante a padronização foi adotada uma temperatura de 52°C por dois minutos, visto que essa é a condição ideal para que essa enzima atue.

A técnica de qPCR não necessita da utilização de eletroforese em gel para a visualização de seus produtos, pois esta reação dá-se num sistema tubular fechado (RODRIGUES-LÁZARO et al., 2007). Como a qPCR elimina esse processamento pós-amplificação, também diminui o tempo na execução de ensaio (EDDLESTONE et al., 2007), tornando-se uma reação mais rápida (RAO et al., 2006). Contudo, a qPCR também apresenta limitações, e nelas se inclui o fato de que essa reação requer que o amplicon tenha tamanho limitado (geralmente menor que 300 pb), para assegurar uma alta eficiência e reprodutibilidade da PCR (PENNINGS et al., 2001), além do custo mais elevado e da necessidade de uma estrutura física adequada para realizá-la.

Considerando-se que o controle interno positivo (“*internal positive control*” - IPC) é uma sequência que não é o principal alvo da PCR, mas dentro de uma reação pode ser amplificado simultaneamente com a sequência alvo (RODRÍGUES-LÁZARO et al., 2007; BRAVO et al., 2012), a sua amplificação, mesmo na ausência de DNA de *A. platys*, caracteriza que não existem potenciais inibidores na reação. Nossos resultados demonstraram que potenciais inibidores estiveram ausentes na reação, devido à amplificação adequada do IPC usado neste ensaio. Os resultados falso-negativos em PCR podem estar relacionados com a presença de inibidores, perdas de sensibilidade ou erros de pipetagem (CONRATHS; SCHARES, 2006). Muitos inibidores são provenientes de uma extração inadequada do DNA e a otimização desta fase prevê a obtenção de ácidos nucleicos com maior pureza, permitindo assim uma maior eficiência nos métodos de detecção molecular (GANDRA et al., 2008). O uso do IPC na PCR já foi utilizado em reações de otimizações (RUDNICK et al., 2010) e é descrito como um instrumento adequado para critérios de padronização da técnica, uma vez que determina se a ausência de amplificação específica é realmente devido a ausência do alvo na amostra de DNA (RAMPERSAD et al., 2005). O uso do IPC foi adotado por outros autores em sua pesquisa para desenvolver a qPCR para outros agentes infecciosos (COLOMBA et al., 2009; COLLINS et al., 2010; LOMBARDO et al., 2012; STENSVOLD et al., 2012; MAJIDZADEH et al., 2014).

Neste estudo, foram observados alguns esfregaços sanguíneos com inclusões sugestivas de *A. platys* em plaquetas, mas quando submetidas ao diagnóstico molecular foram negativas. O resultado positivo na citologia pode ser falho e inclusões basofílicas observadas em plaquetas devem ser definidas não somente como mórula de *A. platys* (CORREA et al., 2011). Os resultados de citologia falso-positivos podem ser explicados pela ocorrência de granulações em plaquetas devido a ativação plaquetária (FERREIRA et al., 2008), grânulos densos, remanescentes nucleares de megacariócitos (MYLONAKIS et al., 2003), artefatos técnicos ou inclusões de *Ehrlichia canis* em plaquetas (ALMOSNY, 1998).

Além disso, a citologia positiva pode ser devido a artefatos técnicos ou por inclusões de *Ehrlichia canis* em plaquetas (ALMOSNY, 1998; DAGNONE, 2006). Entre as amostras positivas no esfregaço de sangue e negativas no diagnóstico molecular para *A. platys*, depois sendo submetidas a nPCR para *E. canis*, 37,50% (n = 12/32) foram positivas, confirmando os achados de Almosny (1998), bem como os de Ramos et al. (2009). A ocorrência de co-infecção é possível, como observado neste estudo porque em duas amostras foram amplificados o DNA alvo de *A. platys* e *E. canis*. E assim, essas inclusões basofílicas podem ser apenas um desses organismos da família Anaplasmataceae, bem como podem ser infecções concomitantes (ALBERNAZ et al., 2007; SOUSA, 2006), o que proporciona uma manutenção da diminuição celular, como registrado por Gaunt et al. (2010) em seus estudos

experimentais.

A qPCR apresenta como uma das vantagens a quantificação do alvo durante a reação. Portanto, além do diagnóstico rápido, que pode ser usado como um adjuvante na avaliação de parâmetros clínicos e ser uma ferramenta para monitorar o tratamento de animais infectados por patógenos, correlacionando o *Cq* encontrado na qPCR com a taxa de infecção pelo parasita.

Um dos métodos de diagnóstico de *A. platys* comumente usado é a busca de mórula dentro de plaquetas em um esfregaço de sangue (FERREIRA et al., 2008b) que é uma técnica rápida e de baixo custo, mas que oferece uma baixa sensibilidade (SOUSA et al., 2009). Outro estudo mostrou uma diferença no desempenho entre o esfregaço sanguíneo e o método molecular para o diagnóstico de *A. platys* (RAMOS et al., 2009). Neste estudo, a concordância da qPCR com o esfregaço sanguíneo foi baixo, demonstrando a precisão de qPCR, como observado na literatura (OTRANTO et al., 2010). A utilização de um sistema de detecção fluorogênica, com a atividade da Taq DNA-polimerase para digerir a sonda de hidrólise que hibridiza com o fragmento amplificado durante a PCR (PUSTERLA et al., 1999), reflete a elevada especificidade encontrada na técnica descrita neste estudo, e a intensidade da fluorescência é diretamente relacionada a quantidade de DNA-alvo (PUSTERLA et al., 2000). Além disso, enquanto o esfregaço sanguíneo e o método de nPCR podem detectar *A. platys*, eles não podem fornecer dados quantitativos (EDDLESTONE et al., 2007).

Algumas amostras foram negativas através da técnica de esfregaço sanguíneo e positivas através da qPCR. Este achado pode ser explicado pela presença de trombocitopenia durante a infecção, que interfere na visualização de microrganismos através de observação microscópica (FERREIRA et al., 2008) devido ao comportamento de parasitemia cíclica de *A. platys*. Bacteremia é comumente pouco encontrada devido à dificuldade com a detecção da bactéria em esfregaços de sangue, onde menos de 1% das plaquetas podem estar infectadas (HARVEY, 2011; MARTIN et al., 2005).

Ensaio sorológicos podem produzir resultados falso-positivos devido a reação cruzada com outras bactérias (CHANDRASHEKAR et al., 2010; INOKUMA et al., 2002), como *A. phagocytophilum*, que está intimamente relacionado a *A. platys*. Essa situação é importante no Brasil porque *A. phagocytophilum* tem sido detectado em amostras de sangue de cães da região geográfica alvo do presente estudo (SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Esse estudo apresenta a primeira descrição do desenvolvimento de um ensaio de qPCR utilizando sonda de hidrólise com alvo no gene *gltA* para a detecção de *A. platys*. Diagnósticos precisos e confiáveis da trombocitopenia cíclica canina são necessários para adotar o tratamento correto para o animal e monitorar animais infectados, correlacionando os valores de *Cq* com a taxa de infecção por esta bactéria. Pesquisas tem demonstrado que a qPCR pode ser usada como uma ferramenta adequada no monitoramento da taxa parasitária durante as investigações de hemoparasitos (CALDAS et al., 2012; SUDARSHAN et al., 2015). Assim, a qPCR é útil no diagnóstico, manutenção da saúde animal, bem como na avaliação do tratamento de doenças, e é capaz de detectar e quantificar parasitos, mesmo durante a fase crônica de infecção (CALDAS et al., 2012). No nosso estudo, observou-se que o método de qPCR desenvolvido pode detectar este parasito, mesmo em amostras com baixo número de cópias, demonstrando assim, que este ensaio pode ser útil no monitoramento do tratamento de ambos os animais, assintomáticos e sintomáticos.

6 CONCLUSÃO

O ensaio de qPCR padronizado utilizando sonda de hidrólise com alvo no gene *gltA* de *A. platys* é uma opção efetiva no diagnóstico desta bactéria. O método de qPCR é mais específico e sensível que o esfregaço sanguíneo, e é mais sensível que a técnica de nPCR usada para comparação. O gene alvo específico, *gltA* de *A. platys*, proporcionou a esta qPCR ser uma alternativa ao diagnóstico molecular na detecção desta bactéria.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; PERRET, C.; GUERRERO, J.; GODOY, P.; VELOZ, A.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; LEÓN, U.; GUTJAHR, C.; AZÓCAR, T. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. **Emerg. Infect. Dis.** v.13, p.1392-1395, 2007.
- AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; RUIZ, L.; AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.** v.53, p.197-200, 2006.
- ANDERSON, B.E.; DAWSON, J.E.; JONES, D.C.; WILSON, K.H. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.** v.29, p.2838-2842, 1991.
- ANDERSON, B.E.; GREENE, C.E.; JONES, D.C.; DAWSON, J.E. *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.42, p.299-302, 1992.
- ALBERNAZ, A.P.; MIRANDA, F.J.B.; MELO Jr., O.A.; MACHADO, J.A.; FAJARDO, H.V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciênc. Anim. Bras.** v.8, p.799-806, 2007.
- ALLEMAN R, COUTO G. 2006. Testing for tick borne diseases: How and when? Disponível em: www.vet.ohio-state.edu/assets/pdf/hospital/bloodBank/wellness/research/TestingforTickBorneDiseases.pdf. Acessado em: 20 dezembro 2014.
- ALMEIDA, A.B.P.F.; DE PAULA, D.A.J.; DAHROUG, M.A.A.; FREITAS, A.G.; SILVA, J.N.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V.R.F. *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks of dogs in Cuiaba, Mato Grosso. **Semina: Ci. Agr.** 33, 1123-1126, 2012.
- ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935): **Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados, Seropédica.** 1998. 149p. Tese (Doutorado) Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- ANTOGNONI, M.T.; VERONESI, F.; MORGANTI, G.; MANGILI, V.; FRUGANTI, G.; MIGLIO, A. Natural infection of *Anaplasma platys* in dogs from Umbria region (Central Italy). **Vet. Ital.** v.50, p.49-56, 2014
- APFALTER, P.; REISCHL, U.; HAMMERSCHLAG, M.R. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? **J. Clin. Microbiol.** v.43, p.5835-5841, 2005.
- ARRAGA-ALVARADO, C.M.; QUROLLO, B.A.; PARRA, O.C.; BERRUETA, M.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.91, 1161-1165, 2014.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat 5,0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas, Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 380p, 2007.**
- AZEVEDO, F.D. **Protocolos terapêuticos no tratamento da Erliquiose Monocítica Canina.** 90p. Doutorado (Tese). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2013.

BAKER, D.C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S.D.; CORSTVET, R.E. Acute *Ehrlichia platys* infection in the dog. **Vet. Pathol.** v.24, p.449-53, 1987.

BALDRIDGE, G.D.; BURKHARDT, N.Y.; LABRUNA, M.B.; PACHECO, R.C.; PADDOCK, C.D.; WILLIAMSON, P.C.; BILLINGSLEY, P.M.; FELSHEIM, R.F.; KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G. Wide dispersal and possible multiple origins of low-copy-number plasmids in *Rickettsia* species associated with blood-feeding arthropods. **Appl. Env. Microbiol.** v.76, p.1718-1731, 2010.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Vet. Microbiol.** v.136, p.321-325, 2009.

BARR, S.C. What to do with *Ehrlichia canis/Anaplasma phagocytophylium* positive cases. 2009. Disponível em: <http://veterinarycalendar.dvm360.com/what-do-with-ehrlichia-canis-anaplasma-phagocytophylium-positive-cases-proceedings?id=&sk=&date=&pageID=3>. Acessado em: 12 outubro 2014.

BERAN, G.W. **Handbook of zoonoses, section a: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic.** 2 ed. CRC Press: Boca Raton, 1994, 560p.

BRAVO, N.; MUÑOZ, C.; NAZAL, N.; SAAVEDRA, M.; MARTÍNEZ, G.; ARAYA, E.; APT, W.; ZULANTAY, I. Real-Time PCR in faecal samples of *Triatoma infestans* obtained by xenodiagnosis: proposal for an exogenous internal control, **Parasit. Vectors.** v.59, p.1-4, 2012.

BREITSCHWERDT, E.B. Questions related to interpretation of Idexx SNAP 4Dx. College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, North Carolina. Disponível em: https://www.ncsu.edu/ncsu/cvm/vhc/documents/interpretation_SNAP_4DX_1_07.pdf. Acessado em: 12 outubro de 2013.

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. **Paras. Vectors.** v.7, p.1-7. 2014.

BROWN, G. K.; MARTIN, A.R.; ROBERTS, T.K.; AITKEN, R.J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Austrália. **Austr. Vet. J.** v.79, p.554–558, 2001.

BROWN, G.K.; CANFIELD, P.J.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K.; MARTIN, A.R.; BROWN, C.S.; IRVING, R. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. **Austr. Vet. J.** 84, 321-325, 2006.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin. Chem.** v.55, p.611-622, 2009.

CALDAS, S.; CALDAS, I.S.; DINIZ, L.D.E.F.; LIMA, W.G.; OLIVEIRA, R.D.E.P.; CECÍLIO, A.B.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BAHIA, M.T. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Act. Trop.** v.123, p.170-177, 2012.

CARDOSO, L., TUNA, J.; VIEIRA, L.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **Vet. J.** v.183, p.232–233, 2010.

- CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parasitol.** v.119, p.73-86, 2004.
- CHAE, J.S.; FOLEY, J.E.; DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E. Comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA, 444 *Ep-ank*, and *groESL* heat shock operon genes in naturally occurring *Ehrlichia equi* and Human Granulocytic Ehrlichiosis agent isolates from Northern California. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.1364-1369, 2000.
- 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. **Am. J. Vet. Res.** v.71, p.1443-1450, 2010.
- CHANG, W.L.; PAN, M.J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **J. Clin. Microbiol.** v.34, p.3142-3146, 1996.
- COLOMBA, C.; SAPORITO, L.; VITALE, F.; REALE, S.; VITALE, G.; CASUCCIO, A.; TOLOMEO, M.; MARANTO, D.; RUBINO, R.; DI CARLO, P.; TITONE, L. Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. **BMC Infect. Dis.** v.199, p.1-7, 2009.
- CONRATHS, F.J.; SCHARES, G. Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. **Vet. Parasitol.** v.136, p.91-98, 2006.
- COLLINS, C.M.; KERR, R.; MCINTOSH, R.; SNOW, M. Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. **Dis. Aquat. Organ.** v.90, p.135-142, 2010.
- 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: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, p.899-909, 2011.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.A.S.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.** v.117, p.285-290, 2003.
- DAGNONE, A.S. 2006. **Caracterização molecular de espécies da Família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS**, 118p., Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- DAHMANI, M.; DAVOUST, B.; BENTERKI, M.S.; FENOLLAR, F.; RAOULT, D.; MEDIANNIKOV, O. Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. **Comp. Imm. Microbiol. Infec. Dis.** v.39, p.39-45, 2015.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet. Parasitol.** v.152, p.173-185, 2008.
- DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M.S.; ANNOSCIA, G.; GIANNELLI, A.; PARISI, A.; OTRANTO, D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. **Parasit. Vect.** v.6, p.1-17, 2013.

- DE ECHAIDE, ST, KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **J. Clin. Microbiol.** v.36, p.777-782, 1998.
- DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; NARANJO, V.; NICOSIA, S.; ALONGI, A.; LA MANTIA, F.; KOCAN, K.M. Molecular characterization of *Anaplasma platys* from dogs in Sicily, Italy. **BMC Vet. Res.** v.24, p.1-5, 2006.
- DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. (1936) *Rickettsia bovis*, nouvelle espèce pathogène pour le bœuf. Bulletin de la Société Pathologie Exotique., 29 (10): 1057-1061.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; 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*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p.2145-2165, 2001.
- DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. **Clin. Infect. Dis.** v.20, p.1102-1110, 1995.
- 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. **Exp. Parasitol.** v.115, p.205-210, 2007.
- ERNST, R.K.; GUINA, T.; MILLER, S.I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host immune responses. **J. Infect. Dis.** 179:326-330, 1999.
- FENOLLAR, F.; RAOULT, D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **APMIS.** v.112, p.785-807, 2004.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.** v.5, p.113-119, 2007.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; FERREIRA, M.S.; ALMOSNY, N.R.P. Hematologic parameters in Polymerase Chain Reaction-positive and -negative dogs for *Anaplasma platys* presenting platelet inclusion bodies. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.** v.6, p.185-190, 2008a.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; AZEVEDO, R.R.M.; RODRIGUES, I.L.F.; ALMOSNY, N.R.P. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR-positivos para *Anaplasma platys* testados em Elisa comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.17, p.5-8, 2008b.
- FÖLDVÁRI, G.; HELL, É.; FARKAS, R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. **Vet. Parasitol.** v.127, p.221-226, 2005.
- FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **Am. J. Vet. Res.** v.44, p.2407-2411, 1983.

- GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol.** v.30, p.109-118, 2008.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T. "Phylum XIV. Proteobacteria phyl. nov." In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G.M. (eds.) **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**, 2^o edição, v. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), Springer, New York, 2005, p.1.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T. Class I. *Alphaproteobacteria* class. nov. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; GARRITY, G. M. (eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2^o edição, v.2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), Springer, New York, 2006, p.1.
- GASSER, R.B. PCR-based technology in veterinary parasitology. **Vet. Parasitol.** v.84, p.229-258, 1999.
- GAUNT, S.D.; BAKER, D.C.; BABIN, S.S. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. **Am. J. Vet. Res.** v.51, p.290-293, 1990.
- GAUNT, S.D.; BEALL, M.J.; STILLMAN, B.A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P.P.V.P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E.B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasit. Vectors.** v.33, p.1-10, 2010.
- GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3^oed. Philadelphia: Saunders, Elsevier. 2006, 1387 p.
- HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet. Rec.** v.141, p.247-250, 1997.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Infect. Dis.** v.137, p.182-188, 1978.
- HARVEY, J. W. **Canine Cycle Thrombocytopenia**. In GREENE C.E; HARVEY, J.W. 3ed. Infectious Diseases of the dog and cat, Philadelphia, SAUNDERS, W.B., p.229-231, 2006.
- HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**, 3ed, Saunders: Elsevier, 2011. 368p.
- HEYMAN, P.; DUH, D.; VAN DER KUYLEN, B.; COCHEZ, C.; VAN ESBROECK, M.; VANDENVELDE, C.; AVSIC-ZUPANC, T. Molecular and Serological Evidence for *Anaplasma platys* and *Babesia* sp. Infection in a Dog, Imported in Belgium, from Southern Spain. **J. Vet. Med.** v.54, p.276-279, 2007.
- HIBLER, S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.** V.8, p.106-114, 1986.
- HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **J. Clin. Microbiol.** v.42, p.1863-1868, 2004.
- HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.J.; ORELLANA, N.G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Braz. J. Microbiol.** v.36, p.211-216, 2005.
- HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiol. Immunol.** v.44, p.737-739, 2000.

- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. **Optimization of PCR**. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR Protocols – A Guide to Methods and Applications. Academic Press: New York, 1990, p. 3–12.
- INOKUMA, H.; TERADA, Y.; KAMIO, T.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.8, p.241-244, 2001a.
- INOKUMA, H.; BROUQUI, P.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. **J. Clin. Microbiol.** v.39, p.3031-3039, 2001b.
- INOKUMA, H.; FUJII, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; BEAUFILS, J-P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon *groESL* and the citrate synthase gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.9, p.1132-1136, 2002a.
- INOKUMA, H.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M.; ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Vet. Parasitol.** v.110, p.145-152, 2002b.
- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.** v.32, p.1658-1662, 1994.
- JENKINS, A.; KRISTIANSEN, B.E.; ALLUM, A.G.; AAKRE, R.K.; STRAND, L.; KLEVELAND E.J.; VAN DE POL, I.; SCHOOLS, L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from southern Norway. **J. Clin. Microbiol.** v.39, p.3666-3671, 2001.
- KIM, C.; BLANCO, L.B.C.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. **Vet. Parasitol.** v.151, p.158-163, 2008.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELENDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clin. Microbiol. Rev.** v.16, p.698-712, 2003.
- LASTA, C.S.; SANTOS, A.P.; MESSICK, J.B.; OLIVEIRA, S.T.; BIONDO, A.W.; VIEIRA, R.F.C.; DALMOLIN, M.L.; GONZÁLEZ, F.H.D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.22, p.360-366, 2013.
- LESTOQUARD, F. Deuxieme note sur les Piroplasmoses du mouton en Algerie. L'anaplasmose: *Anaplasma ovis* nov. sp. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** v.17:784-787, 1924.
- LI, Y.; YANG, J.; CHEN, Z.; QIN, G.; LI, Y.; LI, Q.; LIU, J.; LIU, Z.; GUAN, G.; YIN, H.; LUO, J.; ZHANG, L. *Anaplasma* infection of Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) and ticks in Xinjiang, China. **Parasit Vectors.** v.8, p.1-6, 2015.
- LIN, Q.; RIKIHISA, Y.; OHASHI, N.; ZHI, N. Mechanisms of variable *p44* expression by *Anaplasma phagocytophilum*. **Infect. Imm.** v.71, p.5650-5661, 2003.
- LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; MIGLIAZZO, A.; CAPRI, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and

- conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Vet. Parasitol.** v.184, p.10-17, 2012.
- MACHADO, R. Z. ERLIQUIOSE CANINA. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.** v.13, p.53-57, 2004.
- 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. **Parasit. Vectors.** v.103, p.1-10, 2013.
- MAJIDZADEH, K.; MOHSENI, A.; SOLEIMANI, M. Construction and evaluation of a novel internal positive control (IPC) for detection of *Coxiella burnetii* by PCR **Jundishapur J. Microbiol.** v.7, p.1-6, 2014.
- MALACINSKI, G.M. **Fundamentos de Biologia Molecular.** 4ed. 2005. 439p.
- MARTIN, A.R.; BROWN, G.K.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Exp. Parasitol.** v.109, p.176-180, 2005.
- MELTER, O.; STEHLIK, I.; KINSKAL, H.; VOLFOVAL, I.; TICHAL, V.; HULINSKA, D. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a young dog: a case report. **Vet. Med.** v.52, p.207-212, 2007.
- MIRANDA, M.G.N. **Varição do status sorológico contra *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia canis* em *Canis familiaris* Linnaeus, 1758 após tratamento com hclato de doxiciclina.** 104p. Mestrado (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica e Reprodução Animal. Universidade Federal Fluminense. 2010.
- MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.** v.79, p.325-339, 1998.
- MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPAPOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.** v.91, p.197-204, 2003.
- MYLONAKIS, M.E.; MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; BILLINIS, C.D.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **J. Am. An. Hosp. Assoc.** v.40, p.174-184, 2004.
- OTRANTO, D.; TESTINI, G.; DANTAS-TORRES, F.; LATROFA, M.S.; DINIZ, P.P.V.P.; CAPRARIIS, D.; LIA, R.P.; MENCKE, N.; STANNECK, D.; CAPELLI, G.; BREITSCHWERDT, E.B. Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study. **J. Clin. Microbiol.** v.48, p.3316-3324, 2010.
- OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; WEIGL, S.; LATROFA, M.S.; STANNECK, D.; DECAPRARIIS, D.; CAPELLI, G.; BANETH, G. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. **Parasit. Vectors.** v.55, p.1-6, 2011.
- PAIVA-CAVALCANTI M.; REGIS-DA-SILVA, C.G.; GOMES, Y.M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The J. Venomous Anim. Toxins including Trop. Dis.** v.16, p.537-542, 2010.

PENNINGS, J.L.A.; VAN DE LOCHT, L.T.F.; JANSEN, J.H.; VAN DER REIJDEN, B.A.; DE WITTE, T.; MENSINK, E.J.B.M. Degradable dU-based DNA template as a standard in real-time PCR quantitation. **Leukemia**, v.15, p.1962–1965, 2001.

