

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Detecção de *Anaplasma platys* em cães trombocitopênicos de  
duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro**

**Diogo dos Santos Maia**

**2023**



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

**Detecção de *Anaplasma platys* em cães trombocitopênicos de duas  
mesorregiões do estado do Rio de Janeiro**

**DIOGO DOS SANTOS MAIA**

*Sob a orientação da professora*

**Bruna de Azevedo Baêta**

*co-orientação dos professores*

**Adivaldo Henrique da Fonseca**

**Matheus Dias Cordeiro**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de **Mestre** em Ciências  
Veterinárias no Programa de Pós-  
Graduação em Ciências  
Veterinárias

**Seropédica, RJ  
Setembro de 2023**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M217d      Maia, Diogo dos Santos, 1986-  
              Detecção de Anaplasma platys em cães  
trombocitopênicos de duas mesorregiões do estado do  
Rio de Janeiro / Diogo dos Santos Maia. - Rio de  
Janeiro, 2023.  
              69 f.: il.

              Orientadora: Bruna de Azevedo Baêta.  
              Coorientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.  
              Coorientador: Matheus Dias Cordeiro.  
              Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2023.

              1. Anaplasma platys. 2. Prevalência. 3.  
Trombocitopenia. 4. Cão. 5. Rio de Janeiro. I. Baêta,  
Bruna de Azevedo, 1984-, orient. II. Fonseca,  
Adivaldo Henrique da, -, coorient. III. Cordeiro,  
Matheus Dias, -, coorient. IV Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 4132/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.066038/2023-72

Seropédica-RJ, 29 de setembro de 2023.

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

**DIOGO DOS SANTOS MAIA**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/09/2023

*(Assinado digitalmente em 29/09/2023 14:21)*

ANDRESA GUIMARAES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.00.53)  
Matrícula: ###244#9

*(Assinado digitalmente em 29/09/2023 16:16)*

BRUNA DE AZEVEDO BAETA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.00.55)  
Matrícula: ###475#9

*(Assinado digitalmente em 01/10/2023 10:54)*

RENATA FERNANDES FERREIRA DE MORAES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.847-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **4132**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **29/09/2023** e o código de verificação: **2b7baab1d0**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que até aqui me abençoou com a vida e saúde necessárias para que eu buscasse concretizar os meus objetivos.

Aos meus pais, Hermelio Maia e Solange Barros, e irmã, Andressa Maia, por seu amor, suporte e incentivo incansáveis que são o meu porto seguro e o meu alicerce.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Bruna de Azevedo Baêta, por me aceitar como seu orientado, acreditar na relevância deste trabalho e confiar na minha capacidade quando eu mesmo achei que não conseguiria. Você é um exemplo de líder, professora e pesquisadora. Obrigado por todo o seu suporte e incentivo.

Ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, e ao Dr. Matheus Dias Cordeiro por seu exemplo de dedicação e comprometimento com a pesquisa, e por fazerem do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro um ambiente leve e inspirador que recebe a todos de braços abertos.

À Médica Veterinária Joana Garcia Paz, proprietária e responsável técnica do laboratório veterinário de análises clínicas Labocani, em Paracambi, pela parceria e cessão das amostras sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Douglas McIntosh e equipe do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, pelo suporte no sequenciamento genético das amostras desta pesquisa.

Ao Professor Dr. Paulo Cesar Magalhães Bastos, por seu impecável e imprescindível suporte na execução e interpretação das análises estatísticas dos resultados desta pesquisa.

Às minhas melhores amigas que desde a graduação me acolhem, acompanham e vibram com cada sucesso da minha trajetória. Juliana Prado, Karen Dunga, Silvia Azeredo, Marcelle de Castro e Joyce Helena, vocês me ensinam todos os dias o poder e a força da amizade verdadeira que nem o tempo nem a distância podem enfraquecer.

Aos meus incríveis parceiros de jornada, Jonathan Chagas e Olivia Zen, que concluem comigo essa etapa da vida acadêmica. Nem mesmo trezentos parágrafos seriam suficientes para expressar a minha gratidão e o carinho que tenho por vocês. Vocês são verdadeiros presentes que me deram a certeza de que eu cursei o Mestrado no momento certo e ao lado das melhores pessoas. Sem vocês ao meu lado eu não teria conseguido, e eu desejo que esse seja só o primeiro de muitos passos que daremos juntos.

Ao time do Laboratório de Doenças Parasitárias: Isadora Dias, Maiara Vasconcelos, Erica Gonçalves, Eduardo Sena, Ellen Meireles Brandão, Rodrigo Oliveira, Aline Furtado,

Renata Silva, Gilliard Ferreira, Ana Clara, João Caetano, Wendel Benac, Davi Guimarães e Jordana Barros, por me proporcionarem a experiência agradável de um ambiente descontraído e acolhedor em cada oportunidade que tivemos juntos, e mostrarem como é ser uma equipe que se ajuda e se apóia a todo momento.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

## **BIOGRAFIA**

DIOGO DOS SANTOS MAIA, filho de Hermelio Maia do Nascimento e Solange Barros dos Santos, nasceu no Rio de Janeiro-RJ, em 28 de março de 1986. Concluiu o ensino médio no Santa Mônica Centro Educacional em 2002, e no ano seguinte ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica-RJ. Ao longo da graduação exerceu atividade de monitor da disciplina Zoologia Médica e Parasitologia I e foi contemplado com bolsa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq na área de Parasitologia Veterinária. Graduou-se Bacharel em Medicina Veterinária em setembro de 2008. Dedicou-se à Clínica Médica e Medicina Intensiva de Animais de Companhia até 2010, quando iniciou sua atuação na Patologia Clínica Veterinária. Entre os anos de 2011 e 2012 cursou a Especialização em Patologia Clínica Veterinária pelo Instituto Qualittas/Universidade Castelo Branco (UCB), Rio de Janeiro-RJ. Em fevereiro de 2013 foi aprovado no concurso do Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária, onde atuou como residente em Patologia Clínica Veterinária até fevereiro de 2015, sendo certificado com o título de Especialização em Patologia Clínica Veterinária em abril de 2018. Em 2021, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV - UFRRJ), a nível de mestrado, sob orientação da Professora Dra. Bruna Baêta e co-orientação do Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca e do Dr. Matheus Dias Cordeiro. Participou da organização do ‘1º Curso de Verão em Parasitologia do PPGCV: Da Academia para a Sociedade’, ministrando as aulas ‘Piroplasmida e Microfilárias em Animais Domésticos’ e ‘Alterações Hematológicas nas Hemoparasitoses’ e obteve conceito máximo em todas as disciplinas cursadas, submetendo-se à defesa de Dissertação em setembro de 2023.

## RESUMO

MAIA, Diogo dos Santos. **Deteção de *A. platys* em cães trombocitopênicos de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro**. 2023. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

*Anaplasma platys* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, com tropismo para as plaquetas e agente etiológico da Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina (TCIC), enfermidade distribuída mundialmente, transmitida pelo carrapato ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato e comumente associada, como o nome indica, à trombocitopenia em cães. É predominante em regiões de clima subtropical e tropical, incluindo o Brasil, onde ocorre com prevalências que variam de 2 a 55%, com relatos em todas as regiões do país. É sabidamente um agente zoonótico e seu vetor já foi descrito parasitando seres humanos no Brasil. Apesar de sua importância, vários aspectos da infecção ainda são desconhecidos em muitos locais do país. Desta forma, este estudo objetivou determinar a prevalência, por métodos hematológicos e moleculares, analisar os aspectos epidemiológicos, e avaliar a diversidade genética de *A. platys*, utilizando o gene *gltA*, em amostras de sangue total de cães trombocitopênicos naturalmente infectados de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. Foram utilizadas amostras de sangue total de cães trombocitopênicos, independente do sexo, raça e idade, das mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, para a avaliação hematológica, pesquisa de hemoparasitos e investigação molecular quanto à presença de *A. platys*, *Ehrlichia* sp e *Babesia* sp, excluindo-se do estudo as amostras positivas para os dois últimos. Os resultados hematológicos dos animais positivos e negativos para *A. platys* foram comparados, e a correlação das variáveis sexo, raça e idade dos cães com a positividade para *A. platys* foi verificada, bem como o grau de concordância entre os diagnósticos molecular e parasitológico para *A. platys*. As amostras positivas para *A. platys* foram sequenciadas e submetidas a análise filogenética. Ao todo, 404 amostras foram processadas, sendo 274 da mesorregião Metropolitana e 130 da mesorregião do Sul Fluminense. Destas, 4,7% (19/404) amplificaram para o gene *gltA* de *A. platys*, e coinfeção foi detectada em 4 amostras. Anemia, hipocromia, hipoproteïnemia e a variável sexo (cães machos) foram associadas à infecção, enquanto não houve diferença significativa quanto aos níveis de trombocitopenia entre animais positivos e negativos. Demonstrou-se uma concordância fraca entre os diagnósticos molecular e parasitológico. Dentre as amostras positivas, quinze foram submetidas ao sequenciamento e análise filogenética, e as sequências obtidas mostraram identidade entre 99-100% com isolados de *A. platys* de vários continentes e se organizaram em um mesmo clado. Com base nos resultados, conclui-se que há apenas um genótipo de *A. platys* infectando cães nas áreas de estudo, e que anemia é o único achado associado à infecção, não podendo-se considerar a presença de trombocitopenia, tampouco sua severidade, como critérios diagnósticos.

**Palavras-chave:** *Anaplasma platys*, prevalência, trombocitopenia, cão, Rio de Janeiro



## ABSTRACT

MAIA, Diogo dos Santos. **Detection of *A. platys* in thrombocytopenic dogs from two mesoregions of the state of Rio de Janeiro.** 2023. 69p. Dissertation (Master's in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

*Anaplasma platys* is a gram-negative, obligatory intracellular bacterium, with tropism for platelets and the etiological agent of Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia (CICT), a disease distributed worldwide, transmitted by the ixodid tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and commonly associated, as the name indicates, with thrombocytopenia in dogs. It is predominant in regions with a subtropical and tropical climate, including Brazil, where it occurs with prevalence rates ranging from 2 to 55%, with reports in all regions of the country. It is known to be a zoonotic agent and its vector has already been described as parasitizing humans in Brazil. Despite its importance, several aspects of the infection are still unknown in many parts of the country. Therefore, this study aimed to determine the prevalence, by hematological and molecular methods, analyze the epidemiological aspects, and evaluate the genetic diversity of *A. platys*, using the *gltA* gene, in whole blood samples from naturally infected thrombocytopenic dogs from two mesoregions of the Rio de Janeiro state. Samples were used regardless of sex, breed and age, from the Metropolitana and Sul Fluminense mesoregions, for hematological evaluation, hemoparasite research and molecular investigation regarding the presence of *A. platys*, *Ehrlichia* sp and *Babesia* sp, excluding from the study the positive samples for the last two. The hematological results of animals positive and negative for *A. platys* were compared, and the correlation of the variables sex, breed and age of the dogs with positivity for *A. platys* was verified, as well as the degree of agreement between the molecular and parasitological diagnoses for *A. platys*. Samples positive for *A. platys* were sequenced and subjected to phylogenetic analysis. In total, 404 samples were processed, 274 from the Metropolitana mesoregion and 130 from the Sul Fluminense mesoregion. Of these, 4.7% (19/404) amplified for the *A. platys gltA* gene, and co-infection was detected in 4 samples. Anemia, hypochromia, hypoproteinemia and the variable sex (male dogs) were associated with infection, while there was no significant difference in thrombocytopenia levels between positive and negative animals. A poor agreement was demonstrated between molecular and parasitological diagnoses. Among the positive samples, fifteen were subjected to sequencing and phylogenetic analysis, and the sequences obtained showed identity between 99-100% with *A. platys* isolates from several continents and formed a single clade. Based on the results, it is concluded that there is only one genotype of *A. platys* infecting dogs in the study areas, and that anemia is the only finding associated with the infection. It is not possible to consider the presence of thrombocytopenia, nor its severity, as diagnostic criteria.