PEREIRA, A.M. **Detecção sorológica, molecular e análise filogenética de membros da família Anaplasmataceae em cães naturalmente infectados no Rio de Janeiro**. 2012. 131f. Tese. (Doutorado) Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica e Reprodução Animal. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

PUSTERLA, N, HUDER, J.B.; LEUTENEGGER, C.M.; BRAUN, U.; MADIGAN, J.E.; LUTZ, H. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. **J. Clin. Microbiol.** v.37, p.1329-1331, 1999.

PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; SIGRIST, B.; CHAE, J.-S.; LUTZ, H.; MADIGAN, J.E. Detection and quantitation of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses and snails by real-time PCR. **Vet. Parasitol.** v.90, p.129-135, 2000.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES Jr. DS.; SOUZA, I.I.F.; ONO, T.M.; VIEIRA, A.S.; PIMENTEL, D.S.; ROSAS, E.O.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Comparison of nested-PCR with blood smear examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.18, p.58-62, 2009.

RAMOS, R.A.N., LATROFA, M.S., GIANNELLIA, A., LACASELLA, V., CAMPBELLA, B.E., DANTAS-TORRES, F., OTRANTO, D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. **Vet. Par. In press.** 2014.

RAMPERSAD, J.N.; WATKINS, J.D.; SAMLAL, M.S.; DEONANAN, R.; RAMSUBEIK, S.; AMMONS, D.R. A nested-PCR with an Internal Amplification Control for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae*: An examination of cats in Trinidad. **BMC Infect. Dis.** v.63, p.1-6, 2005.

RAO, R.U.; WEIL, G.J.; FISCHER, K.; SUPALI, T.; FISCHER, P. Detection of *Brugia* parasite DNA in human blood by real-time PCR Ramakrishna U. **J. Clin. Microbiol.** v.44, p.3887-3893, 2006.

REINBOLD, J.B.; COETZEE, J.F.; SIRIGIREDDY, K.R.; GANTA, R.R. Detection of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR assay. **J. Clin. Microbiol.** v.48, p.2424-2432, 2010.

ROMERO, I.G.; et al. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. **BMC Biol.** v.12, p.1-13, 2014.

RUDNICK, C.C.C.; GUELSIN, G.A.S.; MARANGON, A.V.; FRANCESCHI, D.S.A.; SELL, A.M.; VISENTAINER, J.E.L. Otimização de metodologia para o estudo de genes KIR - methodology optimization for KIR genotyping. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.46, p.215-224, 2010.

RUSSEL, K.E.; GRINDEM, C.B. **Secondary thrombocytopenia**. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (1st Ed.). Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, p.487-495, 2000.

RUST, M.K.; DRYDEN, M.W. The biology, ecology and management of the cat flea. **Annual Review Entomology**, v.42, p.451-473, 1997.

- RYMASZEWSKA, A.; GREYDA, S. Bacteria of the genus *Anaplasma*-characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Vet. Med.** 1v.1, p.573-584, 2008.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.74, p.5463-5467, 1977.
- SANOGO, Y.O.; INOKUMA, H.; PAROLA, P.; BROUQUI, P.; DAVOUST, B.; CAMICAS, J-L. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in África, **Onderstepoort J. Vet.** v.70, p.205-212, 2003.
- SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M.A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.11, p.382-384, 1999.
- SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction, **J. Vet. Diagn. Invest.** v.23, p.770-774, 2011.
- SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.G.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.V.; COSTA, R.L.; SANTOS, T.M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.H.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasit. Vectors**, v.348, p.1-10, 2013.
- SILVA, L.S. 2010. **Erliquiose e anaplasmoze canina em Teresina, Piauí.** 92p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
- SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*, **Am. J. Vet. Res.** v.52, p.1537-1541, 1991.
- SIRIGIREDDY, K.R.; GANTA, R.R. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverser transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Mol. Diagn.** v.7, p.308-316, 2005.
- SIRIGIREDDY, K.R.; MOCK, D.C.; GANTA, R.R. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* pathogens in vertebrate and tick hosts by Real-Time RT-PCR. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1078, p.552-556, 2006.
- SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. "Approved lists of bacterial names." **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.30, p.225-420, 1980.
- SOUSA, V.R.F. 2006. Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*, 2006, 46p., Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- SOUSA, V.R.F.; BOMFIM, T.C.B.; ALMEIDA, A.B.P.F.; BARROS, L.A.; SALES, K.G.; JUSTINO, C.H.S.; DALCIN, L. Co-infection by *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs diagnosed by PCR. **Acta Sci. Vet.** v.37, p.281-283, 2009.
- SOUZA, J.C.O.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R.; MASSARD, C.L. Prevalence of antibodies against *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cattle in the "Médio Paraíba" mesoregion, Brazil. **Ci. Rural.** v.31, p.309-314, 2001.
- SPARAGANO, O.A.E.; VOS, A.P.; PAOLETTI, B.; CAMMÀ, C.; SANTIS, P.; OTRANTO, D.; GIANGASPERO, A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase

chain reaction and reverse line blot hybridization, **J. Vet. Diagn. Invest.** v.15, p.527-534, 2003.

STENOS, J.; GRAVES, S.R.; UNSWORTH, N.B. A highly sensitive and specific real-time pcr assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.73, p.1083-1085, 2005.

STENSVOLD, C.R.; AHMED, U.N.; ANDRESEN, L.O'B.; NIELSEN, H.V. Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. **J. Clin. Microbiol.** v.50, p.1847-1851, 2012.

SUDARSHAN, M.; SINGH, T.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. A correlative study of splenic parasite score and peripheral blood parasite load estimation by qPCR in Visceral Leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** 2015. In press.

SVEC, D.; TICHOPAD, A.; NOVOSADOVA, V.; PFAFFL, M.W.; KUBISTA, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomol. Detect. Quantif.** v.3, p.9-16, 2015.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **J. Clin. Microbiol.** v.39, p.90-93, 2001.

TENG, C-H.; RAGHAVAN, U.M., Palaniappan, and Yung-Fu Chang. Cloning and characterization of an *Ehrlichia canis* gene encoding a protein localized to the morula membrane. **Infect. Immun.** v.71, p.2218-2225, 2003.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochem. Mol. Biol. Edu.** v.39, p.145-154, 2011.

TOMMASI, A.S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E.B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; CAPRARIIS, D. *Anaplasma platys* in boné marrow megakaryocytes of Young dogs. **J. Clin. Microbiol.** v.52, p.2231-2234, 2014.

TROTTA, M.; FOGLIAZZA, A.; FURLANELLO, T.; SOLANO-GALLEGO, L. A molecular and serological study of exposure to tick-borne pathogens in sick dogs from Italy. **Clin. Microbiol. Infect.** v.15, p.62-63, 2009.

ULUTAS, B.; BAYRAMLI, G.; KARAGENÇ, T. First Case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* Infection in a Dog in Turkey, Turk. **J. Vet Anim. Sci.** v.31, p.279-282, 2007.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; YAMAMOTO, S. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. **An. New York Acad. Sci.** v.990, p.692-698, 2003.

VALENTÍN, S.; MORALES, A.; SÁNCHEZ, J.L.; RIVERA, A. Safety and efficacy of doxycycline in the treatment of rosacea. **Clin., Cosm. Invest. Dermatol.** v.2, p.129-140, 2009.

VERLENGIA, R.; CURI, R.; BEVILACQUA, E.; NEWSHOLME, P. **Análise de RNA, proteínas e metabólitos – Metodologia e procedimentos técnicos.** 1ed. 2013. 454p.

WALKER, N.F.; CLARK, S.O.; ONI, T.; ANDREU, N.; TEZERA, L.; SINGH, S.; SARAIVA, L.; PEDERSEN, B.; KELLY, D.L.; TREE, J.A.; D'ARMIENTO, J.M.; MEINTJES, G.; MAURI, F.A.; WILLIAMS, A.; WILKINSON, R.J.; FRIEDLAND, J.S.;

- ELKINGTON, P.T. Doxycycline and HIV infection suppress Tuberculosis-induced matrix metalloproteinases. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.185, p.989-997, 2012.
- WELLS, M.Y.; RIKIHISA, Y. Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. *Infect. Immun.* v.56, p.3209-3215, 1988.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v.87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.
- WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. North America. Small Anim. Practice.** v.21, p.75-98, 1991.
- YAP, E.P.H.; LO, Y.-M.D.; FLEMING, K.D.; MCGEE, J.O.D. **False positives and contamination in PCR.** In: Griffin, H.G., Griffin, A.M. (Eds.), PCR Technology. Current Innovations. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. p.249-258.
- YU, X.J.; ZHANG, X.F.; MCBRIDE, J.W.; ZHANG, Y.; WALKER, D.H. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and “*Ehrlichia platys*” to other *Ehrlichia* species determined by *GroEL* amino acid sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p.1143–1146, 2001.
- ZAVALA, M.V.G. **Aspectos clínicos e laboratoriais de cães suspeitos de infecções causadas por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em Campos dos Goytacazes, RJ.** 2007. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 76p.

CAPÍTULO II

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE *Anaplasma platys* EM CÃES DOMICILIADOS NA MICRORREGIÃO DE ITAGUAÍ, ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

SILVA, Claudia Bezerra da. **Aspectos epidemiológicos de *Anaplasma platys* em cães domiciliados na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, Brazil.** 2016. 31p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Este estudo objetivou avaliar os fatores epidemiológicos associados a detecção do DNA de *Anaplasma platys* em cães residentes na microrregião de Itaguaí, mesorregião metropolitana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Foram coletadas amostras de sangue de 416 cães provenientes dos três municípios que integram esta microrregião (Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba). A partir da coleta deste material, o DNA genômico foi extraído e submetido à amplificação de um fragmento específico do gene *gltA* presente em *A. platys*, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A partir de questionário epidemiológico realizado com os proprietários dos cães, foram selecionados fatores intrínsecos associados aos animais (sexo, definição racial, faixa etária, porte, pelagem, presença de ectoparasitos e infestação por carrapatos) assim como fatores extrínsecos, relacionados ao ambiente e aspectos da criação do animal. Entre os cães analisados neste estudo, 14,2% apresentaram-se positivos para *A. platys*. A partir da análise de regressão logística, foi possível observar que a idade foi um fator associado com a positividade, sendo que animais com até seis meses de idade apresentaram 4,49 vezes mais chance de estarem infectados por esta bactéria, comparado com as outras faixas etárias analisadas (OR=4,49, P < 0,001; IC: 1,80 a 11,23). Além disso, observou-se que cães confinados a maior parte do tempo no interior da residência ou nas dependências da propriedade apresentaram maior frequência de positividade para *A. platys* (OR = 2,57; P < 0,01; IC: 1,22 a 5,42). Da mesma forma, a ausência de um abrigo próprio para o animal na propriedade foi também um importante fator relacionado a infecção dos cães por esse agente (OR = 2,96, P < 0,0001; IC: 1,54 a 5,67). Porém, a variável com maior influência na positividade de cães para *A. platys* foi a ocorrência e o grau de infestação por carrapatos. Foi observado que cães com um elevado nível de infestação por carrapatos apresentaram 5,34 vezes mais chance de estarem infectados (OR = 5,34; P < 0,01; IC: 2,30 a 12,30), destacando que o efeito do parasitismo por esses artrópodes pode estar diretamente relacionado a transmissão do agente para os cães estudados. Logo, foi possível demonstrar que cães jovens, com a presença de um alto grau de infestação por carrapatos são fatores importantes associados à infecção destes animais por *A. platys*, na região de estudo. Além disso, aspectos relacionados ao ambiente de criação destes animais também podem contribuir para o aumento do nível de infestação por carrapatos, o que favorece a transmissibilidade e consequentemente, o aumento do risco de infecção por *A. platys* em cães da microrregião de Itaguaí, RJ.

Palavras-chave: epidemiologia molecular; cão; trombocitopenia infecciosa cíclica canina; PCR; fatores associados.

ABSTRACT

SILVA, Claudia Bezerra da. **Epidemiologic aspects of *Anaplasma platys* in dogs residing in the Itaguaí microregion, Rio de Janeiro State, Brazil.** 2016. 31p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

This study aimed to evaluate epidemiological factors associated to detection of *Anaplasma platys* DNA in dogs residing in the Itaguaí micro-region, metropolitan mesoregion of Rio de Janeiro state, Brazil. Were collected blood samples of 416 dogs from three municipalities that integrate this micro-region (Itaguaí, Seropédica and Mangaratiba). From the collection of the material, the genomic DNA was extracted and submitted to amplification of a specific fragment of *gltA* gene present in *A. platys*, by real time polymerase chain reaction (qPCR). From epidemiological survey conducted with owners of dogs were selected intrinsic factors associated with animals (gender, breed definition, age, size, pelage, ectoparasites presence and tick infestation) as extrinsic factors, related to the environment and aspects of animal creation. Among analysed dogs in this study, 14.2% were positive to *A. platys*. From the logistic regression analysis, it was observed that age was a associated factor with the positivity, and animals up to six months of age showed 4.49 times more likely to be infected by this bacteria, compared with the other analyzed age groups (OR=4.49, $P < 0.001$, IC: 1.80 a 11.23). In addition, dogs who remained confined most of the time, whether inside the residence or on the premises of the property showed a higher positivity frequency to *A. platys* (OR = 2.57; $P < 0.01$; IC: 1.22 a 5.42). Likewise, the absence of a shelter suitable for the animal on the property was also an important factor related to infection of dogs by this agent (OR = 2.96, $P < 0.0001$; CI: 1:54 to 5.67). However, the variable with the greatest influence in the positivity of dogs by *A. platys* was the occurrence and the degree of infestation by ticks. It was observed that dogs with a high degree of infestation by ticks showed 5.34 times more likely to be infected (OR = 5.34; $P < 0.01$; CI: 2.30 to 12.30), highlighting so the effect of parasitism by these arthropods may be directly related to the agent transmission for the studied dogs. Thus, it was possible to demonstrate that young dogs, with the presence of a high degree of infestation by ticks are important factors associated with infection of these animals by *A. platys* in the study region. In addition, aspects related to the animals breeding environment can also contribute to the increased level of infestation by ticks, which favors the transmission and thus increasing the risk of infection by *A. platys* in dogs.

Keywords: molecular epidemiology, dog, infectious canine cyclic thrombocytopenia, PCR, associated factors.

1 INTRODUÇÃO

Anaplasma platys é uma bactéria intracelular obrigatória, gram-negativa, pleomórfica, da ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae, que infecta as plaquetas de cães (DUMLER; BAKKEN, 1995; MURPHY et al., 1998; PUSTERLA et al., 1999; FOLEY et al., 1999; CHAE et al., 2000; SHIBATA et al., 2000; WALLS et al., 2000; DUMLER et al., 2001).

A Trombocitopenia Cíclica Canina causada por esta bactéria apresenta grande importância para a clínica de pequenos animais, devido a sua ocorrência em cães (DAGNONE et al., 2001; NEER; HARRUS, 2006). Além disso, algumas evidências apontam que este hemoparasito pode acometer seres humanos, chamando a atenção também para aspectos de saúde pública (TAMÍ; TAMÍ-MAURY, 2004; MAGGI et al., 2013).

A infecção por *A. platys* em cães é caracterizada por inclusões basofílicas e mórulas em plaquetas com posterior desaparecimento da parasitemia e início de uma marcada trombocitopenia (HARVEY et al., 1978). A maioria dos cães infectados por *A. platys* são assintomáticos (HARVEY et al., 1978; WOODY; HOSKINS, 1991; CHANG; PAN, 1996). A ocorrência de infecções concomitantes de *A. platys* com *Ehrlichia canis* e/ou *Babesia canis* em cães é um achado relativamente comum, e a utilização de um teste diagnóstico sensível e específico para este agente se faz necessário como opção na clínica de pequenos animais (HOSKINS et al., 1988; HARRUS et al., 1997; KORDICK et al., 1999; SUKSAWAT et al., 2001).

Quanto à distribuição geográfica de *A. platys*, estudos reportaram a ocorrência de cães soropositivos em diferentes áreas dos Estados Unidos (FRENCH; HARVEY, 1983) e na Bélgica (HEYMAN et al., 2007). A detecção molecular de *A. platys* em cães foi reportada em diferentes países, como Brasil (FERREIRA et al., 2007), Grécia (MYLONAKIS et al., 2004), França (INOKUMA et al., 2002), Espanha (SAINZ et al., 1999), Portugal (CARDOSO et al., 2010), Taiwan (CHANG; PAN, 1996), China (HUA et al., 2000), Japão (UNVER et al., 2003), Tailândia e Venezuela (HUANG et al., 2005; SUKSAWAT et al., 2001), Austrália (BROWN et al., 2001; BROWN et al., 2006), e na República do Congo (SANOGO et al., 2003).

A partir de estudos moleculares este hemoparasito também já foi identificado em amostras de carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato no Japão (INOKUMA et al., 2000), Espanha (SPARAGANO et al., 2003) e na República do Congo (SANOGO et al., 2003). A possível participação de *R. sanguineus* sensu lato na transmissão de *A. platys* vem sendo reportada em diversos estudos (INOKUMA et al., 2000; SUKSAWAT et al., 2001; VARELA, 2003; GREENE; HARVEY, 1990; YBAÑEZ et al., 2012). Esta espécie de carrapato tem sido associada com a transmissão de *A. platys* desde que a bactéria vem sendo frequentemente detectada em carrapatos (INOKUMA et al., 2000; WOODY; HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1997). No entanto, até o presente momento não foi comprovado se este carrapato é realmente o vetor biológico deste hemoparasito (SIMPSON et al., 1991).

Um significativo avanço na tecnologia da PCR foi o desenvolvimento de técnicas de detecção precisa de fragmentos de DNA em tempo real. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é sensível e específica, e permite detectar infecções naturais e experimentais por *A. platys* em cães (CHANG; PAN, 1996; CHANG et al., 1997; MARTIN et al., 2005). Sendo assim, a utilização de técnicas moleculares como a qPCR e o sequenciamento são alternativas para a identificação das espécies que ocorrem em cães e em seus carrapatos de áreas rurais e urbanas.

A prevalência das doenças transmitidas por carrapatos em cães, varia de acordo com as condições climáticas (KEEFE et al., 1982) e também com os fatores epidemiológicos como

distribuição de vetores, sobrevivência do cão, faixa etária, habitat e práticas de manejo (INOKUMA et al., 2003; RAMOS et al., 2009, 2010; SANTOS et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi avaliar os fatores associados com a presença do DNA de *A. platys* em cães da microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro através da técnica de PCR em tempo real (qPCR).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ocorrência e Prevalência de *Anaplasma platys* no Brasil

Muitos estudos sobre o diagnóstico das hemoparasitoses em cães dão enfoque àquelas doenças transmitidas por carrapatos, principalmente a Ehrlichiose canina e a Babesiose canina. Contudo, outros agentes de importância médico-veterinária permanecem presentes circulando entre os cães, como *Anaplasma platys*. Esta bactéria vem sendo encontrada em diversos tipos de hospedeiros, incluindo humanos, o que a caracteriza como um agente importante em seu aspecto zoonótico (ARRAGA-ALVARADO et al., 1999; TAMÍ; JORDÁN, 2002; TAMÍ; TAMÍ-MAURY, 2004; MAGGI et al., 2013). Um trabalho recente associa a ocorrência de mãe e filho infectados por *A. platys* concomitante a doença estabelecida em seu cão que vivia em sua residência (BREITSCHWERDT et al., 2014), demonstrando a importância de estudos relacionados à caracterização, diagnóstico e epidemiologia de *A. platys*.

No Brasil, estudos já foram realizados a respeito do diagnóstico de *A. platys* tanto em animais domésticos como em possíveis vetores encontrados em diferentes unidades federativas, como no Rio Grande do Sul (LASTA et al., 2013; SCHERER; MERGENER, 2014; KRAUSE et al., 2016), Pernambuco (LIMA et al., 2010; SANTOS, 2011), Mato Grosso (ALMEIDA et al., 2012), Mato Grosso do Sul (RABELO, 2014), Rio de Janeiro (FERREIRA et al., 2007; ZAVALA, 2007; CORREA et al., 2011), Minas Gerais (COSTA-JÚNIOR et al., 2013), São Paulo (CARDOZO et al., 2009), Paraná (SILVA et al., 2012), Paraíba (ROTONDANO et al., 2012), Pará (RUFINO et al., 2013) e Piauí (SILVA, 2010).

A prevalência de *A. platys* no Brasil, determinada através de métodos moleculares, varia de 4,08% a 85,72% (COSTA-JÚNIOR, 2007; DAGNONE et al., 2003; DAGNONE et al., 2004; SOUZA et al., 2004). As prevalências variam de acordo com a localidade estudada, o método de detecção e Moura et al. (2002) a partir de estudos baseados em prontuários em Cuiabá determinou uma prevalência de 1,16%, assim como a prevalência de 1,81% encontrada por Pichotano et al. (2004) em São Paulo, valores considerados relativamente baixos quando comparados aos estudos de Moreira et al. (2003) e Lima et al. (2006) que encontraram prevalências de 14,5% (Belo Horizonte, MG) e 29,3% (Recife, PE), respectivamente.

Utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo, Ramos et al. (2009) ao avaliarem cães domésticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, observaram 21,0% de positividade para *A. platys* e Ferreira et al. (2007) no Rio de Janeiro observaram 14,85%, enquanto que Silva (2010) em Teresina, Piauí, e Rodrigues et al. (2004) em zona rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, observaram 2,22% e 9,90% respectivamente. Entretanto, a positividade encontrada através desta técnica pode estar relacionada às inclusões basofílicas observadas em plaquetas não necessariamente definidas como mórulas de *A. platys* (CORREA et al., 2011), podendo decorrer em função da presença de granulações provenientes da própria constituição plaquetária (FERREIRA et al., 2008; MYLONAKIS et al., 2003), pela presença de inclusões de *E. canis* (ALMOSNY, 1998; DAGNONE, 2006) ou mesmo por artefatos resultantes da técnica que podem confundir o observador. Diante disso, o diagnóstico molecular pode ser um aliado na detecção do parasito para estudos epidemiológicos.

Em estudo realizado por Costa-Júnior (2007) foi possível observar que a frequência de positividade para *A. platys* entre diferentes áreas rurais e urbanas do estado de Minas Gerais, sendo observado nas áreas rurais 4,08% em Belo Horizonte, 7,22% em Lavras e 19,61% em

Nanuque, enquanto que nas áreas urbanas destas mesmas localidades; nenhum animal positivo em Lavras, 9,76% em Nanuque, e 5% em Belo Horizonte.

2.2 Hospedeiros e Vetores de *Anaplasma platys*

Dentre os animais domésticos, e que vivem mais próximos às residências, os cães são considerados os principais hospedeiros de *A. platys*, causando a doença chamada trombocitopenia infecciosa cíclica canina. Porém, outros estudos detectaram esse agente através da técnica de esfregaço sanguíneo e ensaios moleculares em felinos domésticos (SANTARÉM et al., 2005; LIMA et al., 2010; CORREA et al., 2011; GUIMARÃES, 2013).

Os cães são de fato os hospedeiros mamíferos mais comuns, embora existam alguns relatos de infecções em gatos, e terem sido documentadas raras infecções em impalas e nas ovelhas dos Estados Unidos (DU PLESSIS et al., 1997).

Apesar das principais descrições descreverem a importância deste agente infeccioso em pequenos animais, existem alguns relatos de casos em humanos incluindo desde a observação de mórulas intra-plaquetárias até detecção do DNA-alvo de *A. platys* através de técnica molecular (ARRAGA-ALVARADO et al., 1999; TAMÍ; JORDÁN, 2002; TAMÍ; TAMÍ-MAURY, 2004; MAGGI et al., 2013), demonstrando que esta enfermidade passou a adquirir importância também em saúde pública por apresentar potencial zoonótico.

Em relação à transmissão de *A. platys* para cães, estudos indicam o carrapato “marrom do cão” *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, como possível vetor biológico. Estes achados estão relacionados à detecção do DNA deste hemoparasito nesta espécie de carrapato em diferentes países, como Japão (INOKUMA et al., 2000), Espanha (SPARAGANO et al., 2003), República do Congo (SANOGO et al., 2003) e na Itália (RAMOS et al., 2014). Contudo, esses resultados indicam que essa espécie de carrapato está infectada por essa bactéria, mas não necessariamente possui a capacidade de infectar um hospedeiro. Além disso, como observado em um estudo desenvolvido em Granada, há indícios de que esta espécie de carrapato esteja envolvida na transmissão desta bactéria por muitas vezes serem diagnosticadas em cães, demonstrando alta prevalência e a ausência de outros vetores na localidade, fornecendo evidências adicionais de que *R. sanguineus* sensu lato pode ser um vetor (YABSLEY et al., 2008).

Em estudo realizado por Parola et al. (2003) foi também detectado DNA de *A. platys* em *Dermacentor auratus* que infestavam cães da Tailândia, sendo este um dos primeiros achados de ninfas em cães, visto que essa espécie já foi descrita infestando região auricular de humanos. Entretanto, não há comprovação da participação deste carrapato no ciclo, visto que os espécimes positivos podem ter se alimentado de sangue de cães com bacteremia.

Embora estes resultados apontem este carrapato como transmissor natural de *A. platys*, o delineamento experimental não comprovou a transmissão do agente etiológico para cães (SIMPSON et al., 1991), e até o momento não houveram conclusões sobre quem está realmente transmitindo esta bactéria para os cães.

Vale destacar também que, embora carrapatos da espécie *R. sanguineus* sensu lato sejam incriminados como possíveis vetores naturais do agente, existe a possibilidade da participação de outros Ixodídeos ou pulgas na cadeia de transmissão de *A. platys* em cães no Brasil. Entretanto, alguns trabalhos continuam a avaliar a participação de *R. sanguineus* sensu lato na possível transmissão através da detecção do DNA alvo em espécimes deste carrapato (ALMEIDA et al., 2012; RAMOS et al., 2014). Acredita-se que esta espécie de carrapato possa estar envolvida devido a sua distribuição mundial combinada a detecção da bactéria através de estudos moleculares (ALMEIDA et al., 2012), demonstrando a possível susceptibilidade de infecção em cães, além do fato de que infecções por *Ehrlichia* spp. e

Anaplasma spp. geralmente ocorrem pela saliva, através da fixação do carrapato em animais ou humanos (MADIGAN et al. 2000).

Devido ao ciclo biológico de *A. platys* ainda não estar bem elucidado quanto ao artrópode vetor, a avaliação de outros ectoparasitos que afetam cães, se faz necessário. Dentre estes, pulgas da espécie *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). Este ectoparasita apresenta grande relevância em medicina veterinária e saúde pública, por se veicular diversos patógenos, como cestóides, protozoários, vírus e riquetsias, aos animais e ao homem (VOBIS et al., 2003; RUST, 2005; PEREZ-OSORIO et al., 2008).

O carrapato vermelho do cão *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, espécie mais difundida no mundo, seja nas Américas, Europa, África, Ásia e Austrália (SAKAI, 2010), é um importante vetor de patógenos caninos como *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia conorii* e *Rickettsia rickettsii* (DANTAS-TORRES, 2008). No Brasil, Cunha et al. (2009) sugerem que há uma considerável chance da participação ativa de *R. sanguineus* sensu lato na transmissão de *Rickettsia rickettsii* para humanos. Por acometer principalmente cães e também devido à sua distribuição, existe um suporte epidemiológico substancial (MAGGI et al., 2013) que permite acreditar que este seja o principal vetor de *A. platys*. Diante desse fato, Simpson et al. (1991) desenvolveram um estudo experimental com esta espécie de carrapato em cães infectados por *A. platys*, porém sem obter sucesso. Estes autores inferem que não avaliaram a possibilidade de que *A. platys* possa ser transmitido por outros artrópodes vetores ou mesmo por outros estágios de vida de *R. sanguineus* sensu lato, e que esses estudos se fazem necessários (SIMPSON et al., 1991).

As pulgas exercem sobre seus hospedeiros diversas ações durante sua parasitose, como irritação, espoliação e inflamação (LINARDI, 2004). E além disso, independentemente de sua atuação como ectoparasito, as pulgas são incriminadas na transmissão de viroses (mixomatose), doenças bacterianas (tifo murino, bartonelose, salmoneloses, tularemia, peste), protozooses (tripanossomíases) e helmintoses (himenolepiases, dilepidiose, filarioses, infecções por tilenquídeos) (LINARDI, 2004). Em especial, observamos a participação de espécies de pulgas no ciclo de algumas riquetsioses. Por exemplo, em se tratando de tifo murino, é causado por *Rickettsia mooseri* (= *R. typhi*) e os reservatórios são roedores sinantrópicos. A transmissão se realiza pelas fezes de *Xenopsylla cheopis*, especialmente quando são elas esmagadas pelos dedos. A riquetsia infecta e se reproduz no tubo digestivo da pulga. Alguns casos humanos já foram assinalados no Brasil, nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Da mesma forma, *Bartonella henselae*, agente da doença da esfoladura em gatos, é também transmitida pelas fezes de *C. felis felis*. Recentemente, usando técnicas moleculares, *Rickettsia felis* foi diagnosticada em pulgas *Ctenocephalides* spp. em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2002). Esta espécie de bactéria é agente etiológico de uma nova riquetsiose que infecta humanos no México, Estados Unidos e Brasil (LINARDI, 2004).

Sendo assim, novos estudos se fazem necessários para determinar qual o possível vetor de *A. platys* em cães, por se tratar de uma riquetsiose que vem ampliando sua importância por acometer não só animais de companhia, mas por alguns casos já haverem sido descritos em humanos.

2.3 Aspectos Epidemiológicos

Pouco se sabe sobre os fatores de risco associados à Trombocitopenia Cíclica Canina no Brasil e no mundo. Muitos estudos enfocam a detecção desta bactéria por diferentes métodos de diagnóstico. Contudo, alguns estudos relatam alguns fatores que possam estar associados à ocorrência de *A. platys* em cães.

A localização dos cães foi um fator avaliado que se mostrou associado à ocorrência de *A. platys* em cães, como descrito por Costa-Júnior et al. (2013), onde animais a prevalência de

cães infectados por *A. platys* observado em áreas rurais (13,9%) foi estatisticamente superior que nas áreas urbanas (5,1%) ($p < 0,05$), sugestionando que os animais das áreas rurais estiveram mais expostos aos vetores desta bactéria. Essa informação foi reforçada pelo fato de que dados epidemiológicos deste mesmo estudo suportaram a hipótese de que *R. sanguineus* sensu lato seja o principal vetor de *A. platys*, pela sua presença e forte associação entre animais de áreas rurais infestados por *R. sanguineus* sensu lato e infectados por *A. platys* (OR = 4,38; $p = 0,00$; IC 95% 1,92-10,00) (COSTA-JÚNIOR et al., 2013). Ainda em relação a fatores inerentes ao cão como a infestação por ectoparasitos, Silva et al. (2012) no Paraná não observou relevância quanto a este fator. Segundo Almeida et al. (2012), a observação deste patógeno em carrapatos combinado com distribuição mundial de *R. sanguineus* sensu lato, demonstra o elevado risco de infecção em cães.

Em relação a idade dos cães acometidos por *A. platys*, Costa-Júnior et al. (2013) e Silva et al. (2012) não observaram associação das faixas etárias e a infecção por esse parasito.

Em estudo realizado por Silva et al. (2012), os autores não observaram associação estatística entre o gênero dos animais e a positividade para *A. platys*. Costa-Júnior et al. (2013) em Minas Gerais, também não observaram associação da positividade por *A. platys* com o gênero, bem como com a raça dos animais.

No trabalho realizado por Silva et al. (2012) não foi observada associação significativa com a variável “acesso à rua” analisada no momento da coleta de sangue. Quanto a associação com alterações hematológicas, a infecção por *A. platys* teve relação apenas com a trombocitopenia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da Região Estudada

O estudo foi realizado em cães de propriedades localizadas em áreas rurais e urbanas da Microrregião de Itaguaí (Figura 1), à qual pertence à mesorregião metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Esta microrregião possui uma área de 907,007 km² e, é composta por três municípios: Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba.

A microrregião de Itaguaí possui um clima caracterizado como tropical com estação seca e chuvas no verão (Aw) e com estação de inverno bem definida segundo classificação de Köppen-Geiger (PIEEL et al., 2007). Este clima apresenta temperatura média do mês mais frio do ano >18°C e temperatura média máxima acima de 25°C.

Seguem abaixo as respectivas coordenadas geográficas dos municípios:

- **Itaguaí:** 22° 51' 08" latitude Sul; 43° 46' 31" longitude Oeste; Altitude: 13 metros.
- **Seropédica:** 22° 44' 38" latitude Sul; 43° 42' 27" longitude Oeste; Altitude: 26 metros.
- **Mangaratiba:** 22° 57' 35" latitude Sul; 44°02'26" longitude Oeste; Altitude: 18 metros.

Em relação à densidade demográfica da Microrregião de Itaguaí, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população de Itaguaí apresenta 100.362 habitantes, seguido de Seropédica com 76.045 e Mangaratiba 34.966 somadas, totalizando 211.373 habitantes (IBGE, 2010).

Essa microrregião é cortada por diferentes rodovias, o que favorece o deslocamento de pessoas entre estes municípios. Esta área faz divisa com diversos municípios (Rio de Janeiro, Nova Iguaçu, Queimados, Japeri, Paracambi, Piraí, Rio Claro e Angra dos Reis).

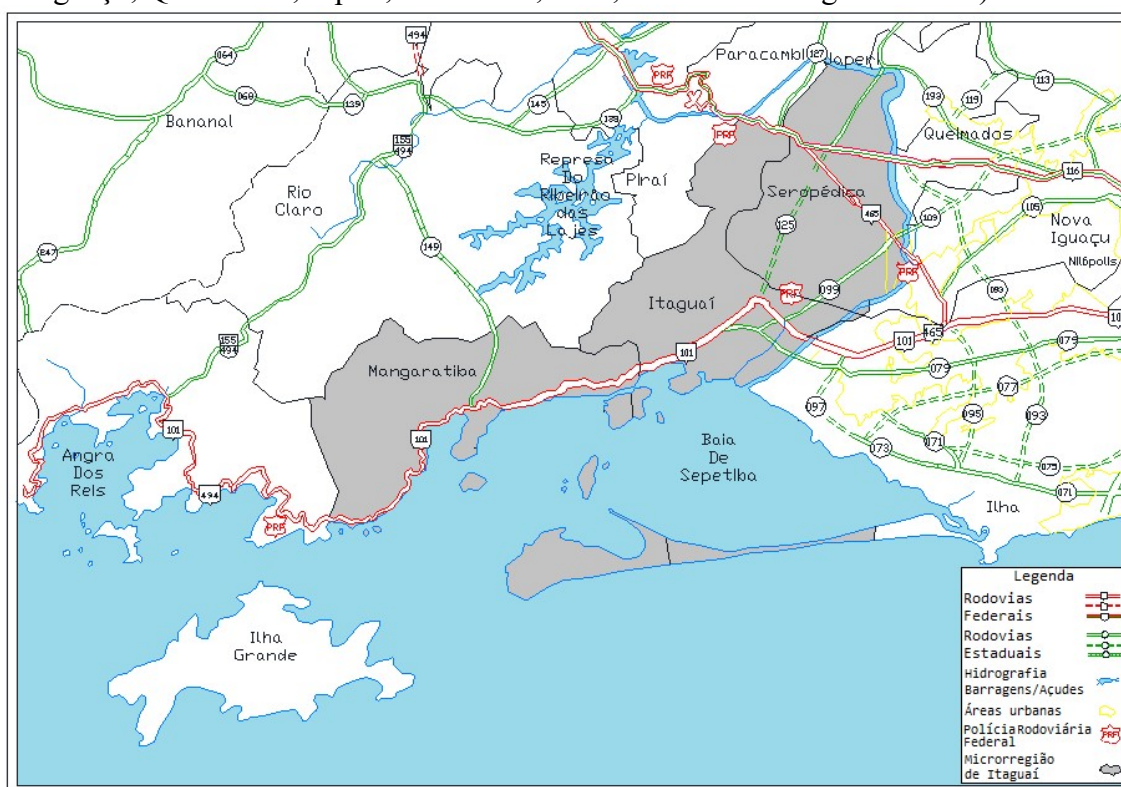


Figura 1. Localização geográfica da microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro, evidenciando os municípios de Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba. (Fonte: SILVA, 2012).

3.2 Tamanho da Amostra e Amostragem

Devido a ausência de prevalência para *A. platys* na região de estudo, considerou-se a média entre as prevalências encontradas nos trabalhos realizados por Dagnone et al. (2004), Moreira et al. (2003) e Lima et al. (2006), definindo uma prevalência esperada de 18%. Admitiu-se um intervalo de confiança de 95%, e margem de erro de 4%. O cálculo amostral foi realizado conforme a fórmula descrita por Sampaio (2002):

$$n = \frac{1,96^2 \times P_{\text{esp}}(1 - P_{\text{esp}})}{d^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra; P_{esp} = prevalência esperada; d^2 = precisão absoluta desejada.

Após a aplicação desta fórmula, foi estabelecida a coleta de 354 amostras na microrregião estudada.

A coleta das amostras foi realizada por conveniência, onde as residências foram visitadas e, após consentimento do proprietário ou responsável, os animais foram submetidos aos exames clínicos e as amostras de sangue foram coletadas.

Segundo informações divulgadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) após o Censo 2010, as populações de Itaguaí (100.362), Seropédica (76.045), e Mangaratiba (34.966) somadas, totalizam 211.373 habitantes (IBGE, 2010). Segundo informações do setor de vigilância da Secretaria de Saúde do Estado, a população canina dos municípios é baseada na população humana (critério adotado pelo estado do Rio de Janeiro: 2,5% da população humana de cada município). Desta forma as amostras coletadas foram estratificadas de acordo com a população de cada município.

O número total de amostras coletadas na microrregião de Itaguaí foi de 416, distribuídas da seguinte forma: Itaguaí (n=159) e Seropédica (n=153) e Mangaratiba (n=104), no período de abril de 2010 a abril de 2011.

3.3 Visita às Residências e Aplicação de Questionário Epidemiológico

Nas residências visitadas, foi esclarecido a cada proprietário a razão do estudo. Após o seu consentimento, foi aplicado um questionário semi-estruturado (Anexo 1) na forma de entrevista, como instrumento de investigação, visando recolher informações inerentes ao animal: gênero (fêmea ou macho), faixa etária (≤ 6 meses, >6 meses a ≤ 2 anos, >2 a ≤ 5 anos, ou >5 a 10 anos), definição racial (sem raça definida ou com raça definida), porte (pequeno, médio ou grande), tamanho do pêlo (curto, médio ou longo), escore corporal (magro, normal ou obeso), comportamento (apático ou ativo), histórico de distúrbios hemorrágicos (sim ou não) e presença de ectoparasitos (sim ou não); e aos aspectos extrínsecos ao cão envolvendo a: origem, condições ambientais de manejo e criação dos animais [municípios de origem (Seropédica, Itaguaí ou Mangaratiba), área (rural ou urbana), se o animal vive dentro da residência (sim ou não), locais de acesso (com ou sem acesso às áreas de mata/pasto), se o animal vive próximo à área de mata/pastagem (sim ou não), se o animal nasceu na propriedade (sim ou não), hábito do animal (solto ou preso), se possui contato direto com outras espécies (sim ou não), condições de limpeza do ambiente (inadequada ou satisfatória), e se tem assistência veterinária (sim ou não).

Essas informações foram coletadas afim de caracterizar quais os fatores em relação ao cão e seus hábitos que possam estar associados a infecção por *A. platys*. Em especial, as características extrínsecas aos cães, foram categorizadas de maneira a esclarecer quais os fatores relacionados ao manejo dos cães que possam propiciar que estes animais estejam mais

susceptíveis à infectar-se por este agente infeccioso.

A variável relacionada à limpeza do ambiente foi categorizada considerando a observação da condição sanitária no momento da coleta, somada à frequência de recolhimento de fezes informada pelo proprietário.

Todas as informações adquiridas a partir de questões pré-estabelecidas foram tabuladas a fim de avaliar estatisticamente os possíveis fatores associados à positividade de cães a *A. platys*.

3.4 Investigação de Infestação Parasitária

Durante a visita às residências, os animais e o ambiente foram inspecionados para a identificação dos ectoparasitos presentes em cães domiciliados na microrregião de Itaguaí. Em algumas residências foram coletados alguns espécimes para amostragem, e armazenados em tubos contendo álcool isopropílico. Posteriormente, essas amostras foram levadas ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (LHV / E.E.P.P. W.O. Neitz), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para identificação dos ectoparasitos, com base em chaves taxonômicas (BICHO; RIBEIRO, 1998; ONÓFRIO et al., 2006; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014).

3.5 Coleta de Sangue

Uma amostra de 5 mL de sangue periférico foi coletada de cada animal através de punção da veia cefálica, e colocadas em tubo com anticoagulante EDTA, sendo devidamente identificado e acondicionado em recipiente térmico e encaminhada ao LHV / E.E.P.P. W.O. Neitz, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para o seu processamento. As amostras de sangue total foram acondicionadas em tubos estéreis de polipropileno devidamente identificados, e mantidos a temperatura de -80°C.

3.6 Extração de DNA, Quantificação e Pureza das Amostras

As amostras de sangue total foram submetidas ao processo de extração de DNA total com o auxílio do kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega[®]), conforme protocolo do fabricante. Após a extração do DNA, cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 - Thermo Scientific), e posteriormente acondicionadas e alíquotadas em novos tubos de polipropileno de 0,6mL, após diluição em água estéril, sob a concentração final de 100 ng/μL de DNA. Os tubos foram prontamente identificados, armazenados em caixas e mantidos à temperatura de -80°C.

3.7 PCR em Tempo Real (qPCR)

As amostras de DNA de sangue dos cães foram submetidas à amplificação de um fragmento específico de 84pb do gene *gltA* específico para *A. platys* através da qPCR utilizando sondas de hidrólise descrita no Capítulo I desta tese. Amostras foram consideradas positivas com o índice “cycle quantification” (Cq) menor que 40 ciclos, desde que o resultado se repetisse em duplicata.

O DNA utilizado como controle positivo na reação foi obtido de sangue de um cão sintomático com inclusões em plaquetas e confirmado através de técnicas moleculares específicas para *A. platys* (“Genbank” ID: FJ755157). Água livre de Nuclease (Ambion[®]) foi usada como controle negativo.

3.8 Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos valores de frequência de positividade dos cães por *Anaplasma platys*, considerando um intervalo de confiança de 95% de significância. As características extrínsecas e intrínsecas dos cães (variáveis independentes) foram comparadas em função da frequência de positividade, através do teste Qui-quadrado e/ou Exato de Fisher, ao nível de 15% de significância. Para esta análise foi utilizado do software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). Estas variáveis que apresentaram diferença estatística ($p < 0,15$) foram incluídas em um modelo de regressão logística múltipla, ao nível de 5% de significância.

A presença e o nível de infestação por carrapatos e ectoparasitos foram avaliados isoladamente em função da positividade dos cães por *A. platys*. Foram selecionados quatro níveis de variação da infestação (ausente, leve, moderada e alta) e a associação foi avaliada ao nível de $p < 0,05$ através do teste Qui-quadrado com a positividade dos animais. Ambas variáveis associadas à infestação foram analisadas através do modelo de regressão logística múltipla, ao nível de 5% de significância, sendo incluída no modelo final somente a variável significante.

A análise multivariada destes dados foi realizada através da regressão logística, utilizando o método *Foward*, e o modelo final foi avaliado pelo teste de Hosmer e Lemeshow ($p > 0,05$). Procedeu-se também uma análise de correlação de *Phi* com as variáveis independentes selecionadas para a regressão logística, com o objetivo de verificar a colinearidade e eliminar as variáveis altamente correlacionadas do modelo. Neste caso, permaneceu no modelo final a variável independente que apresenta maior importância biológica.

Uma análise descritiva foi realizada com os dados relativos aos cães infectados e em relação à presença de sintomas ou sinais clínicos sugestivos da infecção por *A. platys*. Para essas etapas utilizou-se o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010).

3.9 Princípios Éticos

Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP/UFRRJ) sob o protocolo N.º 363/2013, informando que este projeto de pesquisa que está sob o processo 23083.003990/2013-93, atende aos princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais. Todos os procedimentos foram realizados por uma equipe de médicos veterinários capacitados.

4 RESULTADOS

Das amostras testadas na qPCR, 14,2% (n = 59/416) foram consideradas positivas para *A. platys*, apresentando o *Cq* médio de $30,88 \pm 6,07$ ciclos, variando de 18,68 a 38,95 ciclos.

Dentre os 59 animais em que foi detectado DNA de *A. platys*, 38,98% (n = 23/59) pertenciam ao município de Seropédica, enquanto 38,98% (n = 23/59) pertenciam a Itaguaí e 22,03% (n = 13/59) a Mangaratiba.

Em relação as variáveis intrínsecas aos cães, observou-se que apenas a faixa etária, a presença de ectoparasitos e a infestação por carrapatos foram fatores associados à positividade dos animais por *A. platys*, ao nível de 15% de significância (Tabela 1). Dos espécimes de ectoparasitos coletados foram identificados carrapatos adultos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, sendo este o maior grupo de ectoparasitos coletados, além de *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma ovale* e estágios imaturos de Ixodídeos. Foram observados também piolhos da espécie *Trichodectes canis* e pulgas *Ctenocephalides felis* e *Ctenocephalides canis*, sendo que tanto os ectoparasitos, quanto isoladamente à infestação por carrapatos foram observados em diferentes níveis de infestação nos animais acometidos.

Tabela 1. Análise descritiva e bivariada das características intrínseca aos cães infectados por *Anaplasma platys*, diagnosticados através da qPCR na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016

Características intrínsecas dos cães	Análise descritiva			Análise bivariada	
	N	(%)	IC de 95%	χ^2	P
Gênero					
Fêmea	196	12,8	(8,08 – 17,43)	0,62	0,43
Macho	220	15,5	(10,68 – 20,23)		
Definição racial					
SRD	285	15,1	(10,93 – 19,24)	0,60	0,42
Raça definida	131	12,2	(6,61 – 17,82)		
Faixa etária					
≤6 meses	35	42,9	(26,46 – 59,25)	27,47	0,00
>6 meses a ≤ 2 anos	106	15,1	(8,28 – 21,91)		
>2 a ≤ 5 anos	125	9,6	(4,44 – 14,76)		
>5 a 10 anos	150	10,7	(5,73 – 15,61)		
Tamanho					
Pequeno	130	15,4	(9,18 – 21,59)	2,52	0,28
Médio	222	15,3	(10,58 – 20,05)		
Grande	64	7,8	(1,24 – 14,39)		
Pêlo					
Curto	206	16,0	(11,01 – 21,03)	3,42	0,18
Médio	142	9,9	(4,96 – 14,76)		
Longo	68	17,6	(8,59 – 26,71)		
Possui ectoparasitos?*					
Sim	269	19,3	(14,61 – 24,05)	16,57	0,00
Não	147	4,8	(1,32 – 8,20)		
Infestação por carrapatos?					
Sim	192	20,8	(15,09 – 26,58)	12,96	0,00
Não	224	8,5	(4,83 – 12,13)		
TOTAL	416	14,2	(10,83 – 17,54)		

N: número de animais examinados pela qPCR; χ^2 : Teste Qui-quadrado; P: p-valor; IC: Intervalo de Confiança. SRD: Sem raça definida. *Ectoparasitos observados foram considerados infestações simultâneas por carrapatos, pulgas ou piolhos.