**Keywords:** *Anaplasma platys*, prevalence, thrombocytopenia, dog, Rio de Janeiro

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Taxonomia da família Anaplasmataceae, antes e depois da reorganização proposta por Dumler e colaboradores (Adaptado de Rikihisa (1991); Dumler <i>et al</i> (2001)) .....	2
<b>Quadro 2.</b> Detecção de <i>A. platys</i> em cães de diferentes regiões do Brasil.....	6
<b>Quadro 3.</b> Sequências do gene <i>gltA</i> do GenBank alinhadas com as sequências obtidas no presente estudo. <i>Candidatus</i> <i>Anaplasma turritanum</i> foi utilizada como grupo externo.....	20

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análises descritiva e estatística das mesorregiões e variáveis de cães trombocitopênicos infectados por <i>Anaplasma platys</i> , diagnosticados através da PCR nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023. ....	24
<b>Tabela 2.</b> Análises descritiva e estatística das mesorregiões e variáveis de cães trombocitopênicos infectados por <i>Anaplasma platys</i> , diagnosticados através da PCR nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023. ....	25
<b>Tabela 3.</b> Alterações hematológicas dos cães trombocitopênicos positivos e negativos para infecção por <i>Anaplasma platys</i> , diagnosticada através da PCR, nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023. ....	26
<b>Tabela 4.</b> Comparação entre PCR e diagnóstico direto e propriedades diagnósticas do diagnóstico direto de <i>Anaplasma platys</i> no esfregaço sanguíneo de cães, nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023. ....	27

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do ciclo biológico de <i>A. platys</i> . Com informações de Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; Brown et al, 2005; Gaunt et al, 2010; Harvey, 2012; Wen-Ping et al, 2016; Matei et al, 2017; Pérez-Tanoira et al, 2020; Snellgrove et al, 2020. ....	5
<b>Figura 2.</b> Representação dos produtos de PCR para o gene GAPDH (400 pb) de mamíferos (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2-28: Amostras positivas. Poço 29: Controle negativo. ....	22
<b>Figura 3.</b> Representação das mesorregiões do estudo, indicando as cidades de origem das amostras positivas para o gene GAPDH.....	23
<b>Figura 4.</b> Representação dos produtos de PCR para o gene <i>gltA</i> (580 pb) de <i>Anaplasma platys</i> (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinaps Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2, 3, 5, 7-9, 12, 14, 15, 17, 19, 23, 27, 28: Amostras positivas. Poços 4, 6, 10, 11, 13, 16, 20-22, 24-26: Amostras negativas. Poço 29: Controle negativo. Poço 30: Controle positivo. ....	24
<b>Figura 5.</b> Análise filogenética de <i>Anaplasma platys</i> isolado de cães baseada na comparação da sequência do gene <i>gltA</i> (580 pares de base). Números de acesso do GenBank estão indicados ao lado de cada sequência. 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. <i>Candidatus Anaplasma turritanum</i> (MW296122 E MW 296120) foi usada como grupo externo. As amostras sequenciadas pertencentes ao presente estudo estão destacadas em negrito.....	28

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEPERJ	Centro Estadual de Estatísticas, Pesquisas e Formação de Servidores do Rio de Janeiro
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
fL	Fentolitros
g/dL	Gramas por decilitro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
M	Metro
mM	Milimol
mg/dL	Miligramas por decilitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
nPCR	Nested-PCR
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPT	Proteína plasmática total
qPCR	PCR em tempo real
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SRD	Sem Raça Definida
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TLCE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VCM	Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Família Anaplasmataceae .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 <i>Anaplasma platys</i> .....</b>	<b>3</b>
2.2.1 Posição taxonômica .....	3
2.2.2 Ciclo biológico e transmissão .....	3
<b>2.3 Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina.....</b>	<b>5</b>
2.3.1 Distribuição e epidemiologia .....	5
2.3.2 Patogenia e sinais clínicos .....	7
2.3.3 Diagnóstico .....	9
<b>2.4 Diversidade Genética de <i>Anaplasma platys</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Alterações Hematológicas .....</b>	<b>11</b>
2.5.1 Trombocitopenia cíclica infecciosa canina.....	11
2.5.2 Diagnóstico diferencial com outras hemoparasitoses .....	12
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Áreas de Estudo.....	14
3.2 Considerações Éticas .....	14
3.3 Amostragem e Avaliação Hematológica .....	15
3.4 Extração de DNA e Verificação do Gene Endógeno .....	16
3.5 Detecção Molecular de <i>Babesia</i> sp e <i>Ehrlichia</i> sp .....	17
3.6 Detecção Molecular de <i>Anaplasma platys</i> .....	18
3.7 Eletroforese e Visualização dos Resultados .....	19
3.8 Sequenciamento Genético e Análise Filogenética .....	19
3.9 Análise Estatística .....	21
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Anaplasma* (família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales) reúne pequenas bactérias pleomórficas, intracelulares obrigatórias e Gram-negativas da subclasse Alphaproteobacteria, que são transmitidas, em sua maioria, por carrapatos da família Ixodidae a hospedeiros vertebrados. Muitas espécies do gênero *Anaplasma* tem ampliado seu tropismo de hospedeiros, contrariando o que era sabido até então. *Anaplasma phagocytophilum* era a única espécie capaz de infectar o ser humano, mas o potencial zoonótico de outras espécies, já foi demonstrado, o que denota uma relevância médica e médico-veterinária crescentes (Rar, Tkachev; Tikunova, 2021).

*Anaplasma platys* é o agente etiológico da Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina, uma enfermidade de cães inicialmente descrita nos Estados Unidos (Harvey; Gaskin; Simpson, 1978) mas atualmente relatada em todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais com prevalências que variam entre 0,4% a 70,5% (Rimaszewska; Grenda, 2008; Atif, 2016). Embora o cão seja o hospedeiro onde a doença clínica se desenvolva, este agente tem sido relatado em uma gama cada vez maior de hospedeiros, como felinos, ruminantes, cervídeos e o próprio ser humano (Atif *et al*, 2021).

A extensão exata da infecção por *A. platys* em seres humanos não é conhecida, uma vez que os relatos indicam casos clínicos de severidade variável, além da ocorrência de coinfeções (Arraga-Alvarado *et al*, 2014; Breitschwerdt *et al*, 2014; Maggi *et al*, 2013). O carrapato apontado como vetor da doença, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, já foi descrito parasitando seres humanos no Brasil (Acosta; Martins; Labruna, 2017).

Devido à sua dimensão continental e muitas particularidades regionais, há muitas divergências quanto à prevalência e fatores de risco para a infecção por *A. platys* no Brasil, e para muitos locais tais informações ainda são desconhecidas. Diante deste cenário, e considerando sua crescente importância para a Saúde Pública enquanto agente zoonótico, este trabalho teve como objetivos estabelecer a prevalência, e investigar a diversidade genética de *Anaplasma platys* em cães trombocitopênicos de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae (ordem Rickettsiales) reúne agentes de distribuição mundial e reconhecido potencial zoonótico, representados pelos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*. Caracterizam-se como pequenas bactérias pleomórficas e Gram-negativas, que residem em vacúolos citoplasmáticos das células hospedeiras, isoladamente ou em inclusões compactas denominadas mórulas. Com exceção do gênero *Wolbachia*, as espécies desta família se replicam em hospedeiros vertebrados e são transmitidos por carrapatos ou trematódeos vetores (Dumler *et al*, 2001).

Com base na análise filogenética dos genes 16S rRNA e *groESL*, a família Anaplasmataceae passou por uma significativa reorganização taxonômica, a partir da qual a estrutura de tribos foi descontinuada e espécies foram criadas ou tiveram seus gêneros alterados (Quadro 1).

**Quadro 1.** Taxonomia da família Anaplasmataceae, antes e depois da reorganização proposta por Dumler e colaboradores (Adaptado de Rikihisa (1991); Dumler *et al* (2001))

	Até 2001		A partir de 2001		
Família	Rickettsiaceae	Anaplasmataceae	Anaplasmataceae		
Tribo	Tribo Erlichieae		-	-	-
Gênero	<i>Ehrlichia</i> sp	<i>Anaplasma</i> sp	<i>Ehrlichia</i> sp	<i>Anaplasma</i> sp	<i>Neorickettsia</i> sp
Espécies	<i>E. canis</i>	<i>A. marginale</i>	<i>E. canis</i>	<i>A. marginale</i>	
	<i>E. chaffeensis</i>	<i>A. centrale</i>	<i>E. chaffeensis</i>	<i>A. centrale</i>	
	<i>E. ewingii</i>	<i>A. ovis</i>	<i>E. ewingii</i>	<i>A. ovis</i>	
	<i>E. muris</i>		<i>E. muris</i>		
	<i>E. equi</i>			<i>A. phagocytophilum</i>	
	<i>E. phagocytophila</i>				
	Agente da HGE				
	<i>E. bovis</i>			<i>A. bovis</i>	
	<i>E. platys</i>			<i>A. platys</i>	
	<i>E. risttici</i>				<i>N. risttici</i>
	<i>E. senettsu</i>				<i>N. senettsu</i>



## **2.2 *Anaplasma platys***

### **2.2.1 Posição taxonômica**

A atual posição taxonômica de *Anaplasma platys*, agente etiológico da Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina, está descrita a seguir:

Império: Prokaryota (Cavalier-Smith, 2002)

Reino: Bacteria (Cavalier-Smith, 2004)

Filo: Pseudomonadota (Garrity *et al.*, 2005) Oren; Garrity, 2021

Classe: Alphaproteobacteria (Garrity; Bell; Lilburn, 2005)

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

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

Gênero: *Anaplasma* (Theiler, 1910) Dumler *et al.*, 2001

Espécie: *Anaplasma platys* (French; Harvey, 1983) Dumler *et al.*, 2001

Etimologia (LPSN, 2023):

*Anaplasma*, “coisa (bactéria) sem forma”; *platys*, “que infecta plaquetas”.