Das doze variáveis extrínsecas selecionadas no estudo foram incluídas no modelo de regressão logístico somente sete variáveis ($P < 0,15$), sendo estas o tempo de permanência do cão no interior da residência, os locais de acesso do animal, se o animal vive próximo a áreas de mata e/ou pastagem, o hábito do animal (preso ou solto), a presença de abrigo para o cão, a condição de limpeza aonde o animal permanece e se o animal possui assistência veterinária periódica (Tabela 2).

Tabela 2. Análise descritiva e bivariada das características extrínsecas relacionadas aos cães infectados por *Anaplasma platys*, diagnosticados através da qPCR na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016

Características extrínsecas aos cães	Análise descritiva			Análise bivariada	
	N	(%)	IC de 95%	χ^2	P
Municípios					
Seropédica	153	15,0	(9,37 – 20,70)	0,34	0,84
Itaguaí	159	14,5	(9,00 – 19,93)		
Mangaratiba	104	12,5	(6,14 – 18,86)		
Área					
Rural/Periurbano	195	15,9	(10,77 – 21,03)	0,88	0,34
Urbana	221	12,7	(8,28 – 17,06)		
Animal vive mais dentro da residência					
Sim	44	22,7	(10,34 – 35,11)	2,95	0,08
Não	372	13,7	(8,73 – 16,27)		
Contato direto com outras sp. Animais					
Sim	194	16,0	(10,82 – 21,14)	0,96	0,32
Não	222	12,6	(8,25 – 16,98)		
Locais de acesso do animal					
Áreas de Mata/pasto	214	19,6	(14,30 – 24,95)	11,88	0,00
Sem acesso a Mata/pasto	202	8,4	(4,59 – 12,24)		
Animal vive próximo a área de mata/pastagem?					
Sim	169	18,3	(12,51 – 24,18)	4,04	0,06
Não	247	11,3	(7,38 – 15,29)		
Animal nasceu na propriedade?					
Sim	142	13,4	(7,78 – 18,98)	0,11	0,73
Não	274	14,6	(10,42 – 18,78)		
Hábito do animal					
Solto	339	12,1	(8,62 – 15,57)	6,52	0,01
Preso	77	23,4	(13,92 – 32,83)		
Apresenta abrigo?					
Sim	276	10,5	(6,89 – 14,13)	9,10	0,00
Não	140	21,4	(14,63 – 28,23)		
Condição de Limpeza do ambiente?					
Inadequada	34	23,5	(9,27 – 37,79)	2,32	0,13
Satisfatória	382	13,4	(9,94 – 16,76)		
Tem assistência veterinária					
Sim	180	7,2	(3,44 – 11,00)	12,48	0,00
Não	236	19,5	(14,44 – 24,55)		
Usa produtos parasiticidas no animal?					
Sim	273	15,4	(11,10 – 19,66)	1,22	0,26
Não	143	11,9	(6,58 – 17,19)		
TOTAL	416	14,2	(10,83 – 17,54)		

N: número de animais examinados pela qPCR; χ^2 : Teste Qui-quadrado; P: p-valor; IC: Intervalo de Confiança.

Sob os aspectos das variáveis relacionadas à infestação por artrópodes, foi possível observar que tanto a presença, quanto o grau de infestação por ectoparasitos e/ou carrapatos foram significativos em relação a infecção dos cães por *A. platys*, através do teste Qui-quadrado ($P < 0,01$) (Tabelas 1 e 3). Com isso, a variável infestação por carrapatos foi selecionada para participar do modelo final da regressão logística, visto que carrapatos são incriminados como os possíveis vetores de *A. platys*.

Tabela 3. Análise bivariada da frequência de *Anaplasma platys* em cães analisados, através da PCR em tempo real, em função do grau de infestação por artrópodes observados nos animais da microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016

Grau da infestação por artrópodes	N	(%)	Bivariada	
			χ^2	P
Infestação por carrapatos				
Sem infestação	224	8,5	34,84	0,00
Infestação leve	117	14,5		
Infestação moderada	32	18,8		
Infestação elevada	43	39,5		
Infestação por ectoparasitos**				
Sem infestação	147	4,8	29,25	0,00
Infestação leve	146	12,3		
Infestação moderada	56	19,6		
Infestação elevada	67	34,3		

P: p-valor; **Ectoparasitos observados foram considerados infestações simultâneas por carrapatos, pulgas ou piolhos.

Na tabela 4 estão demonstradas as variáveis contidas no modelo de regressão final com as variáveis independentes significativas associadas à infecção dos cães por *A. platys*, na área de estudo. Das variáveis relacionadas, a idade foi um fator relevante para a positividade dos cães, sendo observado que animais com até seis meses de idade apresentaram 4,49 vezes mais chance de estarem infectados por esta bactéria, em relação às demais faixas etárias analisadas ($P < 0,001$; IC: 1,80 – 11,23). Além disso, cães que permaneciam presos a maior parte do tempo, seja no interior da residência, ou nas dependências da propriedade foi um fator associado à positividade por *A. platys* (OR=2,57; $P < 0,01$; IC: 1,22 – 5,42). Da mesma forma, a ausência de um abrigo para o cão, como a presença de um canil, demonstrou também ser um fator relacionado à infecção dos cães por este agente (OR=2,96; $P < 0,0001$; IC: 1,54 – 5,67). Contudo, a variável com maior influência na positividade dos cães por *A. platys* foi a ocorrência e o grau de infestação por carrapatos. Observou-se que cães com elevado grau de infestação por carrapatos apresentaram 5,34 vezes mais chances de estarem infectados, assim como aqueles com moderada infestação (OR=2,59; $P < 0,01$; IC: 0,91 – 7,36), destacando assim o efeito do parasitismo por estes artrópodes podem ter relação direta com a transmissão do agente para os cães estudados.

Tabela 4. Modelo de regressão logística final dos fatores associados à infecção dos cães por *Anaplasma platys* na microrregião de Itaguaí, estado do Rio de Janeiro, 2016

Variáveis Independentes	Positivos		Análise Multivariada***				
	(N)	(%)	C (β)	EP	P	OR	IC 95%
Idade							
≤6 meses	35	42,9	1,50	0,46	0,00	4,49	(1,80 – 11,23)
>6 meses a ≤ 2 anos	106	15,1	0,19	0,40	0,63	-	-
>2 a ≤ 5 anos	125	9,6	-0,40	0,42	0,34	-	-
>5 a 10 anos	150	10,7	*	*	*	*	*
Criação do animal							
Solto	339	12,1	*	*	*	*	*
Preso	77	23,4	0,94	0,38	0,01	2,57	(1,22 – 5,42)
Apresenta abrigo?							
Sim	276	10,5	*	*	*	*	*
Não	140	21,4	1,08	0,33	0,00	2,96	(1,54 – 5,67)
Infestação por carrapatos?							
Ausente	224	8,5	*	*	*	*	*
Leve	117	14,5	0,24	0,37	0,51	-	-
Moderada	32	18,8	0,95	0,53	0,07	2,59	(0,91 – 7,36)
Alta	43	39,5	1,67	0,42	0,00	5,34	(2,30 – 12,30)
Constante do modelo	-	-	-3,59	0,47	0,00	-	-

N: número de animais; (%): Percentual de positivos; C(β); Coeficiente do modelo; EP: Erro padrão; P: p-value; OR: *Odds Ratio*; IC: Intervalo de Confiança. *Categoria de Referência. ***Teste de Hosmer e Lemeshow (p=0.11).

Sobre alguns aspectos clínicos observados nos animais, vale destacar em relação ao comportamento dos cães, que a proporção de animais apáticos (31,8%; n = 7/22) foi maior nos cães infectados por *A. platys* (Tabela 5). Observou-se também que 12,9% (n = 4/31) dos animais com escore corporal “magro” apresentaram-se positivos para *A. platys* quando submetidos ao diagnóstico através da qPCR.

Dentre os distúrbios de coagulação, foram observados casos com ocorrência de petéquias, equimoses, bem como fragilidade capilar acompanhado de retardo na coagulação durante o momento da coleta de sangue periférico dos animais. Contudo, somente 5,9% (n = 1/17) dos animais que apresentavam esses quadros clínicos estiveram positivos para *A. platys* (Tabela 5). Quanto ao histórico de epistaxe, rinorragia ou gengivorragia nos animais amostrados nesse estudo, observou-se que 15,8% (n = 3/19) dos cães que apresentaram esses sinais estiveram positivos para *A. platys* (Tabela 5).

Tabela 5. Alterações clínicas observadas nos cães em função do diagnóstico da infecção por *Anaplasma platys*, no estado do Rio de Janeiro, 2016

Alterações clínicas	qPCR (<i>A. platys</i>)	
	(n)	(%)
Escore corporal		
Magro	31	12,9
Normal	370	14,6
Obeso	15	6,67
Comportamento do animal		
Apático	22	31,8
Ativo	394	13,2
Coloração da mucosa ocular		
Hipocorada	301	13,0
Normocorada	110	18,2
Hiperacorada	5	0,0
Coloração da mucosa oral		
Hipocorada	330	13,3
Normocorada	83	18,1
Hiperacorada	3	0,0
Distúrbio de coagulação na pele		
Sim	17	5,9
Não	399	14,5
Histórico de epistaxe, rinorragia ou gengivorragia		
Sim	19	15,8
Não	397	14,4

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa; n: número de animais por categoria.

5 DISCUSSÃO

As frequências de cães positivos observados neste estudo foram semelhantes ao observado por Ferreira et al. (2007) que detectou o DNA de *A. platys* através da técnica de nPCR em 15,8% das amostras analisadas. Essa relação pode ser explicada pelo fato de que o estudo desenvolvido por Ferreira et al. (2007) foi realizado com amostras provenientes de diferentes localidades da cidade do Rio de Janeiro, onde as características ambientais e climáticas são semelhantes às da microrregião de Itaguaí. Além disso, ambos os estudos foram delineados utilizando o critério de amostragem por conveniência, a coleta amostras de sangue de cães tanto de machos quanto de fêmeas, de diferentes definições raciais e faixas etárias.

A positividade para este agente não apresentou associação significativa ($p > 0,05$) em relação ao município de origem, demonstrando que *A. platys* está proporcionalmente distribuído em Seropédica, Itaguaí e Mangaratiba. A prevalência de *A. platys* no Brasil, determinada através de métodos moleculares, varia de 4,1% a 85,7% (COSTA-JÚNIOR, 2007; DAGNONE et al., 2003; DAGNONE et al., 2004; SOUZA et al., 2004), estando o presente estudo dentro desta faixa de variação.

Sobre a distribuição deste agente, muitos estudos adotam o esfregaço sanguíneo como método de diagnóstico (MOURA et al., 2002; MOREIRA et al., 2003; RAMOS et al., 2009). Contudo, neste tipo de estudo, os resultados descritos variam de acordo com a região estudada, grupo de animais avaliados e principalmente de acordo com a capacidade e experiência técnica do observador na análise dos esfregaços sanguíneos na microscopia óptica. Moura et al. (2002) a partir de estudos baseados em prontuários com base em resultados obtidos com esfregaço sanguíneo em Cuiabá, determinou uma prevalência de 1,16%, assim como a prevalência de 1,81% encontrada por Pichotano et al. (2004) em São Paulo. Esses valores foram considerados relativamente baixos quando comparados aos estudos de Moreira et al. (2003) e Lima et al. (2006) que encontraram também através da adoção do esfregaço sanguíneo como técnica de diagnóstico, prevalências de 14,5% (Belo Horizonte, MG) e 29,3% (Recife, PE), respectivamente. A diferença entre esses valores pode estar relacionada ao tempo de desenvolvimento do estudo, visto que a investigação realizada por Moreira et al. (2003) foi desenvolvida durante três anos consecutivos, e o de Lima et al. (2006) em dois anos contínuos, enquanto os demais estudos utilizaram amostras coletadas em um período mais restrito, podendo minimizar a chance de adquirir amostras de animais positivos em determinada época do ano.

Utilizando a técnica de esfregaço sanguíneo, Ramos et al. (2009) ao avaliarem cães domésticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, observaram 21,0% de positividade para *A. platys* e Ferreira et al. (2007) no Rio de Janeiro observaram 14,85%, enquanto que Silva (2010) em Teresina, Piauí, e Rodrigues et al. (2004) em zona rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, observaram 2,22% e 9,90% respectivamente. Isso demonstra que as frequências de *A. platys* podem variar entre os estados brasileiros, e mais estudos são necessários para elucidar quais os fatores que estão associados à frequência de animais infectados nessas regiões, visto que poucos estudos têm caracterizado a ocorrência da trombocitopenia cíclica canina.

Entretanto, a positividade encontrada através desta técnica pode estar relacionada às inclusões basofílicas observadas em plaquetas não necessariamente definidas como mórulas de *A. platys* (CORREA et al., 2011), podendo decorrer em função da presença de granulações provenientes da própria constituição plaquetária (FERREIRA et al., 2008; MYLONAKIS et al., 2003), ou mesmo por artefatos resultantes da técnica que podem confundir o observador. Além desses fatores, alguns trabalhos discutem a possibilidade da ocorrência de inclusões de

E. canis em plaquetas (ALMOSNY, 1998; DAGNONE, 2006). Corroborando esses achados, foram descritos alguns casos em que mórulas foram identificadas em plaquetas durante a análise do esfregaço sanguíneo, e quando testadas em PCR específicas, as amostras foram negativas para *A. platys* e positivas para *E. canis* (RAMOS et al., 2009). Diante disso, métodos moleculares podem ser aliados na detecção do parasito para estudos epidemiológicos. Sabe-se que estudos epidemiológicos geralmente utilizam métodos sorológicos para a detecção do agente pesquisado, contudo, um dos kits comercializados no Brasil apresenta uma característica que compromete a eficiência no diagnóstico sugerindo que podem ocorrer reações cruzadas entre *A. platys* e *Anaplasma phagocytophilum* ou *Ehrlichia canis*, informação essa fornecida pelo fabricante deste kit, como também por trabalhos científicos (GREENE, 2006; BARR, 2009; BREITSCHWERDT, 2013).

Em estudo realizado por Costa-Júnior (2007) foi possível observar que a frequência de positividade para *A. platys* foram diferentes entre áreas rurais e urbanas do estado de Minas Gerais, sendo observado nas áreas rurais 4,08% em Belo Horizonte, 7,22% em Lavras e 19,61% em Nanuque, enquanto que nas áreas urbanas destas mesmas localidades; nenhum animal positivo foi observado no município de Lavras, 9,76% foi observado em Nanuque, e 5% em Belo Horizonte.

Em estudo realizado por Silva et al. (2012), os autores também não observaram associação estatística entre o gênero dos animais e a positividade por *A. platys*, assim como descrito por Cardoso et al. (2015). Costa-Júnior et al. (2013) em Minas Gerais ($p=0,82$), também não observaram associação da positividade por *A. platys*, nem com o gênero e nem com raça dos animais, corroborando os resultados do presente estudo. Moreira et al. (2003) encontraram maior percentual de fêmeas infectadas, enquanto Silva (2010) observou que a frequência de machos positivos para *A. platys* foi mais elevada, ambos resultados que diferem do presente estudo. Isso demonstra que ainda não está sedimentado que exista uma relação entre o gênero dos animais e a infecção por esta bactéria.

Com relação a idade dos cães foi possível observar associação com a positividade para *A. platys* entre as faixas etárias, o que difere dos resultados obtidos por Costa-Júnior et al. (2013) ($p = 0,22$) e Silva et al. (2012) ($p = 0,61$) que não demonstraram influência dessa característica. No presente estudo, animais com idade inferior a seis meses apresentaram maior frequência de positividade e 4,49 vezes mais chance de estarem infectados por *A. platys*, fato este que pode estar relacionado ao contato destes animais muito jovens com o agente em primo-infecção, estando esses animais em condição de maior susceptibilidade. Logo, animais mais velhos, por apresentarem maiores chances de exposição a *A. platys* podem ter desenvolvido uma resposta imune mais eficaz, tornando-se mais resistentes ao agente infeccioso. Apesar dos estudos realizados até o momento não definirem a idade mais associada à infecção por esta bactéria, sabe-se que em cães jovens pode existir uma predileção de *A. platys* em infectar células jovens, segundo Tommasi et al. (2014). De acordo com esses autores, inclusões parasitárias em células precursoras de trombócitos provenientes da medula óssea de animais jovens foram encontradas, e que outros estudos são necessários para estabelecer conclusivamente se animais mais jovens podem representar um fator de predisposição para infecção de precursores de plaquetas.

A variável “animal criado dentro da residência”, através da análise de regressão logística neste estudo apresentou significância de 6%, sendo, portanto, retirada do modelo final. Contudo, mesmo não estando no modelo final, foi observado que este fator esteve muito próximo da associação com a positividade para *A. platys*. Este fato reforça ainda mais os achados entre positividade dos cães e aspectos da criação, como o hábito do animal preso no interior da residência e a ausência de um abrigo específico para o cão. Assim, é possível que artrópodes que atuam como vetores desta bactéria estejam mais adaptados ao ambiente doméstico ou antrópico, ampliando assim as chances da infecção dos cães criados sob estas

condições ambientais. Isso é bem demonstrado, quando se observa que o maior número de espécimes de ectoparasitas observados nos cães foram carrapatos da espécie *R. sanguineus* sensu lato e pulgas da espécie *C. felis*, ambos altamente adaptados ao ambiente doméstico. Vale destacar também que, embora carrapatos da espécie *R. sanguineus* sensu lato sejam incriminados como possíveis vetores naturais do agente (SANOGO et al., 2003; YABSLEY et al., 2008; COSTA-JÚNIOR et al., 2013), existe a possibilidade da participação de outros Ixodídeos na cadeia de transmissão de *A. platys* em cães no Brasil. Além disso, o ciclo biológico de *A. platys* ainda não está bem elucidado, recordando que o único estudo experimental para confirmação da participação de *R. sanguineus* sensu lato como vetor realizado por Simpson et al. (1991) não obteve sucesso, demonstrando que são necessários estudos investigando outros ectoparasitos que acometam cães. Dentre estes ectoparasitos que inspiram uma curiosidade científica, encontram-se as pulgas da espécie *C. felis*, que apresenta uma ampla capacidade de veicular diversos patógenos, como cestóides, protozoários, vírus e rickettsias, aos animais e ao homem (VOBIS et al., 2003; RUST, 2005; PEREZ-OSORIO et al., 2008). No presente estudo, encontraram-se alguns animais infestados por piolhos, porém não associamos as infestações isoladas por ectoparasitos às positivities para *A. platys*. Desta forma, esses achados permitem apenas suscitar a possibilidade de que outros vetores possam estar associados à transmissão desta bactéria na microrregião de Itaguaí a partir dos achados epidemiológicos descritos estatisticamente para a variável infestação por carrapatos pela multivariada, e presença de ectoparasitos pela bivariada. Contudo, em estudo realizado na Austrália, Brown et al. (2005) suspeitam que uma espécie de piolho *Heterodoxus spiniger* possa ser o transmissor deste agente, visto que a prevalência de *A. platys* e de *H. spiniger* em determinado período do ano é alta, enquanto a de *R. sanguineus* sensu lato é considerada muito inferior. Por essa razão, estudos futuros se fazem necessários para investigar quais os potenciais vetores associados à transmissão de *A. platys*.

Um fator que pode interferir na manutenção do ciclo de hemoparasitos é a atuação do proprietário no controle de ectoparasitos nos animais e no ambiente com produtos parasiticidas, como método de prevenção da dispersão das doenças. Esse não foi um fator associado estatisticamente à positividade para *A. platys* nesse estudo. Porém, a informação cedida pelo proprietário sobre a utilização de produtos químicos e sua atenção para cuidados sanitários no ambiente, não nos permite concluir se sua atuação esteja ocorrendo adequadamente. Sabe-se que o uso de produtos de forma indiscriminada, sem respeitar a dose e frequência de aplicação recomendadas, podem causar resistência do artrópode aos princípios ativos, bem como seleção de vetores mais resistentes, propiciando que os vetores se mantenham no ambiente e continuem a transmitir agentes patogênicos (STULL; WEESE, 2015).

Em muitos casos, animais de companhia, como os cães, são criados no interior das próprias residências, sendo este fato muitas vezes relacionado à idade do animal, a raça, e a questões inerentes a conduta do proprietário. Raças de pequeno porte, assim como, animais muito jovens, muitas vezes são criados na própria residência, sem apresentarem um abrigo específico para o animal. Este fato pode levar a adaptação de seus ectoparasitos a este ambiente mais domiciliar, que muitas vezes, nem são notados pelos proprietários, nas fases de vida livre no interior da residência. A limpeza do ambiente aonde o animal permanece maior parte do tempo também é um fator muito importante, visto que animais criados em ambiente sanitariamente impróprio foram mais infectados. Vale destacar ainda que a presença de abrigo específicos dos animais, como a construção de canis, muitas vezes favorece a uma limpeza mais apurada pelos proprietários, com produtos de limpeza mais específicos, o que nem sempre ocorre no interior da casa ou nas adjacências da residência, favorecendo o estabelecimento de ectoparasitos nestes locais. Esta conjuntura de fatores observados como, animais muito jovens, criados presos na residência, sem a presença de um abrigo específico

para o animal, com elevada carga de ectoparasitos pode aumentar a probabilidade para a infecção por *A. platys*.

Neste estudo, foi possível demonstrar através da análise bivariada (Qui-quadrado) que cães com acesso ou criados nos arredores de locais de mata e/ou pastagem, foram associadas a positividade ($\chi^2=11,8$; $P<0,001$; $\chi^2=4,04$; $P<0,06$). Entretanto, estas variáveis não foram significativas após a análise multivariada. Este achado suscita a possibilidade que o acesso/proximidade do cão com este ambiente silvestre pode favorecer o contato do animal com possíveis vetores competentes oriundos da fauna silvestre/ou do campo. Alguns estudos realizados em outros países têm demonstrado que outros carrapatos que infestam uma diversidade de hospedeiros tanto no ambiente doméstico como silvestre, podem estar envolvidos na infecção e transmissão de *A. platys*, como as espécies *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor nuttalli* (JAVKHLAN et al., 2014), *Rhipicephalus turanicus* (HARRUS et al., 2011) e *Dermacentor auratus* (PAROLA et al., 2003). Contudo, nesses trabalhos não foram realizadas avaliações experimentais sobre o potencial de transmissão, mas somente a detecção do DNA de *A. platys*, o que não determina o real papel destes artrópodes como vetores, apenas suscitando seu envolvimento, demonstrando que futuros estudos são necessários para confirmar sua participação efetiva do ciclo biológico desta bactéria.

Como as variáveis relacionadas ao acesso ou criação nos arredores de locais de mata e/ou pastagem não foram influentes através da modelagem dos dados, ratifica que para a maioria dos casos, o principal vetor estaria adaptado ao ambiente antrópico, mas que poderia haver outros vetores também competentes, que habitam um ambiente silvestre, e que participam da transmissão desta bactéria para cães domiciliados.

Apesar dos aspectos clínicos avaliados não entrarem na regressão logística, eles foram analisados de maneira descritiva, e observou-se que a proporção de cães com distúrbios de coagulação, histórico de epixtase, rinorragia, gengivorragia, bem como animais com escore corporal inferior, apresentaram uma frequência maior de positividade para *A. platys*. Sabe-se que a trombocitopenia em decorrência da infecção por *A. platys*, é considerada o resultado da lesão direta às plaquetas pela replicação do patógeno, principalmente na fase aguda da infecção (FRENCH; HARVEY, 1983), desencadeando quadros de fragilidade capilar e processos hemorrágicos como observado nesse estudo, pela diminuição no número de plaquetas. Os sinais clínicos causados pela doença incluem letargia, anorexia e febre (TROTTA et al., 2009), o que são fatores que propiciam o enfraquecimento do animal e queda no escore corporal. Vale citar que em alguns casos, cães infectados por este agente apresentam-se assintomáticos (HARRUS et al., 1997), e além disso, tanto a trombocitopenia como os outros sinais clínicos encontrados nesse estudo não são patognomônico da doença infecciosa causada por *A. platys* (FERREIRA et al., 2008).

6 CONCLUSÃO

A idade dos cães e a presença de elevado grau de infestação por carrapatos são os fatores mais importantes relacionados à infecção destes animais por *A. platys* na microregião de Itaguaí, no estado do Rio de Janeiro.

O modo de criação e tipo de ambiente em que estes cães estão também são fatores relacionados à infecção destes animais por este agente etiológico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.B.P.F.; DE PAULA, D.A.J.; DAHROUG, M.A.A.; FREITAS, A.G.; SILVA, J.N.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V.R.F. *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks of dogs in Cuiaba, Mato Grosso. **Semina: Ci. Agr.** v.33, p.1123-1126, 2012.

ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestosquard, 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda, em cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202p. Tese (doutor em ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAST, P. Fine structural characterization of a *Rickettsia*-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. **J. Med. Microbiol.** v.48, p.991-997, 1999.

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat 5.0** - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas, Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 380p, 2007.

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. **Paras. Vectors.** v.7, p.1-7. 2014.

BROWN, G. K., A. R. MARTIN, T. K. ROBERTS, AND R. J. AITKEN. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Austrália. **Austr. Vet. J.** v.79, p.554–558, 2001.

BROWN, G.K.; CANFIELD, P.J.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K.; MARTIN, A.R.; BROWN, C.S.; IRVING, R. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. **Austr. Vet. J.** v.84, p. 321-325, 2006.

CARDOSO, L., TUNA, J.; VIEIRA, L.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **Vet. J.** v.183, p.232–233, 2010.

CARDOSO, L.; GILAD, M.; CORTES, H.C.; NACHUM-BIALA, Y.; LOPES, A.P.; VILA-VIÇOSA, M.J.; 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. **Parasit. Vectors.** v.8, p.1-8, 2015.

CARDOZO, G.P.; OLIVEIRA, L.P.; MANSUR, M.A.B.; SANTOS, E.V.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M. Molecular characterisation of two strains of *Anaplasma platys* in Brazil. **Vet. Record.** v.164, p.338-339, 2009.

CHAE, J.S.; FOLEY, J.E.; DUMLER, J.S.; MADIGAN, J.E. Comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA, 444 *Ep-ank*, and *groESL* heat shock operon genes in naturally occurring *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis agent isolates from Northern California. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.1364-1369, 2000.

CHANG, W.L., PAN, M.J. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. **J. Clin. Microbiol.** v.34, p.3142-3146, 1996.

CHANG, W.L., SU, W.L., PAN, M.J. Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. **J. of Veterinary Medical Science**, v.59, p.849-851, 1997.

- 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. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, p.899-909, 2011.
- 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, p.321-326, 2013.
- COSTA-JÚNIOR, L.M. **Aspectos epidemiológicos de hemoparasitoses caninas no Estado de Minas Gerais: utiliza o de métodos de diagnóstico direto, indireto e molecular.** 2007. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Gradua o em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 105-108, 2009.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.A.S.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ci. Agr.**, v.22, p.191-201, 2001.
- DAGNONE, A.S.; AUTRAN-DE-MORAIS, H.S.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.** v.117, p.285-290, 2003.
- DAGNONE, A.S.; BRUM, A.M.; SEIKI, M.C.; PASCON, J.P.E.; FARIA, J.L.M.; SILVA, V.L.D.; SANTANA, A.E.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R.Z. Diagnóstico molecular da erliquiose canina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.13, p.354, 2004.
- DAGNONE, A.S. 2006. **Caracteriza o molecular de espécies da Família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande-MS**, 118p., Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Vet. Parasitol.** v.152, p.173-185, 2008.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; 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*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p.2145-2165, 2001.
- DUMLER, J.S.; BAKKEN, J.S. Ehrlichial diseases of humans: emerging tick-borne infections. **Clin. Infect. Dis.** v.20, p.1102-1110, 1995.
- DU PLESSIS, L.; REYERS, F.; STEVENS, K. Morphological evidence for infection of impala, *Aepyceros melampus*, platelets by a rickettsia-like organism. **Onderstepoort J. Vet. Res.** v.64, p.317-318, 1997.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; DE S , A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: Comparison between morphological and molecular tests. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.** v.5, n.3, 2007.

- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; FERREIRA, M.S.; ALMOSNY, N.R.P. Hematologic parameters in Polymerase Chain Reaction-positive and -negative dogs for *Anaplasma platys* presenting platelet inclusion bodies. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.** v.6, p.185-190, 2008.
- FOLEY, J.E.; CRAWFORD-MIKSZA, L.; DUMLER, J.S.; GLASER, C.; CHAE, J.S.; YEH, E.; SCHNURR, D.; HOOD, R.; HUNTER, W.; MADIGAN, J.E. Human granulocytic ehrlichiosis in Northern California: two case descriptions with genetic analysis of the Ehrlichiae. **Clin. Infect. Dis.** v.29, p.388-392, 1999.
- FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **Am. J. Vet. Res.** v.44, p.2407-2411, 1983.
- GREENE, C.E.; HARVEY, J.W. Canine erlichiosis. In: GREENE, C.E. (Ed.), **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the dog and cat**. W.B. Saunders, Philadelphia, 1990, p. 137-148.
- GUIMARÃES, A. **Diagnóstico morfológico, sorológico e molecular de agentes Anaplasmataceae em felinos domésticos da região metropolitana do Rio de Janeiro**. 79p. Mestrado (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2013.
- HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet. Record.** v.141, p.247-250, 1997.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Inf. Dis.** v.137, p.182-188, 1978.
- HEYMAN, P.; DUH, D.; VAN DER KUYLEN, B.; COCHEZ, C.; VAN ESBROECK, M.; VANDENVELDE, C.; AVSIC-ZUPANC, T. Molecular and Serological Evidence for *Anaplasma platys* and *Babesia* sp. Infection in a Dog, Imported in Belgium, from Southern Spain. **J. Vet. Med.** v.54, p.276-279, 2007.
- HOSKINS, J.D.; BREITSCHWERDT, E.B.; GAUNT, S.D.; FRENCH, T.W.; BURGDORFER, W. Antibodies to *Erlichia canis*, *Erlichia platys*, and spotted fever group rickettsiae in Louisiana dogs. **J. Vet. Int. Med.** v.2, p.55-59, 1988.
- HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiol. Immunol.** v.44, p.737-739, 2000.
- HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M.J.; ORELLANA, N.G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Braz. J. Microbiol.** v.36, p.211-216, 2005.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resultados preliminares do Censo 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_dou/RJ2010.pdf>. Acessado em: 02/01/2012.
- INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Erlichia platys* DNA in Brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.4219-4221, 2000.
- INOKUMA, H.; FUJII, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; BEAUFILS, J-P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon *groESL* and the citrate synthase gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. **Clin. Diag. Lab. Immunol.** v.9, p.1132-1136, 2002.

- INOKUMA, H.; BEPPU, T.; OKUDA, M.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. **Vet. Parasitol.** v.115, p.343-348, 2003.
- KEEFE, T.J., HOLLAND, C.J., SALYER, P.E., RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.181, p.236-238, 1982.
- KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; SOUTHWICK, K.L.; COLITZ, C.M.; HANCOCK, S.I.; BRADLEY, J.M.; RUMBOUGH, R.; MC PHERSON, J.T.; MAC CORMACK, J.N. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker hound kennel in North Carolina. **J. Clin. Microbiol.** v.37, p.2631-2638, 1999.
- KRAUSE, L.E.B.; SAMPAIO, L.C.L.; RIBEIRO, C.L.G.; IÉCK, B.C.; FARIAS, N.A.R.; RUAS, J.L. Molecular characterization of *Anaplasma platys* in dogs in Pelotas city, Southern Brazil. **Sch. J. Agric. Vet. Sci.** v.3, p.20-25, 2016.
- LASTA, C.S.; SANTOS, A.P.; MESSICK, J.B.; OLIVEIRA, S.T.; BIONDO, A.W.; VIEIRA, R.F.C.; DALMOLIN, M.L.; GONZÁLEZ, F.H.D. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.22, p.360-366, 2013.
- LIMA, M.M.; LIMA, A.M.A.; FARIAS, M.P.O.; FERREIRA, D.R.A.; RODRIGUES, F.A.; ALBURQUERQUE, A.R.; DALENCAR, A.S.; BORGES, J.C.G.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C.; RAMOS, R.A.N.; CALADO, A.M.C.; SILVA, J.A.O. Frequência de hematozoários em cães atendidos no hospital veterinário do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HV/DMV-UFRPE) no período de 2004-2005. **Programa & Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Riquetsioses.** p. 328, 2006.
- LIMA, M.L.F.; SOARES, P.T.; RAMOS, C.A.N.; ARAUJO, 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. **Braz. J. Microbiol.** v.41, p.381-385, 2010.
- LINARDI, P.M. Biologia e epidemiologia das pulgas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.13, p.103-106, 2004.
- MADIGAN, J.E.; PUSTERLA, N.; JOHNSON, E.; CHAE, J.S.; PUSTERLA, J.B.; DEROCK E.; LAWLER S.P. Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: Preliminary report. **Equine Vet. J.** v.32, p.275-279, 2000.
- 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. **Parasit. Vectors.** v.103, p.1-10, 2013.
- MARTIN, A.R.; BROWN, G.K.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Exp. Parasitol.** v.109, p.176-180, 2005.
- MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55, p.141-147, 2003.
- MOURA, S.T.; FERNANDES, C.G.N.; RUFFINO, S.; SILVA, V.L.; OLIVEIRA-JÚNIOR, P.A. Ocorrência de hemoparasitos em cães de Cuiabá, estado de Mato Grosso. In: XII

Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002, Rio de Janeiro. CD de Resumos. Rio de Janeiro, 2002.

MURPHY, G.L.; EWING, S.A.; WHITWORTH, L.C.; FOX, J.C.; KOCAN, A.A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.** v.79, p.325-339, 1998.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.** v.91, p.197-204, 2003.

MYLONAKIS, M.E.; MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; BILLINIS, C.D.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **J. Am. An. Hosp. Assoc.** v.40, p.174-184, 2004.

NEER, T.M.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: Greene CE. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Philadelphia: GREENE; 2006. p.203-216.

OLIVEIRA, R. P.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. B.; SLIVA, S. U.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** v.8, p.317-319, 2002.

PAROLA, P.; CORNET, J-P.; SANOGO, Y.O.; MILLER, R.S.; VAN THIEN, H.; 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. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p.600-1608, 2003.

PÉREZ-OSORIO, C.E.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J.E.; LEÓN, J.J.A.; ZAVALA-CASTRO, J.E. *Rickettsia felis* as Emergent Global Threat for Humans. **Emerg. Infect. Dis.** v.14, p.1019-1023, 2008.

PICHOTANO, M.E.; VARZIM, F.L.S.B.; SILVA, M.A.M.L. Ocorrência de erliquiose canina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 13, p.356-358, 2004.

PIEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. "Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification". **Hydr. Earth System Sci.** v.11, p.1633-1644, 2007.

PUSTERLA, N.; HUDER, J.B.; LEUTENEGGER, C.M.; BRAUN, U.; MADIGAN, J.E.; LUTZ, H. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. **J. Clin. Microbiol.** v.37, p.1329-1331, 1999.

RABELO, F.A. Doenças transmitidas por vetores em canídeos na região da Serra do Amolar, Pantanal, Brasil. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 56p.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAUJO, F.R.; GUEDES, D.S.; SOUZA, R.I.F.; ONO, T.M.; VIEIRA, A.S.; PIMENTEL, D.S.; ROSAS, E.; 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. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.18, p.58-62, 2009.

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). **Parasitol. Res.** v.107, p.1115-1120, 2010.

RAMOS, R.A.N., LATROFA, M.S., GIANNELLIA, A., LACASELLA, V., CAMPBELLA, B.E., DANTAS-TORRES, F., OTRANTO, D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. **Vet. Par.** v.205, p.285-288, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2009. ISBN 3-900051-07-0, Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em 25 nov. 2015.

RODRIGUES, D; DAEMON, E; RODRIGUES, AF.S.F; FELICIANO, E.A; SOARES, A.O; SOUZA, A.D. Levantamento de hemoparasitos em cães da área rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, 371p, 2004.

ROTONDANO, T.E.; DE ALMEIDA, A.M.; LUSTOSA, E.M.; CORDEIRO, A.A.; CAMBOIM, E.K.; DE AZEVEDO, S.S.; DE ANDRADE, P.P.; DE MELO, M.A. An assessment of whole blood and fractions by nested PCR as a DNA source for diagnosing canine ehrlichiosis and anaplasmosis. **Sci. World J.** v.2012, p.1-6, 2012.

RUFINO, C.P.; MORAES, P.H.; REIS, T.; CAMPOS, R.; AGUIAR, D.C.; MCCULLOCH, J.A.; MENESES, A.M.; GONÇALVES, E.C. Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA using multiplex PCR. **Vector Borne Zoonotic Dis.** v.13, p.846-50, 2013.

RUST, M. K. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends Parasitol.** v.21, p.232-236, 2005.

SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M.A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. **J. Vet. Diag. Invest.** v.11, p.382-384, 1999.

SAKAI, R.K. **Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* por meio de tubos capilares.** 61p. Mestrado (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2010.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SANOGO, Y.O.; INOKUMA, H.; PAROLA, P.; BROUQUI, P.; DAVOUST, B.; CAMICAS, J-L. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in África, **Onderstepoort J. Vet.** v.70, p.205-212, 2003.

SANTARÉM, V.A.; LAPOSY, C.B.; FARIAS, M.R. Inclusões plaquetárias semelhantes a *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) em gato. **Coll. Agrar.** v.1, p.60-66, 2005.

SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDETTI, R.B.; 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. **Vet. J.** v.179, p.145-148, 2009.

SANTOS, G.B. **Deteção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães trombocitopênicos domiciliados na cidade de Recife-PE.** 2011. Monografia. Universidade Federal do Vale do São Francisco. 68p.

SCHERER, M.; MERGENER, M. Prevalência de hemocitozoários em caninos de municípios do Vale do Taquari com foco em Lajeado – RS. **Rev. Dest. Acad.** v.6, p.206-212, 2014.

SHIBATA, S. I.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WATANABE, Y.; SUTO, C.; ITO, T. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.1331-1338, 2000.

SILVA, C.B. **Diagnóstico sorológico e aspectos epidemiológicos da leishmaniose canina na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.** 2012. 74p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SILVA, G.C.F.; BENITEZ, A.N.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M.C.; GARCIA, J.L.; FREITAS, J.C.; ARLINGTON, S.H.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Paraná. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.21, p.379-385, 2012.

SILVA, L.S. **Erlíquiose e anaplasmose canina em Teresina, Piauí.** 2010. 92p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*, **Am. J. Vet. Res.** v.52, p.1537-1541, 1991.

SOUZA, A.I.; DAGNONE, A.S.; MACHADO, R.Z. Infecção por *Anaplasma platys* em cães de Campo Grande. MS. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.13, p.352, 2004.

SPARAGANO, O.A.E.; VOS, A.P.; PAOLETTI, B.; CAMMÀ, C.; SANTIS, P.; OTRANTO, D.; GIANGASPERO, A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization, **J. Vet. Diagn. Invest.** v.15, p.527-534, 2003.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S Ribosomal DNA secondary structure. **J. Clin. Microbiol.** v.39, p.90-93, 2001.

TAMÍ, I.; JORDÁN, L. Identificación de mórulas de *Ehrlichia* en plaquetas de sangre humana en Venezuela. **Antibiót. Infec.** v.10, p.123-128, 2002.

TAMÍ, I.D.C.; TAMÍ-MAURY, I.M. Identificación morfológica de *Ehrlichia* sp. en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, em Venezuela. **Rev. Panam. Salud Publica.** v.16, p.345-349, 2004.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; YAMAMOTO, S. Analysis of 16S *rRNA* gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. **An. New York Acad. Sci.** v.990, p.692-698, 2003.

VARELA, A.S. Tick-borne Erlichiae and Rickettsiae of dogs. In: BOWMAN, D.D. (Ed). **Companion and Exotic Animal Parasitology.** 2003. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Parasit_Bowman/varela/chapter_frm.asp?LA=1. Acessado em: 18 fev. 2014.

VOBIS, M.; D'HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Parasitol. Res.** v.91, p.467-470, 2003.

ZAVALA, M.V.G. **Aspectos clínicos e laboratoriais de cães suspeitos de infecções causadas por *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em Campos dos Goytacazes, RJ.** 2007. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 76p.

WALLS, J.J.; CATUREGLI, P.; BAKKEN, J.S.; Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic Ehrlichiosis using epankl genes of *Ehrlichia phagocytophila* group Ehrlichiae. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.354-356, 2000.

WOODY, B.J., HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. North America. Small Anim. Practice.** v.21, p.75-98, 1991.

YABSLEY, M.J.; MCKIBBEN, J.; MACPHERSON, C.N.; CATTAN, P.F.; CHERRY, N.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B.; O'CONNOR, T.; CHANDRASHEKAR, R.; PATERSON, T.; PEREA, M.L.; BALL, G.; FRIESEN, S.; GOEDDE, J.; HENDERSON, B.; SYLVESTER, W. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Vet. Parasitol.** v.151, p.279-285, 2008.

YBAÑEZ, A.P.; PEREZ, Z.O.; GABOTERO, S.R.; YANDUG, R.T.; KOTARO, M.; INOKUMA, H. First molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks from dogs in Cebu, Philippines. **Tick Tick-Borne Dis.** v.3, p.287-292, 2012.

CAPÍTULO III

DETECÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE *Anaplasma platys* EM CÃES E CARRAPATOS EM CUBA

RESUMO

SILVA, Claudia Bezerra. **Detecção molecular e caracterização de *Anaplasma platys* em cães e carrapatos em Cuba.** 2016. 26p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A trombocitopenia infecciosa canina causada por *Anaplasma platys* é um problema na saúde de cães de todo o mundo. Este estudo objetivou detectar e caracterizar a bactéria *A. platys* em cães e carrapatos de Cuba usando métodos moleculares. Amostras de ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico de sangue de cães e carrapatos foram testadas através de uma reação em cadeia da polimerase tipo *nested* (nPCR) usando o gene 16S ribossomal DNA (*rDNA*) como gene alvo. Amostras positivas na nPCR foram também submetidas a PCR para o gene citrato sintase (*gltA*) e os produtos foram sequenciados. Somente a espécie *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato foi encontrada em cães, e 10,20% (n=5/49) desses carrapatos somado aos 16,0% (n=16/100) de cães foram considerados positivos para *A. platys* através da nPCR com alvo no gene 16S *rDNA*. Todas as sequências analisadas para os genes *gltA* e 16S *rDNA*, respectivamente, mostraram uma identidade de 99-100% com sequências de *A. platys* reportadas em outros lugares do mundo. A análise filogenética mostrou dois *clusters* definidos para o gene 16S *rDNA* e três *clusters* definidos para o gene *gltA*. Com base no gene *gltA*, a sequência de aminoácidos deduzidos demonstrou dois pontos de mutação não-sinônima nas posições 88 e 168 comparados com sequência de referência DQ525687. Um estudo preliminar sobre os aspectos epidemiológicos associados com a infecção por *A. platys* demonstrou nenhuma associação estatística com as variáveis avaliadas ($p > 0,05$). Este estudo foi a primeira evidência de *A. platys* em ambos cães e carrapatos em Cuba. Estudos adicionais são necessários para avaliar os aspectos epidemiológicos da infecção *A. platys* em cães cubanos.

Palavras-chave: *Anaplasma platys*; cães; trombocitopenia cíclica canina; reação em cadeia da polimerase; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

ABSTRACT

SILVA, Claudia Bezerra. **Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks in Cuba.** 2016. 26p. Tesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The canine infectious cyclic thrombocytopenia caused by *Anaplasma platys* is a worldwide dog health problem. This study aimed to detect and characterize *A. platys* bacteria in dogs and ticks from Cuba using molecular methods. Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) samples from blood and ticks were tested by a nested polymerase chain reaction (nPCR) using 16S ribosomal DNA (*rDNA*) as the target gene. Positive samples in nPCR were also subjected to PCR for citrate synthase (*gltA*) gene and the products were sequenced. Only *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato was found on dogs, and 10.20% (n=5/49) of these ticks plus sixteen percent (16.0%, n=16/100) of dogs were considered positive for *A. platys* by nPCR targeting the 16S *rDNA* gene. All analyzed sequences for *gltA* and 16S *rDNA* genes, respectively, showed a 99-100% identity with sequences of *A. platys* reported in around the world. Phylogenetic analysis showed two defined clusters for the 16S *rDNA* gene and three defined clusters for the *gltA* gene. Based on the *gltA* gene, the deduced amino acid sequence showed two points of non-synonymous mutation at positions 88 and 168 compared with the reference sequence DQ525687. A preliminary study on the epidemiological aspects associated with infection by *A. platys* showed no statistical association with the variables studied ($p>0.05$). This study was the first evidence of *A. platys* in both dogs and ticks in Cuba. Further studies are needed to evaluate the epidemiological aspects of *A. platys* infection in Cuban dogs.

Keywords: *Anaplasma platys*; dogs; canine cyclic thrombocytopenia; polymerase chain reaction; *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato.

1 INTRODUÇÃO

Anaplasma platys é uma bactéria intracelular obrigatória Gram-negativa (FRENCH; HARVEY, 1983; HARVEY et al., 1978). A reclassificação de *Ehrlichia platys* para *A. platys* foi baseada no estudo filogenético do gene 16S *rDNA* (DUMLER et al., 2001). Este microrganismo causa a trombocitopenia cíclica canina devido a ocorrência de parasitemia em plaquetas (HARRUS et al., 1997). Um estudo recente demonstrou que, apesar deste parasito *Rickettsia*-like preferir plaquetas, ele pode infectar promegacariócitos e megacariócitos, que são células precursoras da medula óssea (TOMMASI et al., 2014).

Anaplasma platys entra na célula por aderência à superfície seguido por endocitose, e a membrana vacuolar provavelmente é derivada a partir da membrana externa das plaquetas (HARVEY, 2011); fissões binárias repetidas do organismo dentro do vacúolo resulta na formação de uma mórula (HARVEY et al., 1978) causando injúria direta às plaquetas. Os principais sintomas observáveis clinicamente desta doença são a depressão, anorexia e febre, mas podem ocorrer infecções assintomáticas (HARVEY et al., 1978; HARVEY, 2011). Hemorragia equimótica foi relatada em um caso de infecção por *A. platys* na Grécia (KONTOS et al., 1991). Trombocitopenia, anemia (DAGNONE et al., 2003), monocitose, e presença de macroplaquetas (ANTOGNONI et al., 2014; HARRUS et al., 1997) são os achados mais comuns observados no laboratório.