### **2.2.2 Ciclo biológico e transmissão**

O ciclo biológico de todas as espécies do gênero *Anaplasma* ainda não foi completamente estudado (Atif *et al.*, 2021), mas sabe-se que inclui estágios de reprodução em carrapatos ixodídeos e hospedeiros vertebrados (Rikihisa, 1991). As bactérias são ingeridas pelo carrapato durante o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados, e passam por um primeiro ciclo de replicação no intestino médio, de onde migram para as glândulas salivares, onde ocorre um segundo ciclo de replicação. A transmissão ocorre durante um novo repasto sanguíneo no próximo hospedeiro vertebrado, quando as bactérias são inoculadas com a saliva do carrapato (Rar; Golovljova, 2011).

O papel dos carrapatos na transmissão de outras espécies do gênero *Anaplasma* e o desenvolvimento das bactérias em seus tecidos está bem estabelecido (Kocan; de la Fuente; Cabezas-Cruz, 2015), sendo reconhecidos um estágio vegetativo, as formas reticuladas, e um

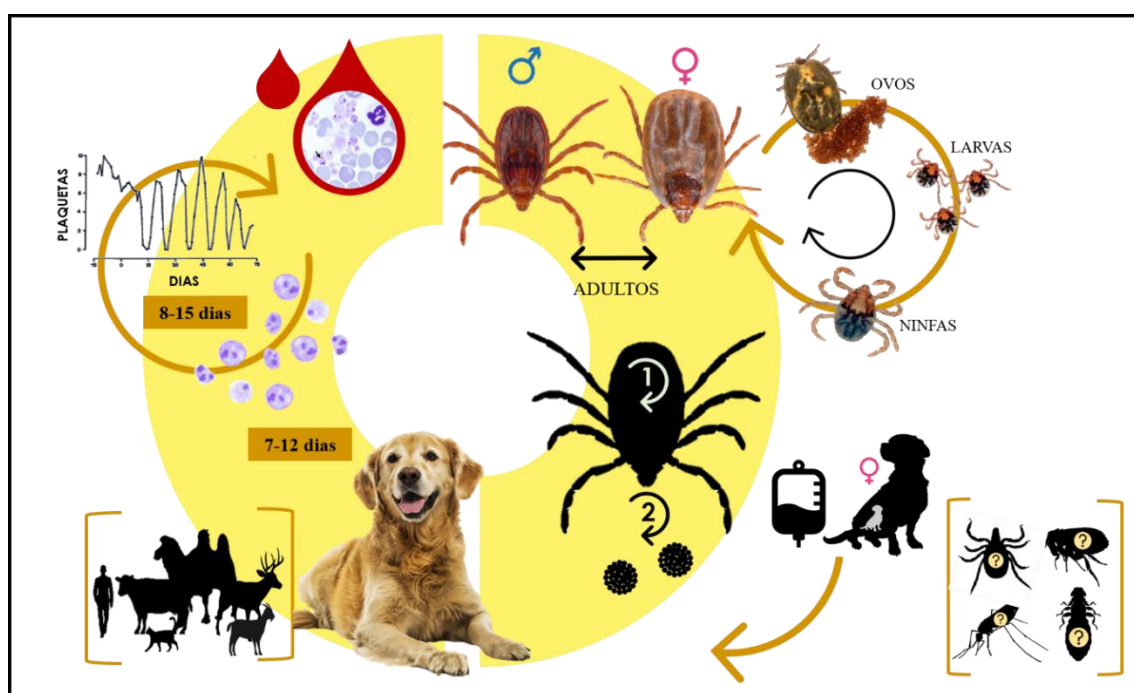
estágio infectante, as formas densas (Kocan *et al*, 2003), porém, estas são informações ainda não determinadas definitivamente para *A. platys*.

O cão doméstico é o hospedeiro vertebrado mais comum de *A. platys*, no qual apresenta tropismo para plaquetas (Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; Rikihisa, 1991; Almosny; Massard, 2002; Battilani *et al*, 2017), também já sendo descrita em promegacariócitos e megacariócitos (de Tommasi *et al*, 2014). Plaquetas parasitadas podem ser vistas na circulação após um período pré-patente de 7 a 12 dias, sendo o maior percentual observado na primeira parasitemia após a infecção. Poucos dias após a parasitemia inicial, a contagem de plaquetas cai drasticamente, e os organismos não são mais observados. As contagens de plaquetas retornam ao normal em poucos dias e então são observados episódios recorrentes de parasitemias seguidos de trombocitopenia, em “ciclos” que se repetem em média a cada 11 dias (Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; Harvey, 2012).

Embora o cão tenha sido considerado por muito tempo o único hospedeiro de *A. platys*, tem sido demonstrado, nas últimas décadas, um espectro mais amplo de hospedeiros (Rar; Tkachev; Tikunova, 2021), com relatos de infecção em felinos, bovinos, caprinos, camelos e cervídeos (Chochlakis *et al*, 2009; Lima *et al*, 2010; Li *et al*, 2015; Li *et al*, 2016; Guimarães *et al*, 2019; André *et al*, 2020). A infecção também já foi diagnosticada em seres humanos, com quadros clínicos de severidade variável, o que destaca o potencial zoonótico do agente (Maggi *et al*, 2013; Arraga-Alvarado *et al*, 2014; Breitschwerdt *et al*, 2014).

O carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, é o principal vetor implicado na transmissão de *A. platys*, devido à sobreposição na distribuição de *R. sanguineus* e infecções por *A. platys*, detecção do DNA de *A. platys* em carrapatos ingurgitados e não ingurgitados coletados a campo e ao fato de que os cães são os hospedeiros primários tanto de *R. sanguineus* quanto de *A. platys* (Melo *et al*, 2015; Snellgrove *et al*, 2020). Entretanto, sua competência vetorial não está firmemente estabelecida (Simpson *et al*, 1991), embora já tenha sido demonstrada sua capacidade de transmissão transestadial, de larva para ninfa e ninfa para adulto, em condições de campo (Aktas; Ozubek, 2017). Atualmente sabe-se que *R. sanguineus* consiste em um complexo de diferentes espécies, cujas diferenças biológicas ou entre cepas podem afetar a competência vetorial de *R. sanguineus* s.l. para *A. platys* (Dantas-Torres *et al*, 2015). Por outro lado, a competência vetorial de *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto já foi documentada, fornecendo inclusive evidências de transmissão transovariana e transmissão horizontal (Snellgrove *et.al.*, 2020).

Além de *R. sanguineus*, o DNA de *A. platys* já foi amplificado de carrapatos das espécies *Dermacentor auratus* (Parola *et al*, 2003), *Haemaphysalis longicornis* e *Ixodes persulcatus* (Kim *et al*, 2006), além de piolhos da espécie *Heterodoxus spiniger* (Brown *et al*, 2005), mosquitos da espécie *Anopheles sinensis* (Wen-Ping *et al*, 2016) e pulgas das espécies *Ctenocephalides felis* e *Pulex irritans* (Pérez-Tanoira *et al*, 2019). Se estes ectoparasitas exercem algum papel na transmissão de *A. platys*, ainda não está claro. A transmissão através da inoculação de sangue infectado (Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; Gaunt *et al*, 2010) e a transmissão vertical, de cadelas infectadas para suas ninhadas (Matei *et al*, 2017), já foram descritas. Um resumo dos aspectos biológicos de *A. platys* pode ser encontrado na Figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática do ciclo biológico de *A. platys*. Com informações de Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; Brown *et al*, 2005; Gaunt *et al*, 2010; Harvey, 2012; Wen-Ping *et al*, 2016; Matei *et al*, 2017; Pérez-Tanoira *et al*, 2020; Snellgrove *et al*, 2020.

## 2.3 Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina

### 2.3.1 Distribuição e epidemiologia

*Anaplasma platys* é um patógeno de distribuição mundial (Rimaszewska; Grenda, 2008; Atif *et al*, 2021). Relatos de casos da trombocitopenia cíclica infecciosa canina podem ser

encontrados em países como Estados Unidos, Grécia, Taiwan, Espanha, Sul da China, Austrália, Tailândia e Venezuela (Harrus; Waner, 2011). Relatos da infecção por *A. platys* em todos os continentes, exceto a Antártida, detectada por diferentes técnicas, apontam que a prevalência varia entre 0,4% a 70,5% (Atif, 2016). No entanto, sua incidência notável ocorre em áreas subtropicais e tropicais, como na América do Sul, onde o carrapato *R. sanguineus* é identificado como o vetor (Chomel, 2011).

*Anaplasma platys* foi observada em cães em todas as regiões do Brasil. No Rio de Janeiro, há relatos de prevalência em cidades da mesorregião Metropolitana, porém, não foram encontrados dados acerca da prevalência na mesorregião do Sul Fluminense (Quadro 2). É comum a coinfecção com outros agentes transmitidos por carrapatos, como *Ehrlichia canis* e *Babesia vogeli*, sendo o carrapato do cão, *R. sanguineus*, possivelmente o vetor para essas três espécies (Costa, 2015).

**Quadro 2.** Detecção de *A. platys* em cães de diferentes regiões do Brasil.

<b>Região</b>	<b>Prevalência</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
<b>Norte</b>			
Belém – PA	23,1%	PCR	Brandão <i>et al</i> , 2019
<b>Nordeste</b>			
Recife – PE	55,0%	nPCR	Ramos <i>et al</i> , 2009
João Pessoa – PB	13,0%	PCR	Almeida, 2017
Mossoró – RN	22,9%	Esfregaço sanguíneo	Oliveira, 2019
Patos – PB	40,0%	Esfregaço sanguíneo	Silva <i>et al</i> , 2020
<b>Centro-Oeste</b>			
Cuiabá – MT	9,1%	PCR	Witter <i>et al</i> , 2013
Campo Grande – MS	17,0%	nPCR	Soares <i>et al</i> , 2017
<b>Sudeste</b>			
Belo Horizonte - MG	11,7%	PCR	Costa-Júnior, 2007
Rio de Janeiro – RJ	15,8%	PCR	Ferreira <i>et al</i> , 2007
Região dos Lagos - RJ	2,6%	Esfregaço sanguíneo	Accetta, 2008
Ribeirão Preto – SP	14,9%	nPCR	Santos <i>et al</i> , 2009
Maricá – RJ	3,8%	PCR	Xavier, 2011
Viçosa - MG	4,0%	PCR	Oliveira, 2015
Microrregião de Itaguaí – RJ	17,6%	qPCR	Silva, 2016a
Alegre – ES	2,0%	nPCR	Cardinot, 2017

**Quadro 2.** Continuação.

Sul			
Porto Alegre – RS	13,6%	nPCR	Lasta, 2011
Pelotas – RS	7,9%	nPCR	Krause <i>et al</i> , 2016
Pato Branco – PR	32,9%	PCR	Ribeiro <i>et al</i> , 2017
Cascavel e Toledo – PR	18,3%	PCR	Bahiense <i>et al</i> , 2020
Londrina – PR	15,1%	PCR	Paschoal <i>et al</i> , 2020

Comumente, há coinfeção por *A. platys* e *Ehrlichia canis*, com estudos apontando a presença significativa de ambos os patógenos, com taxas de ocorrência que variam de 4,8% no extremo sul do Brasil a 70,9% na região Centro-Oeste, dependendo da localização geográfica e da população canina sob investigação (Bulla *et al.*, 2004; Dagnone *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2011, Saito *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2009; Ueno *et al.*, 2009).