Anaplasma platys é provavelmente transmitida aos cães pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (SANOGO et al., 2003; YABSLEY et al., 2008) embora o seu papel na transmissão não tenha sido provado experimentalmente (SIMPSON et al., 1991). Esta espécie de carrapato está amplamente distribuída em todo o mundo com uma propensão em relação a infestação em cães, apoiando o seu papel como um vetor (YABSLEY et al., 2008). No entanto, DNA de *A. platys* também foi detectado em *Dermacentor auratus*, que infesta cães na Tailândia (PAROLA et al., 2003), mas o papel real deste carrapato na transmissão desta bactéria não foi determinado. Embora os cães sejam considerados os principais hospedeiros para *A. platys*, outros estudos têm detectado este agente em gatos domésticos (CORREA et al., 2011), bovinos (DAHMANI et al., 2015a) e humanos (ARRAGA-ALVARADO et al., 1999; ARRAGA-ALVARADO et al., 2014; BREITSCHWERDT et al., 2014).

Em relação à distribuição geográfica de *A. platys*, vários estudos relataram a ocorrência de cães soropositivos em diferentes áreas nos Estados Unidos (FRENCH; HARVEY, 1983), Grécia (KONTOS et al., 1991) e Bélgica (HEYMAN et al., 2007). A detecção molecular de *A. platys* em cães foi relatada em países de diferentes continentes, incluindo a América do Sul (ABARCA et al., 2007; DAHMANI et al., 2015b; FERREIRA et al., 2007), América do Norte (ALMAZÁN et al., 2016), América Central (ROJAS et al., 2014; SANTAMARIA et al., 2014), Europa (DUMLER et al., 2001; INOKUMA et al., 2002a), Ásia (INOKUMA et al., 2002b; UNVER et al., 2003), Oceania (BROWN et al., 2001) e África (DAHMANI et al., 2015c; SANOGO et al., 2003). Apesar dos estudos realizados na Costa Rica e no Panamá, ainda pouco se sabe sobre a ocorrência de *A. platys* nas regiões caribenhas da América Central, incluindo Cuba que é considerada uma das maiores e representativas ilhas dessa região, e até o momento não apresenta relatos da presença desta bactéria.

Os métodos de diagnóstico comumente usados para a detecção de *A. platys* são exames esfregaço de sangue para pesquisa de inclusões basofílicas em plaquetas (HARVEY et al., 1978); métodos sorológicos para detectar anticorpos; e técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase - polimorfismo de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) e reação em cadeia da polimerase do tipo *nested* (nPCR) (ALBERTI; SPARAGANO, 2006; DAHMANI et al., 2015b; INOKUMA et al., 2002a; MARTIN et al.,

2005). Os genes operon de choque térmico (*heat-shock operon*), 23S *rDNA*, 16S *rDNA* e *gltA* são também usados em estudos filogenéticos e na caracterização de cepas de *A. platys* (ABARCA et al., 2007; DAHMANI et al., 2015a; DE LA FUENTE et al., 2006; INOKUMA et al., 2002a). Este estudo teve como objetivo detectar e caracterizar *A. platys* em cães e carrapatos de Cuba e avaliar os possíveis fatores associados com a infecção de animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Região do Caribe

A região caribenha pertence ao continente americano e é formada pelo Mar do Caribe, suas ilhas e estados insulares. Este é um mar semiaberto tropical do oceano Atlântico, com uma área de cerca de 2.754.000 km².

Esta região tem uma importância histórica, devido ao seu envolvimento nas disputas coloniais das potências europeias desde o século XV (BAGGIO, 2000). Países como Inglaterra, Espanha, Holanda, França e Dinamarca expandiram-se pelo continente americano, principalmente lutando por áreas na América Central e na região do Caribe (ROMERO, 1988). O Caribe foi novamente importante, preocupando os norte-americanos em torno da década de 60, onde aumentaram as tensões entre Cuba e Estados Unidos, em virtude da revolução popular do povo cubano (ALVES, 2005).

Com tantos eventos históricos, e por se tratar de uma área central no continente americano, esta região apresenta uma importância quanto à diversidade de microrganismos e parasitos de importância, onde ainda muitos deles não foram detectados ou pouco se sabe sobre a etiologia de algumas doenças que ocorrem na região tanto em animais, quanto em humanos.

2.2 Breve Histórico da Ilha de Cuba

Cuba, a maior das ilhas do Caribe, está situada à entrada do Golfo do México, em pleno mar do Caribe (SCHNEIDER, 1992), e foi encontrada por Cristóvão Colombo durante a sua primeira viagem em de 1494 à América. As ilhas caribenhas serviram, também, como espaço de experiência para vários modelos de colonização: o domínio externo foi uma marca registrada da região desde o final do século XV (BAGGIO, 2000). A ilha, que então era habitada por povos indígenas (MACHADO, 1963), tornou-se uma colônia da Espanha, chefiada por um governador espanhol em Havana. Em 1762, a cidade foi ocupada brevemente pelo Reino da Grã-Bretanha, porém retornou à posse da Espanha depois de uma troca pelo território da Flórida (atual Estados Unidos) (AZEVEDO, 1986). Muitas rebeliões ocorreram durante o século XIX e mesmo assim a colonização espanhola se manteve. No entanto, as tensões entre a Espanha e os Estados Unidos que geraram a Guerra Hispano-Americana, resultou em retirada dos espanhóis e ocupação da ilha pelos Estados Unidos em 1898, quando Cuba conquistou a sua independência promovida pelos americanos (MARTINS, 2011).

Durante as primeiras décadas do século XX, os Estados Unidos exerceram grande influência sobre a ilha, principalmente através da presença de Fulgencio Batista na ilha. Em 1959, este ditador foi deposto durante a Revolução liderada por Fidel Castro (MATOS, 2012). A rápida deterioração das relações com os Estados Unidos levou à aliança da ilha com a União Soviética, e à transformação de Cuba em uma república socialista (MATOS, 2012).

Fidel Castro ocupou o poder desde 1959, inicialmente como primeiro-ministro e, depois de 1976, como presidente, cargo que exerceu até 2006, quando delegou seus poderes ao seu irmão mais novo, Raúl Castro.

2.3 Pesquisa Veterinária em Cuba

É reconhecido na literatura que doenças transmitidas por vetores em cães são prevalentes na região do Caribe (QUROLLO et al., 2014).

Recentemente, estudos vem sendo realizados em Cuba incluindo a pesquisa de

hemoparasitos de importância veterinária através de projetos bilaterais, principalmente fomentados por instituições vinculadas ao governo federal brasileiro (CAPES e CNPq).

Com os avanços biotecnológicos, os métodos que envolvem a biologia molecular tem sido ferramentas úteis na detecção e caracterização de agentes de importância na parasitologia e microbiologia. Um exemplo do desenvolvimento de trabalhos voltados para a utilização de biologia molecular em Cuba, é a identificação de genes que codificam para proteínas de *Anaplasma marginale* descrita por Gonzalez et al. (2015).

Existem muitas lacunas a serem preenchidas sobre o conhecimento dos parasitos em Cuba, principalmente aqueles que infectam animais de companhia. Em um trabalho realizado na região oriental de Cuba, foram determinados os fatores que levam ao abandono de cães (LLORENS et al., 2007). Foram visitadas casas, onde haviam animais, e dados sobre os mesmos foram coletados. Foi confirmado que as causas de abandono estão associadas à enfermidades dermatológicas, seguido das reproduções não desejadas. Além disso, um fator importante foram os 23,2% de animais que apresentaram ectoparasitos, e essa foi a causa justificada pelos donos abandonarem esses animais (LLORENS et al., 2007), demonstrando que estudos em parasitologia se fazem necessários para minimizar a condição de abandono e melhorar a qualidade de vida desses animais.

Sobre a ocorrência de *A. platys* em Cuba, até o presente momento essa bactéria era considerada desconhecida na ilha. Contudo, sabe-se que na região do Caribe, sua detecção foi realizada por Quorllo et al. (2014), onde encontrou uma soroprevalência de 10,3% dentre as amostras avaliadas. Esse mesmo estudo associa a dispersão desta bactéria a *R. sanguineus* sensu lato, incriminado como potencial vetor pela prevalência desta espécie de carrapato na região. Contudo, alguns fatores são importantes relacionados a esse trabalho, um deles é que não engloba amostras de cães cubanos; outro fator é que o número amostral utilizado nesse estudo foi muito pequeno, e a baixa amplitude na distribuição das amostras que representassem o Caribe foi um impedimento, pois pelos mapas demonstrados (QUOROLLO et al., 2014), possivelmente essas amostras foram provenientes do estado da Flórida, que os norte-americanos consideram a região caribenha nos Estados Unidos. Logo, essa amostragem não foi representativa da região caribenha, pois nem amostras de áreas da América Central localizadas no Caribe foram incluídas nesses estudos.

Essas informações demonstram que maiores estudos são necessários para ampliar o conhecimento das parasitoses em animais domésticos na ilha de Cuba, visto que esta é considerada a maior ilha caribenha na América Central.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da Área Estudada e Amostragem

Esse estudo foi conduzido em quatro cidades: três da Província de Havana (Habana del Este, Boyeros e Cotorro) e um da Província de Mayabeque (San José de las Lajas). Todas essas cidades estão localizadas na porção ocidental da ilha de Cuba (Figura 1). O clima da ilha é tropical e úmido e tem dois períodos climáticos distintos, incluindo uma estação seca de novembro a abril e uma estação mais quente e chuvosa, de maio a outubro. Na estação seca, a temperatura média varia entre 15°C e 26°C, enquanto as temperaturas variam tipicamente entre 22°C e 32°C na estação chuvosa.

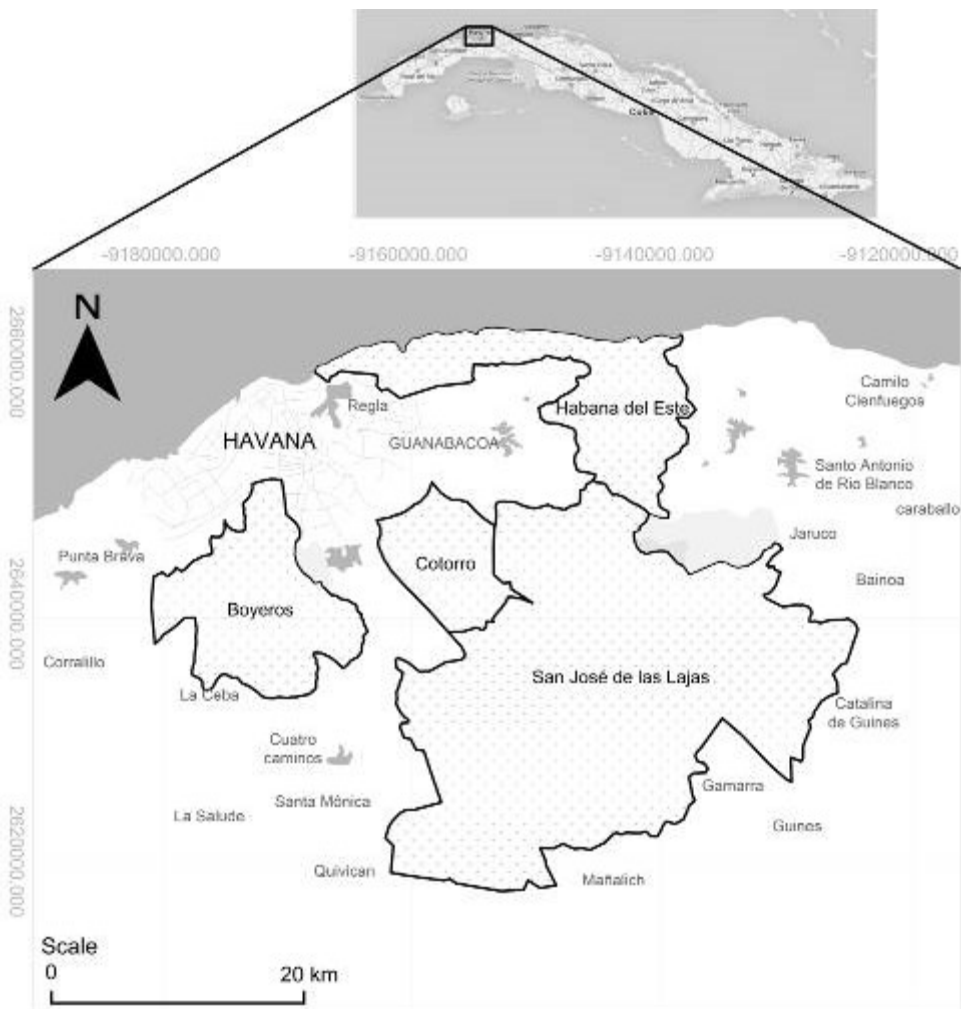


Figura 1. Mapa menor: Ilha de Cuba. Mapa maior: localização das cidades nas quais as coeltas foram realizadas nas províncias de Havana (Cotorro, Boyeros e Habana del Este) e Mayabeque (San José de las Lajas). Barra de escala = 20 Km.

Para o estudo preliminar sobre os fatores associados com cães positivos em Cuba, uma amostragem por conveniência foi realizada nesses municípios entre setembro e novembro de 2013, o que resultou em 100 amostras de sangue de cães (Habana del Este, n=44; Boyeros, n=16; Cotorro, n=17; San José de las Lajas, n=23). Depois de receber o consentimento do proprietário, o sangue foi coletado por venopunção cefálica e colocado em tubo estéril, contendo EDTA.

Durante a amostragem, os animais foram inspecionados para detecção de infestação por carrapatos. Os carrapatos foram então recolhidos, e as espécimes foram devidamente identificados de acordo com uma chave taxonômica para gênero descrito por Onófrío et al. (2006). Os carrapatos foram coletados e armazenados em tubos de polipropileno contendo álcool isopropílico até a extração de DNA.

3.2 Questionário Epidemiológico

Um questionário semi-estruturado foi aplicado a cada proprietário do cão para identificar possíveis fatores associados à infecção por *A. platys* nos animais. As perguntas do inquérito foram organizadas da seguinte forma: o animal (gênero, idade, raça, infestação por carrapatos), local de residência (cidade natal; tipo de área de propriedade), hábitos (confinado a casa, com acesso livre à vizinhança) e distúrbios de coagulação (sim ou não) observado a partir de exame clínico.

3.3 Extração de DNA e *n*PCR

DNA genômico foi extraído de 300 µL da amostra de sangue de cada usando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega®, Madison, WI, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de carrapato foram organizadas em pools de dez a doze espécimes cada por espécie, fase de desenvolvimento e dimorfismo sexual, formando um total de 49 pools e a extração de DNA foi realizada tal como descrito anteriormente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A concentração e a pureza do DNA de todas as amostras de sangue e carrapatos foram determinadas por espectrofotometria Nanodrop ND-2000® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). As amostras de DNA dos carrapatos foram diluídas a 30 ng/µL, enquanto que as amostras de DNA de sangue de cães foram diluídas a 100 ng/µL.

As amostras foram submetidas a *nested* PCR com base no procedimento utilizando oligoiniciadores com alvo no gene de 16S *rDNA*, conforme publicado anteriormente (MARTIN et al., 2005). Para amplificar um fragmento de 678 pares de bases (pb) do gene de 16S *rDNA* de *A. platys*, os iniciadores 8F (5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3') and 1448R (5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG-3') foram utilizados em uma primeira amplificação por PCR, seguida por uma segunda amplificação utilizando um oligoiniciador específico para *A. platys*, PLATYS (5'-GATTTTTGTCGTAGCTTGCTATG-3'), e um oligoiniciador específico para o gênero *Ehrlichia*, EHR16SR (5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3') (MARTIN et al., 2005). Uma amostra de sangue de controle positivo foi obtida a partir de cães assintomáticos com inclusões em plaquetas (*GenBank* ID: FJ755157). O DNA genômico foi extraído da mesma maneira como descrito previamente. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A eletroforese foi realizada durante 60 minutos a 90 volts (5 V/cm). Quando a eletroforese se completou, o gel foi corado com brometo de etídio (0,4 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta no sistema L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia – Cotia, São Paulo, Brazil).

3.4 Sequenciamento e Análise Filogenética

Foram utilizadas todas as amostras positivas para *A. platys* de cães e carrapatos para o sequenciamento dos genes 16S *rDNA* e *gltA*. Os produtos da *nested* PCR com alvo no gene 16S *rDNA* foram purificados usando o kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega[®], Madison, WI, EUA), e sequenciado pelo método de Sanger (SANGER et al., 1997), usando o equipamento ABI 3730 DNA *analyzer* (Applied Biosystems[®], Perkin Elmer, CA, EUA). Estas amostras também foram sequenciadas para o gene *gltA* como descrito anteriormente. Os oligoiniciadores *gltA*84F (5'-GACCTACGATCCGGGATTCA-3') e *gltA*69R (5'-CCGCACGGTTCGCTGTT-3') foram desenhados usando um software comercial¹ a partir de sequências do gene *gltA* de *A. platys* obtidos no *GenBank* (EU516387, AB058782, KC342665, JN121381, DQ525688, DQ525687, DQ525686, AY077620, AY530807 e AF478130) para amplificar um fragmento de 580 bp. A reação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 1X de tampão de PCR (10 mM Tris-Cl; pH 8.3, 50 mM KCl); 3 mM de MgCl₂ (50 mM); 0,4 mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP and dCTP); 0,4 µM de cada oligoiniciador; 1,0 U de *Taq* DNA polimerase; e 3 µL do DNA total (300 ng). O programa de termociclagem foi de 94°C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto seguido por 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

O sequenciamento das amostras analisadas neste estudo foi realizado no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL, USP).

A ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) foi usada para avaliar a similaridade dos genes 16S *rDNA* e *gltA* com sequências de nucleotídeos de *A. platys* disponíveis no *GenBank*. As sequências obtidas neste estudo foram alinhadas com as sequências do *GenBank* para o gene 16S *rDNA* (AF303467, JQ396431, JX976181, JX893521, AF287153, EF139459, AY530806, HE856819, JX392984, AF536828, EU439943, KF360842, AY077619, AF286699, AF156784, DQ401045, KF826284 e AF478131) e para o gene *gltA* (AF478130, AB058782, AY077620, AY530807, KC342665, DQ525686, DQ525687, EU516387, JN121381 e KC342665) usando o software “Clustal W”. As sequências foram ajustadas manualmente, e 679 nucleotídeos do gene 16S *rDNA* e 501 do gene *gltA* foram analisadas no conjunto de dados final. *Ehrlichia canis* (AF304143) e *Wolbachia pipientis* (AJ609651) foram usadas como *outgroups*. A reconstrução filogenética de *A. platys* isolado de cães cubanos foi inferida usando o método Neighbor-Joining. O modelo Kimura 2-parameter foi usado para calcular a distância evolucionária. A combinação de *clusters* filogenéticos foi avaliada usando um teste de *bootstrap* com 1000 réplicas para testar diferentes reconstruções filogenéticas. A filogenia e as sequências de aminoácidos deduzidas a partir das sequências de DNA foram transcritas e analisadas usando o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

3.5 Análise Estatística

Para analisar os fatores associados com cães positivos para *A. platys*, tabelas de contingência 2 x 2 foram criadas relacionando o resultado de PCR com as variáveis independentes obtidas a partir do questionário epidemiológico. As frequências de cada variável foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado e / ou teste Exato de Fisher a um nível de 5% de significância. O programa BioEstat 5.0 foi usado para as análises estatísticas (AYRES et al., 2007).

¹ Primer Express 3.0 software, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA.

3.6 Conformidade com as Normas Éticas

Esses procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), número de protocolo 363/2013, número de processo 23083.003990/2013-93 (Anexo II) e sob o número de protocolo 001/2014 do Comitê de Ética no Uso Animal desta mesma Universidade (Anexo III). Do mesmo modo, o Serviço Veterinário de Fronteira do Instituto de Medicina Veterinária sob ordem do Ministério da Agricultura da República de Cuba autorizaram a exportação das amostras de DNA usadas neste trabalho, sob número de Certificação de Exportação Zoosanitária R.S.12242013 (Anexo IV). Bem como o Conselho Científico Veterinário de Cuba (CCVC) aprovou a realização deste trabalho, reconhecendo o mesmo como primeira descrição deste agente em Cuba, através de reunião ordinária do departamento executivo do CCVC com o aval da MSc. Rafmary Rodríguez Fernandes (presidente da Sociedade Cubana de Parasitologia Veterinária) em 17 de julho de 2015 (Anexo V).

4 RESULTADOS

Através de análise molecular, *A. platys* foi detectado em cães e carrapatos na ilha de Cuba. Dezesesseis das 100 amostras de sangue (16,0%) de cães, e 10,20% (n=5/49) de amostras de carrapatos mostraram uma amplificação específica para o gene 16S *rDNA* de *A. platys* quando testadas usando a *nPCR* (Figura 2).

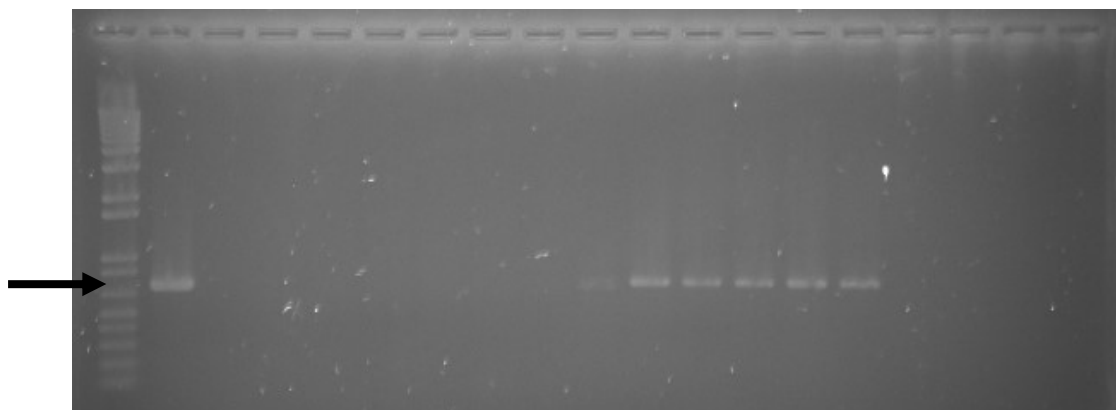


Figura 2. Fotografia de gel de Agarose contendo amostras negativas (ausência de bandas) e positivas apresentando bandas respectivas ao fragmento de 678 pb do gene 16S *rDNA* de *A. platys* amplificados durante a *nPCR*.

Todos os carrapatos coletados de cães foram identificados como *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Quatrocentos e trinta e um (431) carrapatos foram coletados de animais em quatro cidades: Habana del Este (n=158; 84 machos adultos, 48 fêmeas adultas, 24 ninfas, 2 larvas), Boyeros (n=153; 95 machos adultos, 44 fêmeas adultas, 14 ninfas), Cotorro (n=47; 23 machos adultos, 8 fêmeas adultas, 16 ninfas) e San José de las Lajas (n=73; 48 machos adultos, 16 fêmeas adultas, 9 ninfas). As amostras positivas foram uma ninfa (n=1/49) de Habana del Este, dois machos (n=2/49) e uma fêmea (n=1/49) de Boyeros e um macho (n=1/49) de San José de las Lajas. Durante a visita às residências, infestações por diferentes estágios evolutivos de carrapatos foram encontradas no ambiente (Figura 3).



Figura 3. Infestações por diferentes estágios evolutivos de carrapatos foram encontradas no ambiente durante visita às residências. A esquerda: presença de incontáveis larvas na janela de acesso ao quarto de uma das residências visitadas. A direita: presença de ninfas de *R. sanguineus* s.l. sob o peitoril da janela (setas) da mesma residência.