Há pouca informação disponível sobre a epidemiologia e fatores de risco para infecção por *A. platys* (Atif *et al*, 2021), e no Brasil, por ser um país de dimensões continentais, há grande divergência acerca da prevalência e fatores de risco em diferentes regiões (Cardinot, 2017). Lasta (2011), Costa-Júnior *et al* (2013) e Paschoal *et al* (2020) não identificaram fatores de risco sexuais, etários ou raciais no Rio Grande do Sul, em Minas Gerais e no Paraná, respectivamente. O mesmo foi indicado por Sainz *et al* (2015) para cães do continente europeu. No Mato Grosso e no Paraná, respectivamente, Witter *et al* (2013) e Ribeiro *et al* (2017) não observaram associação de idade e sexo com a infecção por *A. platys*.

A faixa etária (igual ou inferior a 6 meses) foi um fator associado à maior positividade para *A. platys*, enquanto não houve diferença significativa quanto ao sexo e definição racial, em estudo conduzido por Silva (2016a) no Rio de Janeiro. Presença de ectoparasitos, infestação por carrapatos, não domesticação (cães errantes), áreas rurais, forma de criação (cães presos no intra e peridomicílio) e ausência de abrigo foram associados com maior positividade por *A. platys* (Costa-Júnior *et al*, 2013; Silva, 2016a; Brandão *et al*, 2019).

### 2.3.2 Patogenia e sinais clínicos

A patogenia da doença está relacionada com a infecção das plaquetas. No hospedeiro canino, *A. platys* entra nas plaquetas por endocitose e se replica por fissão binária no interior de um vacúolo, resultando na formação de inclusões denominadas mórulas (De Tommasi *et al*,

2014). Na parasitemia inicial, após um período de incubação de 8 a 15 dias, observa-se o mais elevado percentual de plaquetas parasitadas na circulação, seguido por episódios cíclicos de parasitemia e trombocitopenia. A natureza cíclica destes episódios tende a diminuir com o tempo, resultando em trombocitopenia discreta e de resolução lenta, com ocorrência esporádica de microrganismos em plaquetas (Harvey, 2012).

Acredita-se que a trombocitopenia ocorre por fagocitose das plaquetas por macrófagos, decorrente da injúria direta pela replicação parasitária, nos episódios iniciais, e da remoção imunomediada induzida pela opsonização por anticorpos anti-plaquetários, nos episódios subsequentes de trombocitopenia (Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; De Tommasi *et al*, 2014). Na medula óssea, hiperplasia megacariocítica pode ser observada concomitantemente a esse quadro, caracterizando a trombocitopenia como regenerativa (Gaunt; Baker; Babin, 1990; De Tommasi *et al*, 2014).

Cães infectados podem apresentar ainda um decréscimo na concentração sérica e na capacidade total de ligação de ferro, com estoques medulares de ferro normais ou aumentados, um cenário compatível com a síndrome da anemia da inflamação (Baker; Gaunt; Babin, 1988). Possíveis lesões patológicas induzidas por *A. platys* em cães infectados incluem pneumonia intersticial leve, hiperplasia linfóide e plasmocitose em linfonodos e baço, hiperplasia multifocal das células de Kupffer no fígado e infiltrados linfoplasmocíticos nos rins (Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; Baker *et al*, 1987; Nair *et al*, 2016).

A Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina é geralmente assintomática ou subclínica (Cordeiro *et al*, 2020; Rar; Tkachev; Tikunova, 2021). Quando presentes, os sinais clínicos mais comuns incluem hipertermia leve, linfadenopatia, petéquias e equimoses (Harvey, 2012; Diniz; Aguiar, 2022). Anorexia, perda de peso, febre, letargia e quadros hemorrágicos foram descritos na Europa, onde também foi observada uma taxa de mortalidade de 23,9% e recuperação completa em apenas 38,1% dos casos, sugerindo a existência de cepas mais patogênicas nesta região (Bouzouraa *et al*, 2016). A enfermidade é potencialmente fatal, especialmente se o paciente for submetido a procedimentos cirúrgicos ou sofrer algum trauma (Diniz; Aguiar, 2022).

Os sinais clínicos induzidos pela infecção por *A. platys* podem ser amplos, inespecíficos e se sobrepõem aos da infecção por outros patógenos transmitidos por carrapatos, como *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, portanto, o diagnóstico pode ser auxiliado pela avaliação de vários parâmetros clínico-patológicos acessíveis e rotineiramente disponíveis (Harvey, 2012; Lara *et al*, 2020).

### 2.3.3 Diagnóstico

Mórulas de *A. platys* podem ser observadas no interior de plaquetas em esfregaços sanguíneos, embora seja pouco sensível em parasitemias baixas ou ausentes no momento da realização do exame (Atif, 2016). Além disso, resultados falso-positivos podem acontecer se outras inclusões forem confundidas com o microrganismo, de forma que a confiabilidade do diagnóstico é altamente dependente da experiência do examinador (Harvey, 2012; Silaghi *et al*, 2017). Embora o exame microscópico seja o de execução mais rápida e de menor custo, é também o menos sensível, devido ao caráter cíclico da trombocitopenia e baixo percentual de células infectadas (Silaghi *et al*, 2017). A sensibilidade do método parasitológico é maior na fase aguda da doença, quando o número de organismos circulantes é maior, mas um resultado negativo não exclui a infecção (Diniz; Aguiar, 2022). A partir do diagnóstico direto, foram observadas prevalências variadas no estado do Rio de Janeiro, sendo 14,5% na cidade do Rio de Janeiro (Ferreira *et al*, 2007), 0,96% na Região dos Lagos (Acetta, 2008), 1,9% em Maricá (Xavier, 2011), e 25,3% em Itaguaí (Silva, 2016a).

Os métodos moleculares possuem as vantagens de garantirem diagnóstico específico e mais sensível que o exame microscópico, caracterizarem infecções ativas e permitirem quantificar a carga parasitária (Sainz *et.al.*, 2015). Além disso, viabilizam o sequenciamento de DNA para a posterior identificação de espécies, cepas ou variantes, fornecendo assim informações epidemiológicas valiosas (Diniz; Aguiar, 2022). Técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), quando executadas apropriadamente, são as alternativas mais sensíveis disponíveis para o diagnóstico da infecção por *A. platys* (Harvey, 2012). Sangue total não coagulado e capa leucocitária são as melhores amostras, entretanto, é crucial que sejam obtidas durante a fase aguda dos sintomas e antes do início de qualquer protocolo terapêutico (Silaghi *et al*, 2017). Ferreira *et al* (2007), ao comparar a PCR com o diagnóstico morfológico, não encontraram diferenças significativas entre as duas técnicas, ao contrário de Ramos *et al* (2009), que identificaram uma proporção significativamente maior de resultados falso-negativos no diagnóstico morfológico. Tal observação foi corroborada por Lara *et al* (2020), que identificaram uma concordância mínima entre PCR e a observação de mórulas no esfregaço. No estado do Rio de Janeiro, infecção por *A. platys* foi identificada por técnicas moleculares com prevalências de 15,8% (Ferreira *et al*, 2007), 3,8% em Maricá (Xavier, 2011), e 14,0% em Itaguaí (Silva, 2016a).

Técnicas sorológicas também estão disponíveis, porém resultados positivos somente indicam exposição aos antígenos de *A. platys*, não sendo úteis para identificar infecção ativa a menos que haja documentação de soroconversão (Birkenheuer, 2013). Comumente, exames sorológicos tem resultados negativos durante a fase aguda, em média 1 a 2 semanas após a infecção, e altos títulos de anticorpos ainda podem ser detectados meses ou anos após a resolução do quadro clínico. Associar testes sorológicos e moleculares pode melhorar a precisão do diagnóstico das infecções por *A. platys* (Lara et al, 2020).

O desenvolvimento de testes rápidos, prontamente disponíveis para a realização em clínicas veterinárias, popularizou a testagem de cães para anticorpos anti-*Anaplasma* spp e anti-*Ehrlichia* spp (Allison; Little, 2013). A tecnologia SNAP®, amplamente difundida nas clínicas veterinárias e líder isolada no mercado pet, incorpora etapas que facilitam a visualização e interpretação do resultado (O'Connor, 2015), e apresentou sensibilidade e especificidade de 83,3% e 98,7%, respectivamente, para o diagnóstico de anticorpos anti-*A. platys* (Liu et al, 2018). Apesar da vantagem de um resultado rápido, não é possível quantificar anticorpos nem diferenciar *A. platys* de outras espécies da mesma família, devido a possibilidade de reações cruzadas. Portanto, na ausência de outras anormalidades clinico-patológicas compatíveis, resultados positivos em testes rápidos não devem ser utilizados como única ferramenta diagnóstica (Diniz; Aguiar, 2022).

## **2.4 Diversidade Genética de *Anaplasma platys***

Através de análises filogenéticas sistemáticas de espécies ou linhagens associadas a uma espécie, uma grande quantidade de informações pode ser obtida. Entretanto, quando se trata de *A. platys*, há pouca ou nenhuma informação na literatura elucidando as relações filogenéticas entre as cepas utilizando vários genes (Alhasan et al., 2021).

Os genes GroEsL (“heat-shock” operon), 23S rDNA, 16S rDNA, polinucleotídeo p44, e *gltA* (citrato sintase) são também utilizados como alvos em métodos de diagnóstico e em estudos filogenéticos, além de serem úteis na caracterização de cepas de *A. platys* (Silva et al., 2016b).

O gene 16S rDNA 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 (Baldrige et al., 2010).



Na análise filogenética de *A. platys*, o gene groEL é constantemente utilizado (Guo *et al.*, 2019; Selmi *et al.*, 2019; Zobba *et al.*, 2015), onde sequências groEL altamente conservadas foram detectadas em cães de diferentes regiões e camelos bactrianos da China, formando um conjunto comum. Além disso, isolados com sequências atípicas da Itália e do Norte da África são abordadas como estirpes semelhantes a *A. platys*. A análise filogenética do gene groEL em *A. platys* e em cepas relacionadas demonstra que elas se agrupam como um conjunto monofilético composto por quatro subgrupos distintos: (i) *A. platys* típico de cães e camelos bactrianos; (ii) diversos isolados semelhantes a *A. platys* de cabras, ovelhas, bovinos, veados e gatos; (iii) dois isolados semelhantes a *A. platys* de bovinos; (iv) isolados semelhantes a *A. platys* de camelos (*Camelus dromedarius*) da Tunísia (Rar *et al.*, 2021).

Utilizando o gene *gltA* e 16S rDNA, Silva *et al.* (2016b) descrevem a ocorrência de três genótipos circulantes de *A. platys* em cães de Cuba, com algumas amostras tendo ancestralidade comum com o isolado da África, enquanto as outras amostras foram relacionadas a isolados de diferentes partes do mundo.

## **2.5 Alterações Hematológicas**

### **2.5.1 Trombocitopenia cíclica infecciosa canina**

*Anaplasma platys* se reproduz no interior dos vacúolos das plaquetas do sangue periférico e forma inclusões conhecidas como mórulas, que contêm uma ou mais subunidades. A maior parte das plaquetas com parasitas é observada durante o período inicial de parasitemia (Harvey; Simpson; Gaskin, 1978). As alterações laboratoriais são consequência deste modo de infecção.

Após alguns dias do surgimento de plaquetas infectadas, a contagem plaquetária diminui significativamente e, em geral, os microorganismos não são mais identificáveis. Em três a quatro dias, após um episódio de trombocitopenia, as plaquetas tendem a se recuperar para valores considerados normais (200.000 - 500.000 mm<sup>3</sup>). Essas fases ocorrem em intervalos de uma a duas semanas. Tanto a presença do agente patogênico nas plaquetas quanto a subsequente trombocitopenia ocorrem de forma cíclica (Machado *et al.*, 2010; Chomel, 2011; Dyachenko *et al.*, 2012; Harvey, 2015).

A trombocitopenia pode estar acompanhada de anemia normocítica normocrômica discreta, e reduções transitórias na leucometria podem ocorrer, podendo ou não caracterizar

leucopenia. Entretanto, em cães infectados por *Anaplasma platys* a trombocitopenia é o achado laboratorial mais comum. Outros resultados laboratoriais incluem hiperproteinemia e hipoalbuminemia (Harvey, 2012; Witter *et al.*, 2013; Tateishi *et al.*, 2015; Dantas-Torres; Otranto, 2016).

Os achados hematológicos, porém, são inespecíficos e comuns a outras enfermidades, o que destaca a necessidade de recorrer a técnicas diagnósticas com maior especificidade a fim de caracterizar a infecção de forma assertiva (Krause *et al.*, 2016).

### **2.5.2 Diagnóstico diferencial com outras hemoparasitoses**

Os achados hematológicos na infecção por *A. platys*, além de inespecíficos, são comuns a outras hemoparasitoses caninas comuns, a Erliquiose e a Babesiose, caracterizando-as como diagnósticos diferenciais importantes. Na Erliquiose, os achados laboratoriais mais frequentes incluem a anemia normocítica normocrômica não regenerativa, juntamente com a redução no número de leucócitos e plaquetas (Garcia-Navarro, 2005). Observa-se uma diminuição nas plaquetas a partir da segunda semana após a infecção, mantendo-se em níveis reduzidos durante a fase aguda e crônica da doença (Oliveira *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004). A trombocitopenia é a descoberta hematológica predominante em indivíduos com Erliquiose Monocítica Canina (Harrus, Waner, Neer, 2012).

Na fase subclínica da doença, é possível observar neutropenia absoluta (Codner, Farris-Smith, 1986), enquanto na fase crônica, a característica é a pancitopenia devido à hipoplasia e supressão da medula óssea (Harrus, Waner, Neer, 2012). Durante a fase aguda, podem ocorrer variações que vão desde trombocitopenia moderada a grave, anemia e uma leve diminuição na contagem global de leucócitos. Por outro lado, na fase subclínica, há trombocitopenia leve, uma redução na contagem total de leucócitos, uma diminuição no tamanho médio das células vermelhas, juntamente com um aumento nas concentrações médias de hemoglobina corpuscular (Asgarali *et al.*, 2012).

Quanto à babesiose canina, duas espécies, *B. gibsoni* e *B. canis*, são as principais espécies envolvidas (Lobetti, 1998), sendo a última delas subdividida em três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* e *B. canis rossi* (Carret *et al.*, 1999). A condição é caracterizada como uma sepse causada por protozoários, que ocorre em conjunto com uma resposta inflamatória generalizada do organismo hospedeiro. A infecção desencadeia um processo de destruição citotóxica das hemácias, mediado por anticorpos. Os autoanticorpos são

direcionados contra os componentes das membranas das hemácias infectadas e não infectadas, resultando em hemólise dentro e fora dos vasos sanguíneos, originando frequentemente anemia hemolítica e trombocitopenia, que estão frequentemente associadas ao nível de parasitemia (Birkenheuer, 2015; Galán *et al.*, 2018).

Além da destruição imunomediada, diversos mecanismos parecem contribuir para a hemólise observada. Essa situação pode ocorrer devido à lise direta das hemácias, causada pela reprodução dos parasitas no interior das células, ou devido à ligação de anticorpos às membranas celulares das hemácias, exibindo antígenos do parasita, levando à ativação do complemento (Birkenheuer, 2015; Baneth, 2019).

Animais infectados com parasitas da *Babesia* apresentam uma variedade de sintomas clínicos. De forma geral, a doença pode ser caracterizada por anemia progressiva, febre, trombocitopenia e um aumento significativo do baço (Salem; Farag, 2014; Kuttler, 2018; Schetters, 2019). A trombocitopenia é geralmente considerada um fenômeno mediado pelo sistema imunológico, embora o consumo e a retenção de plaquetas também possam desempenhar um papel (Jefferies *et al.*, 2007)

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Áreas de Estudo**

As amostras utilizadas no estudo foram obtidas de duas Mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, a saber: Mesorregião Metropolitana do Rio de Janeiro e Mesorregião do Sul Fluminense. A Mesorregião Metropolitana reúne 30 municípios que somam uma área de 10.263 km<sup>2</sup>, possui altitude média de 177 m e clima predominantemente tropical. A Mesorregião do Sul Fluminense, por sua vez, é composta por 14 municípios que ocupam uma área de 7.966 km<sup>2</sup>, possui altitude média de 357 m e clima predominantemente subtropical. Juntas, as duas mesorregiões representam aproximadamente 42% do território do estado (Fundação CEPERJ, 2019; 2021; IBGE, 2023.).

Quanto ao processamento das amostras, a avaliação hematológica foi realizada em laboratório comercial de análises clínicas veterinárias (Labocani – Laboratório Clínico Veterinário), no município de Paracambi. Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), enquanto o sequenciamento e análise filogenética foram realizados no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LBioMol), ambos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ.

#### **3.2 Considerações Éticas**

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/ UFRRJ) sob o número de protocolo 7340040222 (Anexo A). Além disso, os tutores de cães participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) informando as características do estudo (Anexo B).

### 3.3 Amostragem e Avaliação Hematológica

Entre os meses de janeiro de 2022 e abril de 2023, foram obtidas amostras de sangue total de cães trombocitopênicos, residentes em uma das duas mesorregiões supracitadas, independente da raça, sexo e idade dos indivíduos. As amostras foram obtidas em parceria com laboratório veterinário de análises clínicas e coletadas durante o atendimento clínico dos animais, acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA e sob temperatura de refrigeração até o momento da avaliação hematológica. A quantidade mínima de amostras necessárias à realização do estudo foi determinada a partir da fórmula a seguir (Agragonik; Hirakata, 2011):

$$n = \frac{p(1-p)Z^2}{\varepsilon^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra; p = prevalência esperada; Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança estabelecido;  $\varepsilon$  = margem de erro (intervalo de confiança).

Na ausência de prevalência conhecida para toda a área do estudo, considerou-se a média das prevalências descritas por Ferreira *et al* (2007), Silva (2016a) e Xavier (2011), definindo uma prevalência esperada de 11,4%. Admitindo-se nível de confiança de 95% ( $Z = 1,96$ ) e margem de erro 5%, o número mínimo de amostras obtido foi 150.

Para a avaliação hematológica quantitativa foi utilizado o analisador hematológico Hemacounter Vet (Vytra Diagnósticos®, São Paulo/ SP, Brasil), um equipamento automatizado baseado em impedância para as contagens celulares (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e colorimetria para dosagem de hemoglobina. Como controle de qualidade do analisador, o hematócrito foi avaliado pela técnica do microhematócrito, conforme descrito por Brazzell (2013). A partir de uma gota do sangue utilizado para preencher o capilar de microhematócrito, foi confeccionado um esfregaço para cada amostra, seguindo o proposto por Lopes, Biondo e Santos (2007a).

As lâminas foram coradas com uma solução comercial pronta para uso (Panótico Rápido - Laborclin®, Pinhais/ PR, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Nos esfregaços sanguíneos foi realizada a contagem diferencial de leucócitos, conforme Lopes, Biondo e Santos (2007b), a estimativa do número médio de plaquetas, conforme Stockham e Scott (2011), a avaliação qualitativa das células e a pesquisa de inclusões morfolologicamente compatíveis com *Anaplasma platys*. As avaliações microscópicas foram realizadas por microscopia óptica, em aumento de 1.000x (L3000T, Labor Import®, Osasco/ SP, Brasil). A

avaliação hematológica incluiu ainda a concentração de proteína plasmática total, que foi estimada por refratometria de acordo com Thrall e Weiser (2006).

Após a avaliação hematológica, uma alíquota de cada amostra foi separada e encaminhada ao Laboratório de Doenças Parasitárias, para realização das análises moleculares.

### **3.4 Extração de DNA e Verificação do Gene Endógeno**

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada através de kit comercial (WizardGenomic DNA Purification Kit - Promega®), de acordo com as instruções do fabricante, a partir de 300 µL de sangue total. Ao final do processo de extração, as amostras de DNA obtidas foram acondicionadas em microtubos de polipropileno, identificadas, dispostas em caixas de fibra de papelão e armazenadas em freezer -20°C até o momento das análises moleculares.

Para atestar a ausência de inibidores da PCR nas amostras extraídas, verificou-se a presença de DNA amplificável por meio de uma PCR convencional que amplifica um fragmento de 400 pb do gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), um gene endógeno de mamíferos envolvido no metabolismo de carboidratos. Foram utilizados os oligoiniciadores GAPDH-F (5' CCTTCATTGACCTCAACTACAT 3') e GAPDH-R (5' CCAAAGTTGTCATGGATGACC 3') (Birkenheuer; Levy; Breitschwerdt, 2003). O volume final da reação foi de 25 µL contendo: 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases, 5 µL de tampão da enzima 5X (Green GoTaq®, Promega®), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (MgCl<sub>2</sub> Solution Promega®), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 2 µL de cada iniciador a 10 µM (GAPDH-F e GAPDH-R), 0,2 µL de Taq DNA polymerase a 1U (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega®) e 2 µL de DNA genômico. Água ultrapura livre de DNases foi utilizada como controle negativo.

A amplificação foi realizada em termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®, São Paulo/SP), observando os seguintes padrões de termociclagem: 95°C por 2:30 minutos, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 25 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Apenas as amostras onde o gene GAPDH foi amplificado foram submetidas às análises moleculares para pesquisa de agentes específicos.

### 3.5 Detecção Molecular de *Babesia* sp e *Ehrlichia* sp

De forma a viabilizar a correlação entre a infecção por *Anaplasma platys* e os achados hematológicos, avaliou-se concomitantemente a presença de *Babesia* sp e *Ehrlichia* sp. Como as infecções por *Babesia* sp e *Ehrlichia* sp podem resultar nas mesmas alterações hematológicas que *A. platys*, amostras que também foram positivas para esses agentes foram excluídas desta avaliação.