Em relação à avaliação preliminar dos possíveis fatores associados com a infecção dos cães por *A. platys* em Cuba, nenhuma associação estatística ($p > 0,05$) com as variáveis estudadas foi observada (Tabela 1). No entanto, houve uma maior frequência de animais sem raça definida, com idade entre cinco anos e mais velhos, com acesso livre às redondezas da sua vizinhança positivos para *A. platys*.

Tabela 1. Análise bivariada da frequência de *Anaplasma platys* determinada pela *nested* PCR (*n*PCR) em cães, em relação aos fatores associados como sexo, idade, ração, infestação por carrapatos, tipo de área da propriedade, hábitos e desordens de coagulação em quatro cidades de Cuba

Características dos animais e do ambiente	N	<i>n</i> PCR		RF	<i>P</i>	95% IC
		<i>n</i>	(%)			
Cidade natal						
Habana del Este	44	6 ^a	13,6	1,05	0,76	0,29 a 3,80
Boyeros	16	3 ^a	18,8	1,45		0,33 a 6,24
Cotorro	17	4 ^a	23,5	1,81		0,46 a 7,02
San José de las Lajas	23	3 ^a	13,0	1		-
Sexo						
Fêmea	58	10 ^a	17,2	1,20	0,69	0,48 a 3,06
Macho	42	6 ^a	14,3	1		-
Faixa etária						
< 2 anos	20	2 ^a	10,0	1	0,59	-
≥ 2 e < 5 anos	40	6 ^a	15,0	1,50		0,33 a 6,77
≥ 5 anos	40	8 ^a	20,0	2,00		0,47 a 8,56
Definição racial						
Com raça definida	60	8 ^a	13,3	1	0,37	-
Sem raça definida	40	8 ^a	20,0	1,50		0,59 a 3,52
Infestação por carrapatos						
Sim	34	5 ^a	14,7	1	0,80	-
Não	66	11 ^a	16,7	1,14		0,43 a 3,00
Tipo de área da propriedade						
Rural	36	7 ^a	19,4	1,38	0,48	0,56 a 3,40
Urbana	64	9 ^a	14,1	1		-
Habitos do animal						
Confinado a residência	49	6 ^a	12,2	1	0,31	-
Livre acesso a vizinhança	51	10 ^a	19,6	1,61		0,63 a 4,07
Desordens de coagulação						
Sim	28	7 ^a	25,0	2,00	0,12	0,82 a 4,85
Não	72	9 ^a	12,5	1		-

IC = Intervalo de Confiança; RF = Razão de Frequência; N = número de animais examinados pela *n*PCR; *n* = número de amostras positivas; *P* = p-valor. Não houve diferença estatisticamente significativa pelos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher ($p > 0,05$) para as médias de *n*.

Embora todas as amostras positivas tenham sido sequenciadas para os genes de 16S *rDNA* e *gltA*, apenas quatorze sequências foram depositadas no *GenBank* (oito para o gene 16S *rDNA* e seis para o gene *gltA*), devido ao percentual de similaridade encontrado entre os genótipos obtidos.

As sequências parciais dos genes 16S *rDNA* e *gltA* foram depositadas no *GenBank* sob os seguintes números de acesso, respectivamente: [KP903290 (amostra 14), KP903291 (amostra 122), KP903292 (amostra 160), KP903293 (amostra 192), KP903294 (amostra 258), KP903295 (amostra 261), KP903296 (amostra 309), KP903297 (amostra 319)] e [KP903284 (amostra 14), KP903285 (amostra 122), KP903286 (amostra 192), KP903287 (amostra 258), KP903288 (amostra 261), KP903289 (amostra 309)].

As sequências do gene *gltA* obtidas neste estudo mostraram uma equivalência de 99-100% com sequências da Itália (DQ525686 e DQ525687), Espanha (AY530807), da República Democrática do Congo (AF478130), Japão (AB058782 e AY077620), China (KC342665), Filipinas (JN121381) e Brasil (EU516387). Três amostras analisadas para o gene *gltA* (KP903285, KP903287 e KP903288) e gene 16S *rDNA* (KP903291, KP903294 e KP903295) mostraram uma identidade de 100% com *A. platys* da República Democrática do Congo (AF478130 e AF478131, respectivamente). As outras amostras (KP903290, KP903292, KP903293, KP903296 e KP903297) mostraram uma identidade de 100% com as sequências das Filipinas (JQ894779), Croácia (JQ396431), Tailândia (JN853776 e EF139459), Malásia (JF683610), Itália (EU439943), Espanha (AY530806), Suécia (AY837738), Moçambique (AF318023) e África do Sul (U54806).

As análises filogenéticas do gene *gltA* mostraram três *clusters* obtidos a partir do alinhamento com as sequências do *GenBank* (A1, A2 e A3). Um dos genótipos encontrados em Cuba demonstraram similaridade com outras sequências obtidas dos continentes Americano, Asiático e Europeu (A1). No entanto, alguns isolados foram encontrados apenas na ilha de Cuba (A2), enquanto outros apresentaram similaridade com o isolado do continente Africano (A3) (Figura 4).

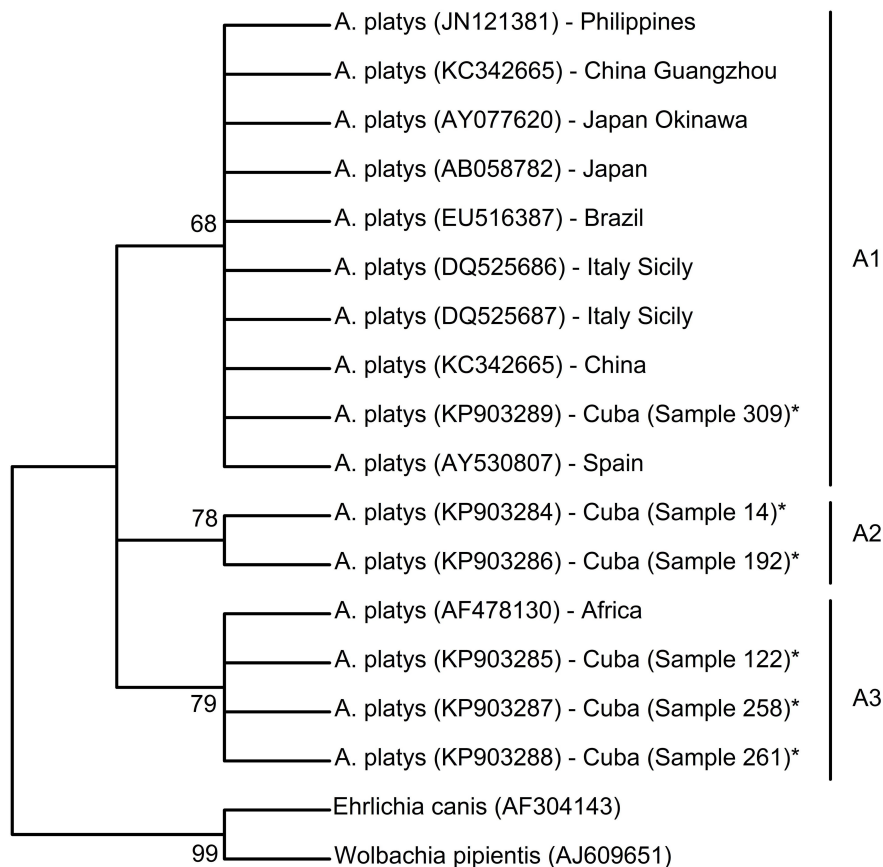


Figura 4. Análise filogenética de *Anaplasma platys* isolado de cães baseada na comparação da sequência do gene *gltA* (501 pares de base). Números de acesso do *GenBank* estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-joining e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 *bootstrap* que suportaram o ramo. *Ehrlichia canis* (AF304143) e *Wolbachia pipientis* (AJ609651) foram usadas como *outgroups*. Os isolados do gene *gltA* de *A. platys* foram divididos em três subgrupos (*clusters* A₁, A₂ e A₃), que caracteriza os três genótipos do gene *gltA*. *Indica as amostras sequenciadas pertencentes ao presente estudo.

Ánálises filogenéticas do gene 16S *rDNA* formaram dois *clusters* (A1 and A3) a partir do alinhamento das amostras deste estudo e outras sequências depositadas. Amostras anteriormente descritas como um genótipo exclusive de pela análise do gene *gltA*, quando submetidas a análise do gene 16S *rDNA* foram agrupadas dentro de um único *cluster* com amostras de diferentes continentes (A1). No entanto, a semelhança das três sequências a partir deste estudo com o isolado do continente Africano manteve-se, também, incluindo um isolado da América do Sul (A3) (Figura 5).

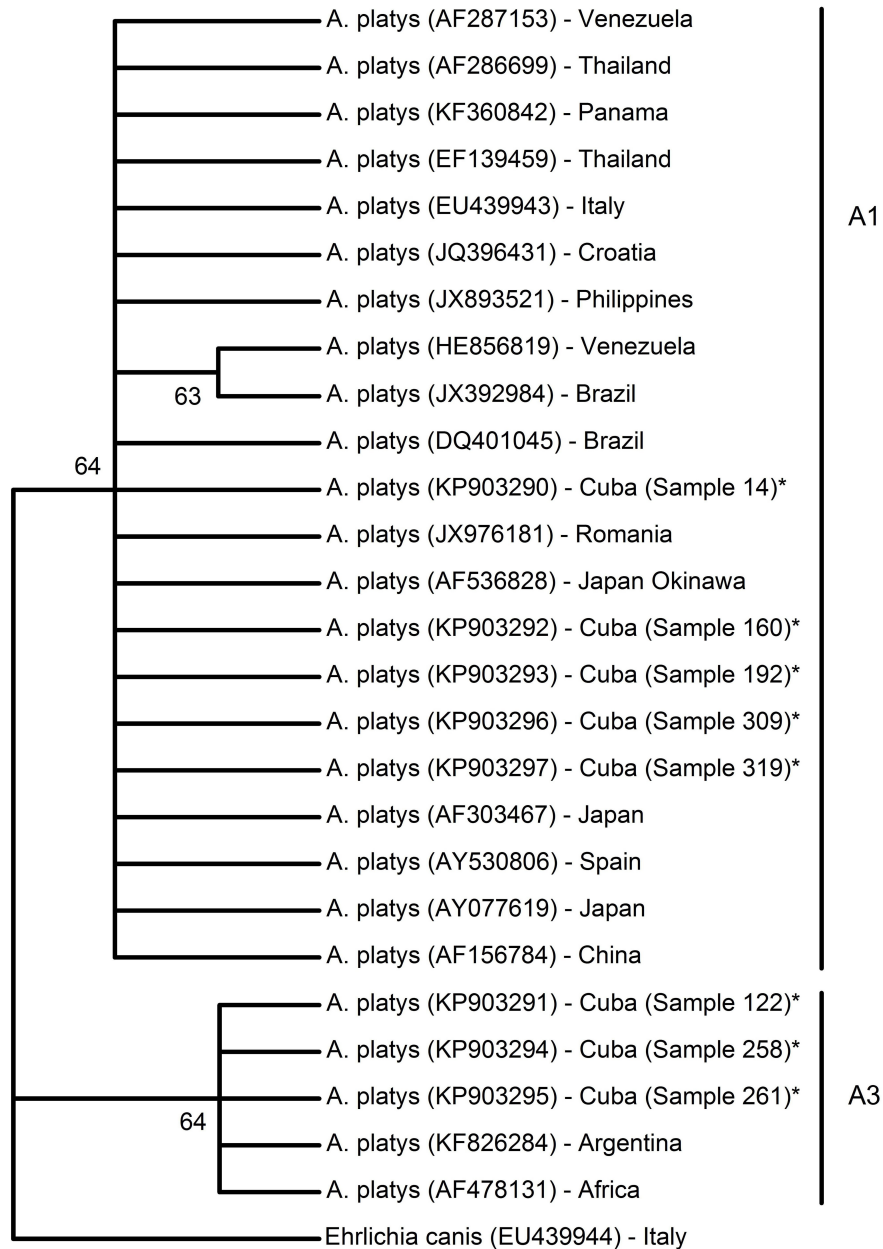


Figura 5. Análise filogenética de *Anaplasma platys* isolado de cães baseada na comparação da sequência do gene 16S *rDNA* (679 pares de base). Números de acesso do *GenBank* estão apresentados em parênteses. A árvore foi construída usando o método Neighbor-joining e os números internos nos nós indicam os percentuais das réplicas em 1000 *bootstrap* que suportaram o ramo. *Ehrlichia canis* (EU439944) foi usada como *outgroup*. Os isolados do gene 16S *rDNA* de *A. platys* foram divididos em dois subgrupos (*clusters* A₁ e A₃), que caracteriza os dois genótipos do gene 16S *rDNA*. *Indica as amostras sequenciadas pertencentes ao presente estudo.

Na tabela 2, estão apresentadas as identificações das amostras depositadas no *GenBank* e suas similares, de acordo com a classificação filogenética do gene alvo, o hospedeiro analisado e a cidade de origem (Tabela 2). O presente estudo demonstrou a presença de pelo menos três genótipos de *A. platys* em cães e carrapatos das cidades de San José de las Lajas, Boyeros, Cotorro e Habana del Este, na ilha de Cuba.

Tabela 2. Identificação e classificação de amostras deste estudo de acordo com o gene alvo analisado filogeneticamente, *cluster*, hospedeiro analisado e cidade de origem, Cuba

Gene alvo	Clusters**	Identificação das amostras positivas		Cidade
		Cães	Carrapatos	
<i>gltA</i>	A1	309*, 319, 330	-	San José de las Lajas
	A2	14*	13T	Habana del Este
	A2	11, 17, 30, 101	-	Habana del Este
		160, 192*	-	Boyeros
	A3	122*	-	Habana del Este
		-	23T, 32T	Boyeros
	A3	221, 227, 258*	-	Cotorro
	A3	168	38T	Boyeros
		261*	-	Cotorro
	-	-	49T	San José de las Lajas
16S <i>rDNA</i>	A1	14*	13T	Habana del Este
	A1	160*	-	Boyeros
	A1	11, 17, 30, 101	-	Habana del Este
		192*	-	Boyeros
	A1	309*	-	San José de las Lajas
	A1	319*, 330	-	San José de las Lajas
		122*	-	Habana del Este
	A3	-	23T, 32T	Boyeros
	A3	221, 227, 258*	-	Cotorro
	A3	168	38T	Boyeros
261*		-	Cotorro	
-	-	49T	San José de las Lajas	

* Amostras depositadas no *GenBank*. ** Subgrupos formados a partir de isolados dos genes 16S *rDNA* e *gltA*.

A análise das sequências de aminoácidos deduzidas das amostras para o gene *gltA* demonstraram que, em cinco amostras (KP903284, KP903285, KP903286, KP903287 e KP903288), uma mutação não-sinônima foi encontrada na posição 88 baseado na sequência sob número de acesso DQ525687, resultando na substituição de leucina por serina (Figura 6).

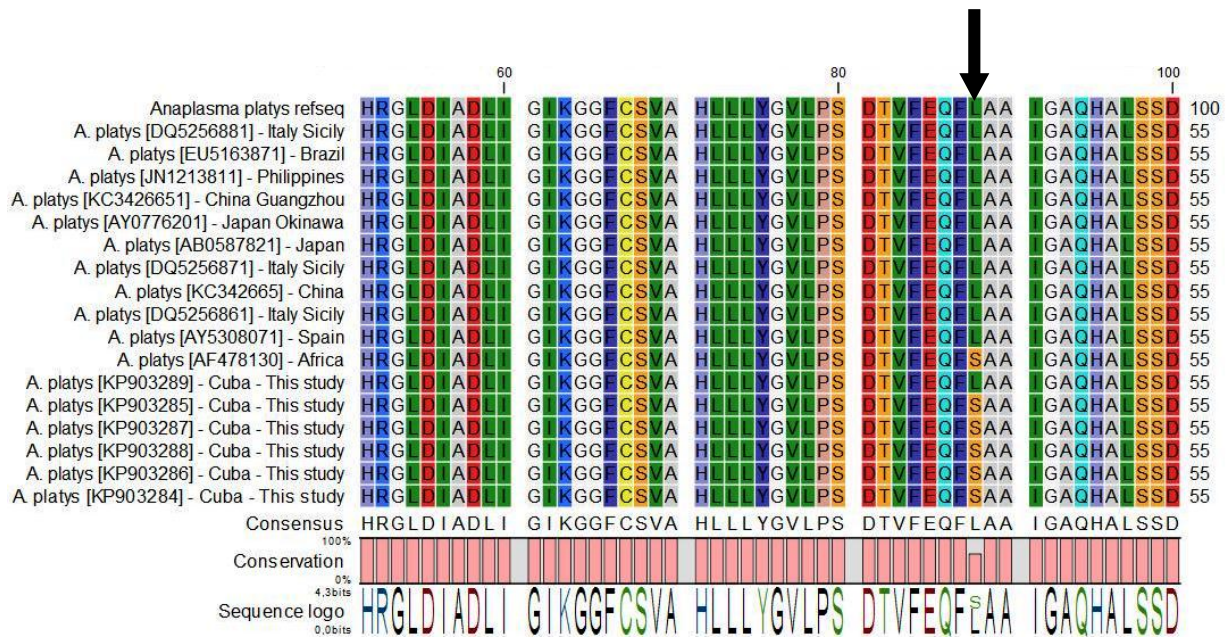


Figura 6. Alinhamento de aminoácidos a partir da sequência parcial do gene *gltA* de *Anaplasma platys*. Mutações não-sinônimas estão apresentadas na posição 88 de isolados cubanos em comparação à sequência de referência DQ525687 (sequência usada como referência de *Anaplasma platys*).

Três dos cinco isolados (KP903285, KP903287 e KP903288) tiveram outra mutação não-sinônima na posição 168, mudando de prolina para treonina (Figura 5). Essas mutações não-sinônimas foram também observadas no isolado de *A. platys* da República Democrática do Congo.

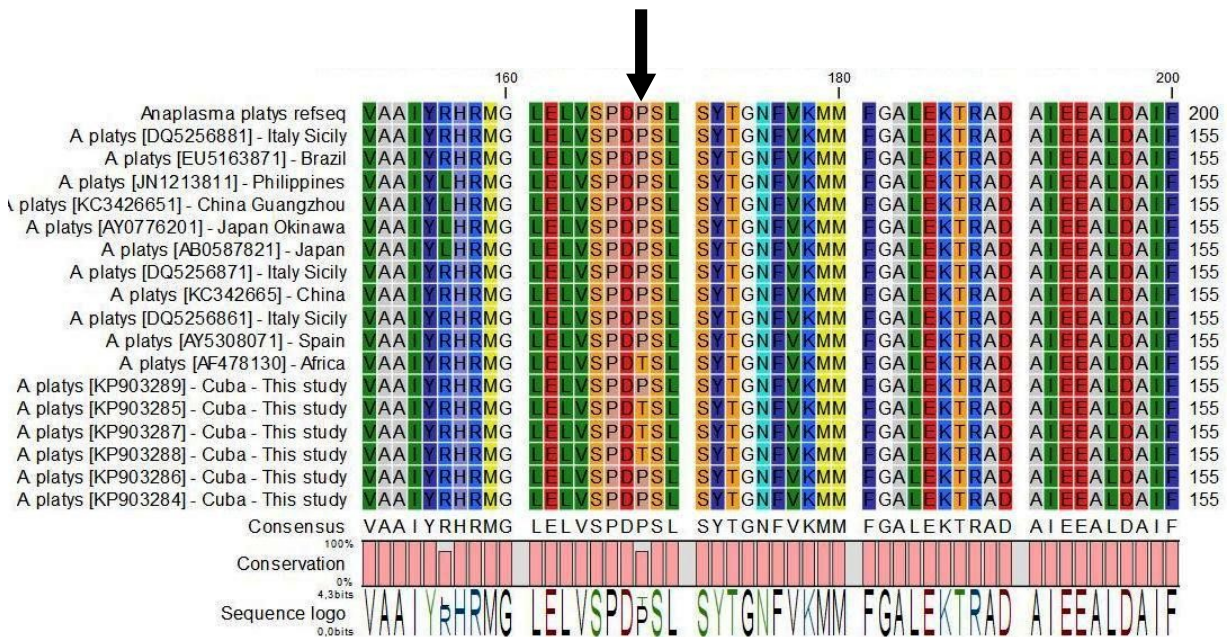


Figura 7. Alinhamento de aminoácidos a partir da sequência parcial do gene *gltA* de *Anaplasma platys*. Mutações não-sinônimas estão apresentadas na posição 168 de isolados cubanos em comparação à sequência de referência DQ525687 (sequência usada como referência de *Anaplasma platys*).

5 DISCUSSÃO

Esta é a primeira descrição de *A. platys* em cães e carrapatos de Cuba. As análises das sequências dos genes 16S *rDNA* e *gltA* mostraram uma identidade equivalente de 99-100% com as outras sequências de *A. platys* depositadas no *GenBank*.

Os exames de esfregaços sanguíneos podem revelar mórulas de *A. platys* em plaquetas e é o método diagnóstico mais utilizado; este ensaio é rápido e de baixo custo em relação a outras técnicas (FERREIRA et al., 2008), mas carece de sensibilidade. Além disso, este método de diagnóstico direto pode mostrar um resultado falso-positivo porque granulações também pode aparecer devido à ativação das plaquetas (FERREIRA et al., 2008). Grânulos densos, restos nucleares em megacariócitos (MYLONAKIS et al. 2003), artefatos de técnica e além disso, é inferido que inclusões por *Ehrlichia canis* podem ocorrer em plaquetas confundindo o examinador (ALMOSNY, 1998). Em contraste, técnicas moleculares, tais como PCR e suas variações são consideradas como ferramentas de diagnóstico importantes porque elas são sensíveis, específicas e podem ser usadas para estimar os níveis de infecção por *A. platys* em cães (RAMOS et al., 2009). O percentual de cães positivos (16%) encontrados no presente estudo é análogo a um valor médio comparado com a frequência da anaplasmose canina em outros países como Chile (20,0%) (ABARCA et al., 2007), Argentina (37,5%) (CICUTTIN et al., 2014), Brasil (13,9%) (COSTA-JÚNIOR et al., 2013) e Guiana Francesa (15,4%) (DAHMANI et al., 2015b).

Em relação aos aspectos epidemiológicos, entre as características intrínsecas analisadas, gênero, raça e idade foram fatores que não estiveram associados com a infecção *A. platys* em cães cubanos. Este resultado também foi observado no norte do Paraná (SILVA et al., 2012) e em Minas Gerais (COSTA-JÚNIOR et al., 2013), localizados no sul e sudeste do Brasil, respectivamente. No presente estudo, a infestação dos animais por carrapatos não esteve associada com a positividade para *A. platys* em cães, de acordo com outro estudo realizado no Paraná (SILVA et al., 2012), mas em contraste aos achados em Minas Gerais (COSTA-JÚNIOR et al., 2013). Tem sido sugerido que *R. sanguineus* sensu lato esteja envolvido como um vetor para *A. platys* (SANOGO et al., 2003). De fato, de acordo com outros autores, a observação de *A. platys* em *R. sanguineus* sensu lato, combinada com a distribuição mundial de *R. sanguineus* sensu lato, demonstra o alto risco de infecção em cães (ALMEIDA et al. 2012). Contudo, a participação de *R. sanguineus* sensu lato na transmissão de *A. platys* para cães não tenha sido comprovada experimentalmente (SIMPSON et al., 1991). Foi observado em nosso estudo a presença de *A. platys* em amostras de DNA de *R. sanguineus* sensu lato. Em amostras de carrapatos coletadas da cidade de San José de las Lajas foi observado um genótipo de *A. platys* diferente do isolado detectado em cães infectados na mesma cidade, destacando seu possível potencial como um dispersor deste agente. Um estudo sugeriu que podem haver algumas diferenças relacionados à cepa ou a população em termos de competência vetorial de *R. sanguineus* lato sensu para *A. platys* (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015). Além disso, a grande distribuição geográfica de *R. sanguineus* sensu lato pode ser atribuído à adaptabilidade do carrapato a diferentes condições climáticas e à estreita associação com o cão doméstico, os quais tem viajado ao redor do mundo (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

Filogenia usando um único gene pode enganosa devido à variação evolutiva de genes individuais entre os organismos relacionados (YU et al., 2001). Uma comparação de múltiplos genes aumenta a precisão de identificar positivamente tais relações filogenéticas. O sequenciamento de DNA dos genes de 16S *rDNA* e *gltA* permite a genotipagem de cepas e pode ser usado em estudos evolutivos e filogeográficos (UNVER et al., 2003). No presente estudo, foram observados três genótipos circulantes de *A. platys* em cães em Cuba. Algumas

amostras de sangue cães mostraram que as bactérias encontradas em Cuba tinham uma ancestralidade comum com o isolado da África, enquanto as outras amostras foram relacionadas a isolados de diferentes partes do mundo. Há um estudo existente que infere que um grande afluxo de pessoas, animais e produtos oferece maiores chances de deslocamento e introdução de parasitas invasores exóticos em novas áreas (CHAME et al., 2007).