A presença de *Babesia* sp foi verificada mediante nested-PCR, tendo como alvo o gene *18S rRNA*. Foram utilizados, na primeira reação, os oligoiniciadores BTF1 (5'GGCTCATTACAACAGTTATAG 3') e BTR1 (5'CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC 3'), amplificando aproximadamente 930pb, e BTF2 (5' CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC 3') e BTR2 (5' GGACTACGACGGTATCTGATCG 3') na segunda reação, amplificando aproximadamente 800pb (Jefferies; Ryan; Irwin, 2007). Na primeira reação, 3 µL de DNA genômico foram adicionados a 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases, 5 µL de tampão da enzima 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (MgCl<sub>2</sub> Solution Promega®), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 2 µL de cada iniciador a 10 mM (BTF1 e BTR1) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase a 1 U (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega®), somando um volume final de 25 µL. Na segunda reação, 2 µL do produto amplificado da primeira reação foi adicionado a 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases, 5 µL de tampão da enzima 5X (Green GoTaq®, Promega®), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (MgCl<sub>2</sub> Solution Promega®), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 2 µL de cada iniciador a 10 mM (BTF2 e BTR2) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase a 1 U (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega®), somando um volume final de 25 µL. Uma amostra sabidamente positiva e sequenciada para *Babesia* spp e água ultrapura livre de DNases, aplicada dentro e fora do fluxo laminar, foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

A amplificação foi realizada em termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®, São Paulo/SP). Para a primeira reação, as condições de termociclagem foram: 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq Polimerase), seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 58°C por 20 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão) e um ciclo a 72 °C por 5 minutos (extensão final). Para a segunda reação, as condições de termociclagem foram: 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq Polimerase), seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 62°C por 20 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão) e um ciclo a 72°C por 5 minutos

(extensão final).

A presença de *Ehrlichia* sp foi verificada mediante PCR convencional que amplifica um fragmento do gene *dsb*. Foram utilizados os oligoiniciadores dsbF2 (5' CTTAGTAATACTAGTGGCAAGTTTTCCAC 3') e dsbR2 (5' GTTGATAATATCAGTGCACCACCG 3') (Cabezas-Cruz *et al*, 2012). O volume final da reação foi de 25 µL contendo: 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases, 5 µL de tampão da enzima 5X (Green GoTaq®, Promega®), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (MgCl<sub>2</sub> Solution Promega®), 2 µL de dNTP a 200 mM, 2 µL de cada oligoiniciador (dsbF2 e dsbR2) a 10 pmol/µL, 0,2 µL de Taq DNA polimerase a 1U (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega®) e 2 µL de DNA genômico. Uma amostra obtida de um cultivo celular para *Ehrlichia* sp e água ultrapura foram utilizadas como controle positivo e controle negativo, respectivamente.

A amplificação foi realizada em termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®, São Paulo/SP), observando os seguintes padrões de termociclagem: 95°C por 2:30 minutos, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos

### 3.6 Detecção Molecular de *Anaplasma platys*

Para a pesquisa molecular de *Anaplasma platys*, foi realizada PCR convencional que amplifica um fragmento de 580pb do gene da citrato sintase (*gltA*). A citrato sintase é a primeira enzima do Ciclo do Ácido Tricarboxílico, que catalisa a condensação de oxaloacetato com acetil coenzima A para formar citrato, uma reação importante para o controle da taxa metabólica celular (Park *et al*, 1994).

Foram utilizados os oligoiniciadores gltA 84F (5'-TGGCGCAGTATACCCTTTTCTC-3') e gltA 69R (5'-AACAGCGACCGTGCGG-3') (Bezerra *et al*, 2016b). O volume final de reação foi 25 µL, contendo: 10,8 µL de água ultrapura livre de DNases, 5 µL de tampão da enzima 5X (Green GoTaq®, Promega®), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (MgCl<sub>2</sub> Solution, Promega®), 2 µL de dNTP a 200 mM, 1 µL de cada oligoiniciador (gltA 84F e gltA 69R) a 10 pmol/µL, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase a 1U (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega®) e 2 µL de DNA genômico. Uma amostra sabidamente positiva para *Anaplasma platys* e água ultrapura, livre de DNases, foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.



A amplificação foi realizada em termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil®, São Paulo/SP), observando os seguintes padrões de termociclagem: 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

### **3.7 Eletroforese e Visualização dos Resultados**

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®). A eletroforese foi realizada em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) a 75 volts (5V/cm) durante 90 minutos (Cuba Wide Mini-Sub® Cell GT; Fonte de alimentação PowerPac® Basic, Bio-Rad Laboratórios do Brasil®, São Paulo/SP).

Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,4 mg/mL) e visualizado através de transiluminador com luz ultravioleta K33-312A (Kasvi®, São José dos Pinhais/PR), em sistema de fotodocumentação L-PIX Sti (Loccus Biotecnologia®, Cotia/SP). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (100bp Ladder Plus, Ready-To-Use, M1071, Sinapse Inc®, São Paulo/SP).

### **3.8 Sequenciamento Genético e Análise Filogenética**

A partir dos produtos amplificados, 5 µL foram tratados com o reagente de purificação ExoSAP-IT® (GE Healthcare®, Chicago/ Illinois, EUA) conforme as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA foram sequenciados em ambas as direções utilizando o sequenciador automatizado modelo ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Waltham/ Massachusetts, EUA) no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular PPGCV/ UFRRJ. A ferramenta BLASTn foi utilizada para avaliar a similaridade entre as sequências do gene *gltA* obtidas com as sequências de *A. platys* disponíveis no GenBank. As sequências alinhadas com as sequências obtidas no presente estudo, suas origens e respectivos códigos de acesso podem ser observadas no Quadro 3.

**Quadro 3.** Sequências do gene *gltA* do GenBank alinhadas com as sequências obtidas no presente estudo. *Candidatus* *Anaplasma turritanum* foi utilizada como grupo externo.

<b>GLTA</b>	<b>Origem</b>	<b>Código de acesso</b>
<i>Candidatus</i> <i>Anaplasma turritanum</i>	Tunísia	MW296122.1
<i>Candidatus</i> <i>Anaplasma turritanum</i>	Tunísia	MW296120
<i>Anaplasma platys</i> RDC	Congo	AF478130
<i>Anaplasma platys</i> isolado AG049 Saraburi	Tailândia	OP270645
<i>Anaplasma platys</i> cepa S3	Caribe	CP046391
<i>Anaplasma platys</i> isolado AG018 Saraburi	Tailândia	OP270642
<i>Anaplasma platys</i> B42 Buriram	Tailândia	OP270646
<i>Anaplasma platys</i> AG003 Saraburi	Tailândia	OP270640
<i>Anaplasma platys</i> AG012 Saraburi	Tailândia	OP270641
<i>Anaplasma platys</i> isolado WSti2f	China	KR011928
<i>Anaplasma platys</i> Dog 4 Sicily	Itália	DQ525687
<i>Anaplasma platys</i> WScam12	China	KR011927
<i>Anaplasma platys</i>	Espanha	AY530807
<i>Anaplasma platys</i> cepa Miky Sicily	Itália	DQ525686
<i>Anaplasma platys</i> cepa Dog 9 Sicily	Itália	DQ525688
<i>Anaplasma platys</i>	França	AB058782
<i>Anaplasma platys</i> RP	Brasil	EU516387
<i>Anaplasma</i> sp. LuF9	Zâmbia	LC373037
<i>Anaplasma platys</i> isolado AG026	Tailândia	OP270643
<i>Anaplasma platys</i> isolado DSE	Filipinas	JN121381
<i>Anaplasma platys</i> isolado Okinawa	Japão	AY077620
<i>Anaplasma platys</i> isolado AG032 Saraburi	Tailândia	OP270644
<i>Anaplasma platys</i> clone Guangzhou-6	China	KC342665

O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado com as sequências obtidas neste estudo e sequências do GenBank utilizando o programa MAFFT, implementado no software Jalview v.2.11 (Kato; Standley, 2013, Waterhouse *et al*, 2009). O modelo evolutivo mais adequado foi determinado usando o MEGA versão 11, utilizando o critério bayesiano (Tamura; Stecher; Kumar, 2021). As relações filogenéticas foram estimadas usando a inferência filogenética por Máxima Verossimilhança (ML) com o programa PhyML, que está

implementado no SeaView v.5 (Gouy *et al*, 2021). O suporte estatístico dos clados foi medido por meio de uma busca heurística com 1000 replicatas de bootstrap.

### 3.9 Análise Estatística

Os dados numéricos obtidos na hematologia foram submetidos à estatística descritiva para a determinação dos valores máximos, mínimos, média aritmética e desvio-padrão. A normalidade dos dados quantitativos foi avaliada pelo teste Lilliefors. A sensibilidade e a especificidade da pesquisa de mórulas no esfregaço sanguíneo, frente à PCR, foram calculadas conforme Pereira (1995).

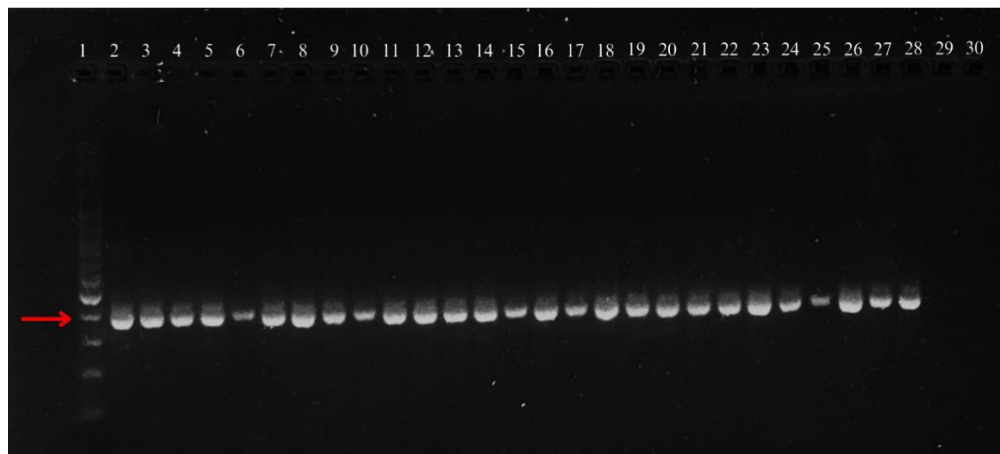
Na análise epidemiológica, as variáveis mesorregião, sexo, definição racial e faixa etária foram submetidas à análise pelo *Odds Ratio* para definir o risco de infecção para cada grupo avaliado.

O teste Mann-Whitney foi empregado para avaliar se houve diferença estatística significativa nos valores hematológicos entre os animais trombocitopênicos positivos e os negativos para *Anaplasma platys* pela PCR. Para avaliar se esses animais apresentaram um perfil específico de alteração hematológica (p.ex. anemia, eosinofilia, monócitos ativados) foi empregado o teste Qui-quadrado. Este teste também foi usado para avaliar se os resultados das PCR's apresentaram associação com os resultados do esfregaço sanguíneos. Além disso, esses resultados foram comparados para definir a concordância entre os métodos de diagnósticos através do teste *Kappa*.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Bioestat 5.3, adotando-se um valor de  $\alpha=0,05$  e intervalo de confiança de 95%.

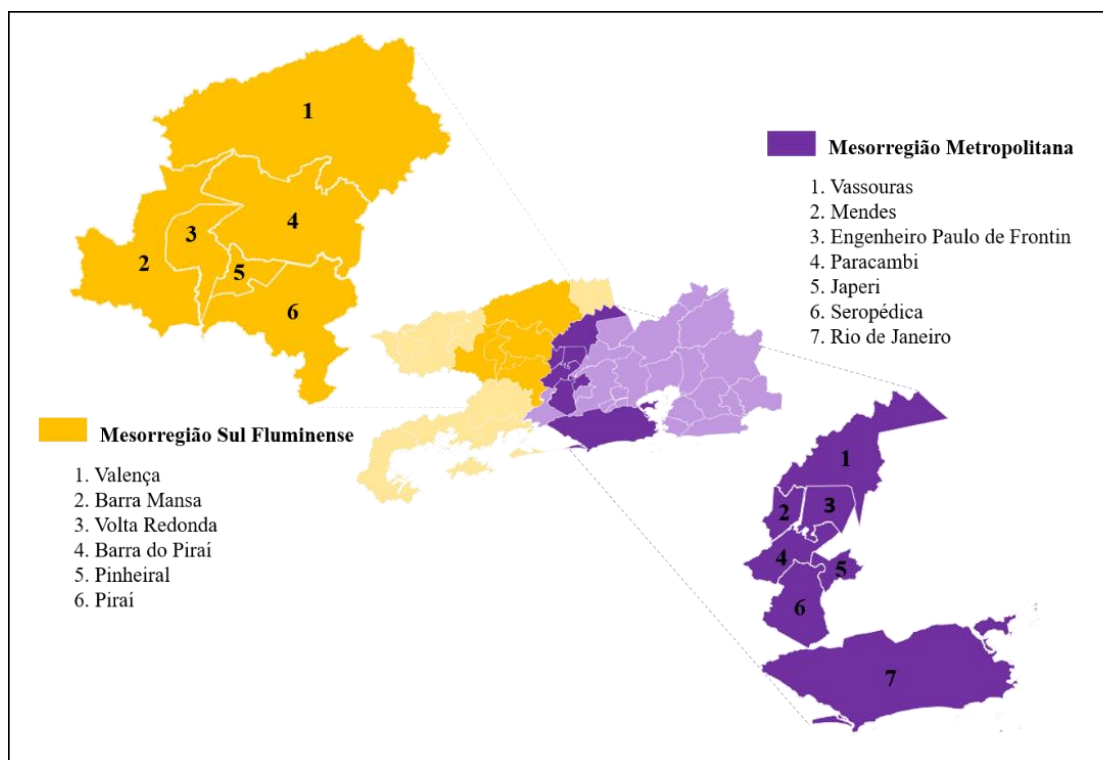
#### 4 RESULTADOS

Quatrocentas e quatro amostras amplificaram o gene *GAPDH* (Figura 2) e foram incluídas no estudo, das quais 400 foram obtidas por parceria com laboratório veterinário de análises clínicas, e 4 foram coletadas individualmente.



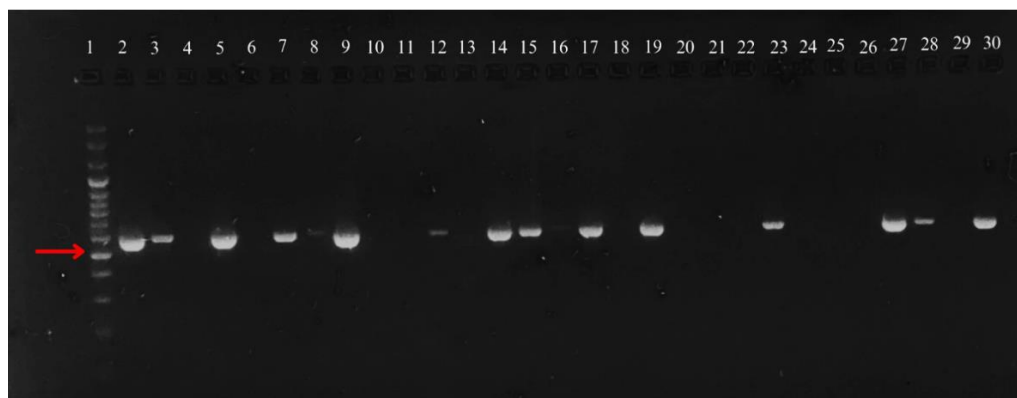
**Figura 2.** Representação dos produtos de PCR para o gene *GAPDH* (400 pb) de mamíferos (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinapse Inc®) e visualizados em transiluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2-28: Amostras positivas. Poço 29: Controle negativo.

Quanto à distribuição geográfica, 67,8% (274/404) das amostras vieram da Mesorregião Metropolitana, enquanto 32,2% (130/404) veio da Mesorregião do Sul Fluminense, especificamente das cidades indicadas na Figura 3.



**Figura 3.** Representação das mesorregiões do estudo, indicando as cidades de origem das amostras positivas para o gene *GAPDH*.

Das amostras testadas por PCR, 4,7% ( $n=19/404$ ) foram consideradas positivas para *Anaplasma platys* (Figura 4), sendo 73,7% ( $n=14/19$ ) oriundas da Mesorregião Metropolitana e 26,3% ( $n=5/19$ ) oriundas da Mesorregião do Sul Fluminense. Dentre as 19 amostras positivas, coinfeção foi identificada em quatro, sendo duas simultaneamente positivas para *Ehrlichia* sp e *Babesia* sp, uma positiva para *Ehrlichia* sp e uma positiva para *Babesia* sp. Dentre as amostras negativas para *A. platys*, 102 foram positivas para *Ehrlichia* sp e/ou *Babesia* sp. Estas amostras, bem como aquelas onde foi evidenciada coinfeção, foram excluídas da análise da correlação entre a positividade para *A. platys* e os resultados da avaliação hematológica.



**Figura 4.** Representação dos produtos de PCR para o gene *gltA* (580 pb) de *Anaplasma platys* (seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com DS View Nucleic Acid Stein (Sinaps Inc®) e visualizados em transluminador de luz UV. Poço 1: ladder. Poços 2, 3, 5, 7-9, 12, 14, 15, 17, 19, 23, 27, 28: Amostras positivas. Poços 4, 6, 10, 11, 13, 16, 20-22, 24-26: Amostras negativas. Poço 29: Controle negativo. Poço 30: Controle positivo.

As prevalências da infecção por *A. platys*, detectadas pela PCR, de acordo com a mesorregião e as variáveis dos animais positivos, podem ser vistas na tabela 1. Apenas o sexo mostrou diferença significativa, indicando um risco maior de infecção para animais machos.

**Tabela 1.** Análises descritiva e estatística das mesorregiões e variáveis de cães trombocitopênicos infectados por *Anaplasma platys*, diagnosticados através da PCR nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023.

Análise descritiva			Análise estatística		
Mesorregião	N	(%)	<i>Odds ratio</i>	p-valor	IC 95%
Metropolitana	274	5,1% (14/274)	1.35	0.757	0.47 – 3.82
Sul Fluminense	130	3,8% (5/130)			
Sexo					
Fêmea	198	2,0% (4/198)	3.81	0.024	1.24 – 11.68
Macho	206	7,3% (15/206)			
Definição racial					
SRD	198	4,0% (8/198)	1.34	0.703	0.53 – 3.40
Raça definida	206	5,3% (11/206)			
Faixa etária					
≤ 12 meses	101	6,9% (7/101)	1.81	0.342	0.691 – 4.72
> 12 meses	303	4,0% (12/303)			

N: Número de amostras testadas por PCR; (%): Percentual de positivos;

A avaliação dos resultados hematológicos quantitativos resultou em não normalidade. Quanto aos resultados dos animais positivos exclusivamente para *A. platys*, comparando com os resultados dos animais negativos para os hemoparasitas testados, observa-se na tabela 2 que apenas nos parâmetros Eritrócitos, Hemoglobina, Hematócrito e CHCM a diferença foi considerada significativa.

**Tabela 2.** Análises descritiva e estatística das mesorregiões e variáveis de cães trombocitopênicos infectados por *Anaplasma platys*, diagnosticados através da PCR nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023.

Parâmetro	Animais positivos (N=15)		Animais negativos (N=283)		valor de <i>p</i>
	Média ± DP	Mín. – Máx.	Média ± DP	Mín. – Máx.	
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /μL)	4,51 ± 1,5	2,43 - 7,63	5,57 ± 1,65	1,20 – 9,69	0.0159*
Hemoglobina (g/dL)	9,5 ± 3,4	4,8 - 15,7	11,8 ± 3,4	2,5 – 20,3	0.0095*
Hematócrito (%)	29,5 ± 10,1	15 – 48	36,1 ± 10,0	8 – 60	0.0146*
VCM (fL)	64,9 ± 3,3	60,6 – 72,1	65,3 ± 4,2	60,0 – 76,9	0.9975
CHCM (%)	32,0 ± 1,1	30,8 – 35,2	32,8 ± 1,2	30,8 – 36,0	0.0036*
Leucometria global (/μL)	11.026 ± 5.544	2.200 – 21.200	10.734 ± 6.261	500 – 38.000	0.6391
Basófilos (/μL)	0	0	0	0	1.0000
Eosinófilos (/μL)	296 ± 461	22 – 1908	442 ± 553	0 – 3.256	0.2690
Bastões (/μL)	41 ± 116	0 – 423	30 ± 98	0 – 730	0.9657
Segmentados (/μL)	8.644 ± 4.700	2.002 – 17.808	7.621 ± 5.147	0 – 33.060	0.2784
Linfócitos (/μL)	1.644 ± 976	154 – 3.534	2.188 ± 2.122	0 – 16.900	0.6657
Monócitos (/μL)	381 ± 277	22 – 970	430 ± 509	0 – 3.585	0.9951
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	108,9 ± 42,6	33,0 – 166,0	125,5 ± 94,0	19,0 – 120,0	0.4267
PPT (g/dL)	7,2 ± 2,0	4,4 – 11,8	7,9 ± 1,5	4,4 – 12,4	0.0701

\*Diferença estatística significativa entre animais positivos e negativos na PCR obtida pelo teste Mann-Whitney, adotando-se α=0.05.