6 CONCLUSÕES

A caracterização molecular mostrou que três genótipos de *A. platys* estão infectando cães e *R. sanguineus* sensu lato carrapatos em Cuba. A identificação de fatores que podem estar associados com infecção por *A. platys* em cães em Cuba devem ser investigados, considerando outros fatores inerentes à localização e criação de animais, bem como as características ambientais de cada localidade. Além disso, a amostragem de um número maior de animais e a investigação de outros locais da ilha podem demonstrar os possíveis fatores de risco que influenciam a positividade de *A. platys* em cães no país.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; PERRET, C.; GUERRERO, J.; GODOY, P.; VELOZ, A.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; LEÓN, U.; GUTJAHR, C.; AZÓCAR, T. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. **Emerg. Infect. Dis.** v.13, p.1392-1395, 2007.
- ALBERTI, A.; SPARAGANO, O.A. Molecular diagnosis of granulocytic anaplasmosis and infectious cyclic thrombocytopenia by PCR-RFLP. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1081, p.371-378, 2006.
- ALMAZÁN, C.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, V.H.; FERNÁNDEZ DE MERA, I.G.; CABEZAS-CRUZ, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, R.; DE LA FUENTE, J. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. **Ticks Tick Borne Dis.** v.7, p.276-283, 2016.
- ALMEIDA, A.B.P.F.; PAULA, D.A.J.; DAHROUG, M.A.A.; FREITAS, A.G.; SILVA, J.N.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V.R.F. *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in ticks of dogs in Cuiaba, Mato Grosso. **Semina: Ci. Agr.** v.33, p.1123-1126, 2012.
- ALMOSNY, N.R.P. *Ehrlichia canis* (Donatien e Lestosquard, 1935): avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda, em cães e gatos experimentalmente infectados. 1998. 202p. Tese (doutor em ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- ALVES, V.C. Ilusão desfeita: a "aliança especial" Brasil-Estados Unidos e o poder naval brasileiro durante e após a Segunda Guerra Mundial. **Rev. Bras. Polít. Int.** v.48 p.151-177, 2005.
- ANTOGNONI, M.T.; VERONESI, F.; MORGANTI, G.; MANGILI, V.; FRUGANTI, G.; MIGLIO, A. Natural infection of *Anaplasma platys* in dogs from Umbria region (Central Italy). **Vet. Ital.** v.50, p.49-56, 2014.
- ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAST, P. Fine structural characterization of a *Rickettsia*-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis. **J. Med. Microbiol.** v.48, p.991-997, 1999.
- ARRAGA-ALVARADO, C.; QUROLLO, B.A.; PARRA, O.C.; BERRUETA, M.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.91, p.1161-1165, 2014.
- AZEVEDO, E.R. **Caribe, o paraíso submetido**. Editora Brasiliense. 1986. 100p.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé. 2007. 380p.
- BAGGIO, K.G. Representações da nação mestiça no caribe hispânico insular. In: Anais Eletrônicos do V Encontro da ANPHLAC. Belo Horizonte: V Encontro da ANPHLAC. 2000. p.1-9.
- 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. **Paras. Vect.** v.7, p.1-7, 2014.

- BROWN, G.K.; MARTIN, A.R.; ROBERTS, T.K.; AITKEN, R.J. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. **Aust. Vet. J.** v.79, p.554-558, 2001.
- CHAME, M.; BATOULI-SANTOS, A.L.; BRANDÃO, M.L. As migrações humanas e animais e a introdução de parasitas exóticos invasores que afetam a saúde humana no Brasil. **Fundamentos.** v.7, p.47-62, 2007. Disponível em: <http://157.86.8.70:8080/certifica/handle/icict/43451>. Acessado em 11 novembro de 2015.
- CICUTTIN, G.L.; VIDAL, P.; SALVO, M.N.; BELTRÁN, F.J.; DOHMEN, F.E.G. Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). **Rev. Chilena Infectol.** v.31, p.563-568, 2014.
- 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: alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, p.899-909, 2011.
- 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. **Prev. Vet. Med.** v.109, p.321-326, 2013.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.A.S.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.** v.117, p.285-290, 2003.
- DAHMANI, M.; DAVOUST, B.; BENTERKI, M.S.; FENOLLAR, F.; RAOULT, D.; MEDIANNIKOV, O. Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. **Comp. Imm. Microbiol. Infect. Dis.** v.39, p.39-45, 2015a.
- DAHMANI, M.; MARIÉ, J-L.; MEDIANNIKOV, O.; RAOULT, D.; DAVOUST, B. First identification of *Anaplasma platys* in the blood of dogs from French Guiana. **Vector-borne Zoonot. Dis.** v.15, p.170-172, 2015b.
- DAHMANI, M.; LOUDAHI, A.; MEDIANNIKOV, O.; FENOLLAR, F.; RAOULT, D.; DAVOUST, B. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. **Ticks Tick-borne Dis.** v.6, p.198-203, 2015c.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Vet. Parasitol.** v.208, p.9-13, 2015.
- DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; NARANJO, V.; NICOSIA, S.; ALONGI, A.; LA MANTIA, F.; KOCAN, K.M. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. **BMC Vet. Res.** v.2, p.1-5, 2006.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; 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*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p.2145-2165, 2001.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1998.

- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; GUIMARÃES, C.M.; SÁ, A.G.; ABREU, F.S.; MASSARD, C.L.; ALMOSNY, N.R.P. *Anaplasma platys* diagnosis in dogs: comparison between morphological and molecular tests. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.** v.5, p.113-119, 2007.
- FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; FERREIRA, M.S.; ALMOSNY, N.R.P. Hematologic parameters in Polymerase Chain Reaction-positive and -negative dogs for *Anaplasma platys* presenting platelet inclusion bodies. **Int. J. Appl. Res. Vet. Med.** v.6, p.185-190, 2008.
- FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **Am. J. Vet. Res.** v.44, p.2407-2411, 1983.
- GONZALEZ, B.C.; MARRERO, S.M.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; PIRES, M.S.; PEIXOTO, M.P.; SILVA, C.B.; RODRÍGUEZ, D.O.; SÁNCHEZ, A.D.; SANTOS, H.A. Identificación de los genes que codifican para las proteínas VirB9, VirB10, proteína conjugal de transferencia y el factor de elongación –Tu de un aislamiento cubano de *Anaplasma marginale*. **Rev. Salud Anim.** v.37, p.10-14, 2014.
- HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK, H. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **Vet. Rec.** v.141, p.247-250, 1997.
- HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. **J. Infect. Dis.** v.137, p.182-188, 1978.
- HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**, 3ed, Saunders: Elsevier. 2011. 368p.
- HEYMAN, P.; DUH, D.; VAN DER KUYLEN, B.; COCHEZ, C.; VAN ESBROECK, M.; VANDENVELDE, C.; AVSIC-ZUPANC, T. Molecular and serological evidence for *Anaplasma platys* and *Babesia* sp. infection in a dog, imported in Belgium, from Southern Spain. **J. Vet. Med.** 54:276-279, 2007.
- INOKUMA, H.; FUJII, K.; OKUDA, M.; ONISHI, T.; BEAUFILS, J-P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon *groESL* and the citrate synthase gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. **Clin. Diag. Lab. Immunol.** v.9, p.1132-1136, 2002a.
- INOKUMA, H.; FUJII, K.; MATSUMOTO, K.; OKUDA, M.; NAKAGOME, K.; KOSUGI, R.; HIRAKAWA, M.; ONISHI, T. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. **Vet. Parasitol.** v.110, p.145-152, 2002b.
- KONTOS, V.I.; PAPADOPOULOS, O.; FRENCH, T.W. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. **Vet. Clin. Pathol.** v.20, p.101-105, 1991.
- MACHADO, N. **Cuba, vanguardia e farol da América**. Publisher, Editõra Fulgor. 1963, 127p.
- LLORENS, Y.G.; YEAR, Y.E.; LÓPEZ, E.M.; PONCE, J.D.M.; GONZÁLEZ, A.M.; WONG, T.P.; PERÓN, S.A.; CAMBAS, G.A. Factors that lead to abandonment of dogs in a region of Cuba. **Redvet.** v.8, p.1-10, 2007.
- MARTIN, A.R.; BROWN, G.K.; DUNSTAN, R.H.; ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Exp. Parasitol.** v.109, p.176-180, 2005.
- MARTINS, J.S. **Uma arqueologia da memória social: autobiografia de um moleque de fábrica**. Ateliê Editorial, São Paulo. 2011.
- MATOS, J.A. **As Ruas Das Nossas Vidas**. Editora Palibrio. 2012. 156p.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.; PAPAPOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.** v.91, p.197-204, 2003.

ONÓFRIO, V.C.; VENZAL, J.M.; PINTER, A.; SZABÓ, M.P.J. **Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros.** In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH (ed) Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan. 2006. p.29-39.

PAROLA, P.; CORNET, J-P.; SANOGO, Y.O.; MILLER, R.S.; VAN THIEN, H.; 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. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p.600-1608, 2003.

QUROLLO, B.A.; CHANDRASHEKAR, R.; HEGARTY, B.C.; BEALL, M.J.; STILLMAN, B.A.; LIU, J.; THATCHER, B.; PULTORAK, E.; CERRITO, B.; WALSH, M.; BREITSCHWERDT, E.B. A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. **Infect. Ecology Epidemiol.** v.4, p.1-12, 2014.

RAMOS, C.A.N.; RAMOS, R.A.N.; ARAÚJO, F.R.; GUEDES JR., D.S.; SOUZA, I.I.F.; ONO, T.M.; VIEIRA, A.S.; PIMENTEL, D.S.; ROSAS, E.O.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Comparison of nested-PCR with blood smear examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.18, p.58-62, 2009.

ROMERO, R.G. Estudios del Caribe en Venezuela. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 1988. 219p.

ROJAS, A.; ROJAS, D.; MONTENEGRO, V.; GUTIÉRREZ, R.; YASUR-LANDAUC, D.; BANETH, G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: first molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. **Vet. Parasitol.** v.199, p.3-4, 2014.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v.74, p.5463-5467, 1977.

SANOGO, Y.O.; INOKUMA, H.; PAROLA, P.; BROUQUI, P.; DAVOUST, B.; CAMICAS, J-L. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa. **Onderstepoort J. Vet.** v.70, p.205-212, 2003.

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 Zoon. Dis.** v.14, p.368-370, 2014.

SCHNEIDER, R. **A verdade sobre Cuba.** Edicoes Loyola. 1992. 136 p.

SILVA, G.C.F.; BENITEZ, N.A.; GIROTTO, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M.C.; GARCIA J.L.; FREITAS, J.C.; ARLINGTON, S.H.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.21, p.379-385, 2012.

SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G.; CASEY, H.W.; Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. **Am. J. Vet. Res.** v.52, p.1537-1541, 1991.

- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol.** v.30, p2725-2729, 2013.
- TOMMASI, A.S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E.B.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. CAPRARIIS, D. *Anaplasma platys* in bone marrow megakaryocytes of young dogs. **J. Clin. Microbiol.** v.52, p.2231-2234, 2014.
- UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; YAMAMOTO, S. Analysis of 16SrRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. **An. New. York Acad. Sci.** v.990, p.692-698, 2003.
- YABSLEY, M.J.; MCKIBBEN, J.; MACPHERSON, C.N.; CATTAN, P.F.; CHERRY, N.A.; HEGARTY, B.C.; BREITSCHWERDT, E.B.; O'CONNOR, T.; CHANDRASHEKAR, R.; PATERSON, T.; PEREA, M.L.; BALL, G.; FRIESEN, S.; GOEDDE, J.; HENDERSON, B.; SYLVESTER, W. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. **Vet. Parasitol.** v.151, p.279-285, 2008.
- YU, X.J.; ZHANG, X.F.; MCBRIDE, J.W.; ZHANG, Y.; WALKER, D.H. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and “*Ehrlichia platys*” to other *Ehrlichia* species determined by *GroEL* amino acid sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.51, p.1143-1146, 2001.

8 CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo além de relatar a primeira evidência de *A. platys* em ambos cães e carrapatos em Cuba, também apresenta pela primeira vez o desenvolvimento de um novo método de qPCR que contribui para o avanço da pesquisa envolvendo *A. platys*. O estudo epidemiológico realizado no Brasil permitiu identificar que cães jovens, e com a presença e o elevado grau de infestação por carrapatos são os fatores mais importantes relacionados à infecção destes animais por *A. platys* na microrregião de Itaguaí, no estado do Rio de Janeiro. O modo de criação e tipo de ambiente em que estes cães estão também são fatores relacionados à infecção destes animais por este agente etiológico. Enquanto em Cuba, pode-se concluir que mais investigações são necessárias para avaliar quais os fatores decisivos na transmissão e dispersão de *A. platys* nesse país.

ANEXOS

Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Anexo II – Parecer da COMEP/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.

Anexo III – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.

Anexo IV – Certificado Zoosanitário de exportação das amostras (Servicio Veterinario de Frontera – Cuba)

Anexo V – Aprovação do Conselho Científico Veterinário de Cuba (CCVC).

Anexo I – Questionário epidemiológico estruturado e aplicado aos moradores visitados na microrregião de Itaguaí, Rio de Janeiro.

Ficha de Propriedade e Proprietário

Data: ____/____/____ Propriedade Nº _____ Zona: () Rural () Urbana
Localidade: _____ Coord. Geográf.: _____
Proprietário: _____
Endereço: _____
Pt de referência: _____ Temperatura ambiente: _____
Tel: _____ e-mail: _____
Tipo de residência: () pau a pique () alvenaria () outros: _____
Tipo de vegetação predominante: _____
Quantos cães em casa: ____
Pratica alguma ação para controle de ectoparasitos?
() sim () não Qual? _____
Leva o cão ao veterinário?
() sim () não Qual a Periodicidade? _____
Presença de outras espécies domésticas:
() gatos () bovinos () equinos () outros: Quais? _____
Presença de animais silvestres:
() capivara () gambá () outros: _____
Condição econômica (observacional):
() baixa () média () alta
Escolaridade:
Nunca frequentou a escola ()
Ensino fundamental incompleto ()
Ensino fundamental completo ()
Ensino médio incompleto ()
Ensino médio completo ()
Ensino superior completo/incompleto ()
Que produtos de limpeza utiliza no ambiente? _____
Utiliza prod. inseticidas no ambiente?
() sim () não Quais? _____ Intervalos? _____
Utiliza mét. Físicos de limpeza no ambiente (Ex: Vassoura de fogo)?
() sim () não Quais? _____ Intervalos? _____
Outras observações relevantes:

FICHA INDIVIDUAL ANIMAL Nº _____

Data: __/__/__ Propriedade Nº _____ Zona: () Rural () Urbana Localidade: _____

Proprietário: _____

Nome do animal: _____ Sexo: () Macho () Fêmea Raça: _____ Cor: _____

Animal nascido na propriedade? () sim () não

Se não, de onde veio o animal? _____

Há quanto tempo está com o animal? _____

Pêlo: () curto () médio () longo

Porte: () peq () méd () grande

Escore: () caquético () magro () normal () obeso

Comportamento: () triste () ativo/normal () agitado

Idade: () <6 meses () 6 meses a 2 anos () 2 a 5 anos () 5 a 10 anos () > 10 anos

Temperatura: _____ Pulso: _____ FR: _____ FC: _____ TPC: _____ Turgor: _____

Linfonodos: _____

Mucosa ocular: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Mucosa oral: () hipocorada () normocorada () ictérica () congesta

Outras alterações sanitárias atuais: _____

Distúrbios atuais de coagulação na pele: () petéquias () equimoses () outros: _____

Histórico de epistaxe, rinorragia, gengivorragia: () sim () não

Animal vive dentro da residência: () sim () não () às vezes

Locais de acesso do animal: () pastagens () córregos () matas () ambiente urbano

Contato direto com outras espécies de animais: () sim () não Quais? _____

Histórico de patologias: _____

Tipo de alimentação: () comida () ração

Possui água e comida à disposição o tempo todo? () sim () não

Vermifugação: () sim () não Há qto tempo? _____ Qual produto? _____

Critério para escolha: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

Possui ectoparasitos? () sim () não

Quais e quantidade?

() pulgas _____ () piolhos _____ () sarnas _____

() carrapatos _____ Fases: _____ espécies: _____

Faz tratamento? () sim () não Qual produto? _____

Se não trata, qual motivo? _____

Critério para escolha do produto: () indicação () balconista () veterinário () propaganda

Dermatopatias? () sim () não

Outros tipos de lesões: _____

Sinais de otite? () sim () não

Hábito do animal?

() sempre preso () preso de dia e solto à noite () solto () outros _____

Apresenta abrigo? () sim () não Tipo: _____

Tipo de ambiente do animal:

() ladrilhado () cimentado () de terra () outros

Condição de limpeza do ambiente do animal: () ruim () moderada () satisfatória

Frequência de recolhimento e limpeza das fezes:

() diariamente () 2 a 3 vezes por semana () 1 vez por semana () não faz

Tem assistência Veterinária? () sim () não

Frequência? () a cada 6 meses () 1 x por ano () só qd fica doente

Animal é vacinado? () sim () não Quais vacinas? _____

Banho: () semanal () quinzenal () mensal () outros

Usa produtos parasiticidas? () sim () não Quais? _____

Outras obs relevantes:



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____ CPF/RG: _____

Endereço: _____

_____ telefone: _____, recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em cães, autorizo a coleta de material biológico em meus cães, estando ciente que minha identidade será preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ___/___/___

Assinatura: _____

Anexo II – Parecer da COMEP/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.




SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo N° 363/2013

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “Diagnóstico molecular através da PCR em tempo real e análise filogenética de *Anaplasma platys* em cães do Município de Mangaratiba, estado do Rio de Janeiro” sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Luiz Massard, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, processo 23083.003990/2013-93, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 26/07/2013.


Prof. Dr. Roberto Carlos Costa Lelis
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-graduação

Jairo Pinheiro da Silva
Pró-reitor Adjunto de
Pesquisa e Pós-Graduação
SIAPE nº 1109555

Anexo III – Parecer do CEUA/UFRRJ – Autorizando a realização do trabalho de pesquisa, respeitando as diretrizes éticas de uso animal.



Seropédica 16 de janeiro de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 01/2014 intitulado “Agentes etiológicos da Família Anaplasmataceae em Cães e Carrapatos e sua Importância para a Saúde Pública” encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Parasitologia Veterinária, Carlos Luiz Massard. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 16 de janeiro de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV

Anexo IV – Certificado Zoosanitario de exportación das amostras (Servicio Veterinario de Frontera – Cuba)

REPUBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE LA AGRICULTURA
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINARIA

R.S. 12242013

CERTIFICADO ZOOSANITARIO DE EXPORTACION

Dr. PAULINO SANTOS MONTERO, médico veterinario oficial del Instituto de Medicina Veterinaria.


CERTIFICO:

- Que el presente documento oficial, ampara la exportación de:

Producto	Cantidad
MUESTRAS DE ADN GENÓMICO DE HEMOPARÁSITOS EXTRAIDO Y PURIFICADO DE SANGRE DE PERRO (<i>Canis familiaris</i>)	400 VIALES PLÁSTICOS EPPENDORFS DE 50 µL CADA MUESTRA

- Que el material de referencia fue procesado en el Centro Nacional de Seguridad Agropecuaria (CENSA) y procede de la **Universidad Agraria de La Habana** y será empleado para el diagnóstico y caracterización molecular de los principales parásitos que afectan a los perros de la región occidental de Cuba.
- Que el destino es la **Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, Brasil. Rod. Br. 465 km siete, Seropédica, Río de Janeiro, Brasil. CEP 23890-000.**
- Que el producto en cuestión será transportado por la Dra. MV Claudia Bezerra da Silva, MsC (NP. FI597813) por vía aérea en el vuelo CM 0437 k Habana – Panamá y CM 0113 k Panamá – Río con fecha **15 de diciembre de 2013.**
- Que el material de referencia no ofrece peligro alguno para la salud humana y animal.
- Que desde el punto de vista sanitario-veterinario, el material de referencia se encuentra apto para ser traslado fuera del territorio de la República de Cuba.

Y para constancia, firmo el presente en **La Habana**, a los 25 días del mes de NOVIEMBRE de 2013.


MÉDICO VETERINARIO

Anexo V – Aprobación do Conselho Científico Veterinário de Cuba (CCVC).



CONSEJO CIENTÍFICO VETERINARIO DE CUBA
Paseo No. 604 e/ 25 y 27. Plaza de la Revolución.
Apartado 10400. LA Habana. Cuba
Teléfono 830 8064 / 836 7588 Email ccvpresidencia@infomed.sld.cu

La que suscribe, Dra. Beatriz Inés Amaro Villanueva,
Presidenta del Consejo Científico Veterinario de Cuba (CCVC)

AVALA

Que en Reunión Ordinaria del Buró Ejecutivo del Consejo Científico Veterinario de Cuba (CCVC) efectuada el 17 de Julio del año 2015, el Buró Ejecutivo del CCVC a propuesta de la MSc. Ralmary Rodríguez Fernández, Presidenta de la Sociedad Cubana de Parasitología Veterinaria, acordó **APROBAR** el Dictamen de **PRIMER REPORTE** en Cuba de **Anaplasma platys** en perros y garrapata **Rhipicephalus sanguineus**, presentado por el grupo de autores: Claudia Bezerra da Silva, Huarisson Azevedo Santos, Carlos Luis Massard, Adivaldo Henrique de Fonseca, Maylin González Navarrete, Carla Carolina Díaz Uzedo, Marcus Sandes Pires, Gabriela López Vivas, Maristela Peckle Peixoto, Renata Lins de Costa, Mario Márquez Álvarez, Julio Alberto Martín, Eugenio Roque López, Julio Cesar Alonso Rodríguez, Maykelin Fuentes Zaldivar, Belkis Corona González, Yasmin Batista Chávez, Alejandro Peñalver Menéndez.

Tal propuesta está respaldada por la ausencia de reportes de la presencia del parásito en Cuba así como los autores demostraron las secuencias de ácido nucleico de *Anaplasma platys*, mediante el diagnóstico por técnicas moleculares de un nested PCR a partir del ADN extraído de sangre de perros y de pool de garrapatas recolectadas de estos perros, y la secuenciación del 16S rDNA y el gen *gltA*, para demostrar la identidad de la especie.

DADO EN LA HABANA, a los 30 días del mes de Julio del año 2015. "Año 57 de la Revolución"

Dra. Beatriz I. Amaro Villanueva MSc.
Presidenta
Consejo Científico Veterinario de Cuba (CCVC)