Também foram estudadas as alterações hematológicas presentes nos cães positivos para *A. platys*, comparando-as com as alterações dos cães negativos, a fim de verificar sua relevância para o diagnóstico. A fim de caracterizar estas alterações, foram utilizados os intervalos de referência disponíveis em literaturas de referência (Jain, 1983; Rizzi; Meinkoth; Clinkenberd, 2010). Não foram observadas alterações qualitativas em eritrócitos. Associação significativa foi observada apenas para anemia e hipoproteinemia, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3.** Alterações hematológicas dos cães trombocitopênicos positivos e negativos para infecção por *A. platys*, diagnosticada através da PCR, nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023.

Alteração	Total		<i>A. platys</i>		Negativos		<i>P</i>
	n/N	(%)	n/N	(%)	n/N	(%)	
<b>Anemia*</b>	103/260	39,6	9/13	69,2	94/247	38,0	0.0251**
<b>Leucocitose</b>	45/298	15,1	3/15	20,0	42/283	14,8	0.5866
<b>Eosinofilia</b>	19/298	63,8	1/15	6,7	18/283	6,4	0.9623
<b>Neutrofilia</b>	59/298	19,8	4/15	26,7	55/283	19,4	0.4934
<b>Linfopenia*</b>	47/260	18,1	1/13	7,7	46/247	18,7	0.3182
<b>Monocitopenia*</b>	19/260	7,3	1/13	7,7	18/247	7,2	0.9564
<b>Pancitopenia</b>	38/298	12,6	2/15	13,3	36/283	12,7	0.9447
<b>Hipoproteinemia</b>	7/298	2,3	2/15	13,3	5/283	1,8	0.0039**
<b>Hiperproteinemia</b>	112/298	37,6	4/15	26,7	108/283	38,2	0.3703
<b>Monócitos ativados</b>	53/298	17,8	2/15	13,3	51/283	18,0	0.6436
<b>Macroplaquetas</b>	40/298	13,4	3/15	20,0	37/283	13,1	0.4432

\*Em animais não pancitopênicos; n: quantidade de animais onde a alteração foi observada; N: total de animais avaliados; (%): percentual de observação da alteração; *P*: valor de p.

\*\*Associação estatística significativa entre a infecção por *A. platys* e a respectiva alteração clínico-laboratorial, pelo teste Qui-quadrado utilizando  $\alpha=0.05$ .

Na tabela 4 verifica-se a sensibilidade e especificidade da pesquisa de inclusões morfollogicamente compatíveis com *A. platys* no esfregaço sanguíneo, frente à PCR, considerando a última como padrão-ouro.

A avaliação pelo teste Kappa demonstrou concordância fraca entre os resultados da PCR e do esfregaço sanguíneo ( $Kappa= 0,3639$ ;  $p=0,0001$ ). Quando comparados pelo teste qui-quadrado, não foi observada associação entre os resultados pelos dois testes ( $p=0.1998$ ).

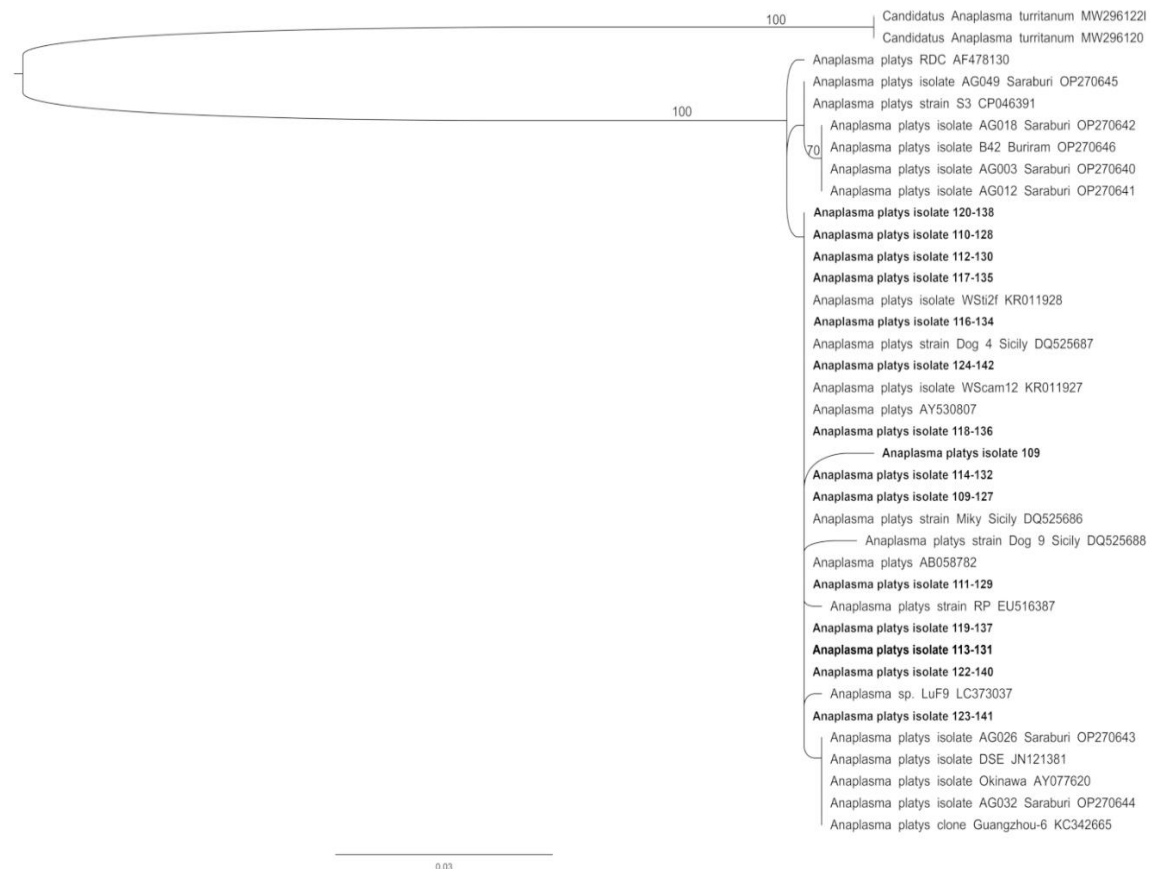


**Tabela 4.** Comparação entre PCR e diagnóstico direto e propriedades diagnósticas do diagnóstico direto de *Anaplasma platys* no esfregaço sanguíneo de cães trombocitopênicos, nas mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro, 2023.

	PCR Positiva	PCR Negativa	TOTAL
<b>Presença de inclusões</b>	6	6	12
<b>Ausência de inclusões</b>	13	379	392
<b>TOTAL</b>	19	385	404
<b>Propriedades Diagnósticas</b>			
<b>Sensibilidade</b>	31,6%		
<b>Especificidade</b>	98,4%		

Dentre as sequências do gene *gltA* obtidas neste estudo, catorze mostraram equivalência de 100% com amostras da China (KR011927, KR011928), Itália (DQ525687, DQ525686), Espanha (AY530807), e França (AB058782), e apenas uma (isolado 109) mostrou equivalência de 99,1%, com as mesmas amostras.

As análises filogenéticas do gene *gltA* das sequências do presente estudo formaram um clado único, a partir do alinhamento com as sequências do GenBank, com as amostras supracitadas e com amostras da Itália (DQ525688), (Tailândia (OP270643 e OP270644), China (KC342665), Japão (AY077620), Filipinas (JN121381), Zâmbia (LC373037) e Brasil (EU516387). Um segundo clado foi formado, agrupando outras amostras da Tailândia (OP270642, OP270646, OP270640, OP270641) com a cepa S3, do Caribe (CP046391), que foi utilizada como modelo para o primeiro sequenciamento do genoma de *A. platys* (Llanes; Rajeev, 2020) (Figura 5).



**Figura 5.** Análise filogenética de *Anaplasma platys* isolado de cães baseada na comparação da sequência do gene *gltA* (580 pares de base). Números de acesso do GenBank estão indicados ao lado de cada sequência. 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. *Candidatus Anaplasma turritanum* (MW296122 E MW 296120) foi usada como grupo externo. As amostras sequenciadas pertencentes ao presente estudo estão destacadas em negrito.

## 5 DISCUSSÃO

A prevalência de animais positivos neste estudo foi inferior à observada por Ferreira *et al* (2007), na cidade do Rio de Janeiro, e Silva (2016a), na microrregião de Itaguaí-RJ (formada pelos municípios Itaguaí, Seropédica e Mangaratiba), onde o DNA de *A. platys* foi detectado em 15,8% e 14% das amostras, respectivamente. Apesar da diferença da quantidade de amostras avaliadas, em ambos os trabalhos as amostras foram coletadas por conveniência, selecionando cães independentemente da idade, gênero e definição racial. Embora este também tenha sido um critério do presente estudo, optou-se por incluir somente cães trombocitopênicos. Considerando que a infecção por *A. platys* é frequentemente assintomática e provoca trombocitopenia de caráter cíclico (Cordeiro *et al*, 2020; Harvey; Simpson; Gaskin, 1978; Harvey, 2012), a menor prevalência observada pode estar relacionada à ausência de animais trombocitopênicos e provavelmente assintomáticos. Oliveira (2015), em Viçosa, Minas Gerais, também avaliou apenas animais trombocitopênicos, e identificou uma prevalência de 4%, semelhante à deste estudo. A menor prevalência em animais trombocitopênicos provavelmente se deve à própria característica da infecção, onde durante os episódios de trombocitopenia há menos parasitos circulantes (Harvey, 2012), resultando em menos DNA disponível para extração e identificação.

A ausência de diferença significativa entre as duas mesorregiões avaliadas indica que os animais estão igualmente expostos ao risco de contrair a infecção. Conclusão semelhante foi obtida por Silva (2016a), ao avaliar a prevalência de *A. platys* nos municípios da microrregião de Itaguaí. A menor prevalência na mesorregião do Sul Fluminense (3,8%) frente à mesorregião Metropolitana (5,1%) pode ser um reflexo do menor número de amostras avaliadas nessa área. Cento e trinta amostras foram avaliadas, quantidade inferior ao mínimo estabelecido (150) para determinação da prevalência, de forma que este resultado pode estar subestimado. Embora a mesorregião do Sul Fluminense esteja a uma maior altitude média, este não é um fator limitador para a presença do provável vetor, *Rhipicephalus sanguineus* sl (Silva *et al*, 2017). Isoladamente (por mesorregião) ou não, as prevalências identificadas no presente estudo estão dentro do intervalo descrito para a prevalência do agente no Brasil, que varia de 2% a 55% (Cardinot, 2017; Ramos *et al*, 2009). Esta grande amplitude de variação provavelmente se deve às características inerentes às diferentes regiões e tipos de população selecionadas para estudo, conforme sinalizado por Soares *et al* (2017).

No presente estudo, cães machos apresentaram maior risco de infecção por *A. platys*, em desacordo com o descrito por vários autores que relatam que o sexo dos animais não constitui um risco para a infecção (Lasta, 2011; Costa-Júnior *et al*, 2013; Sainz *et al*, 2015; Silva, 2016; Paschoal *et al*, 2020). Em estudo desenvolvido por Selim *et al* (2021), no Egito, o sexo foi um fator de risco, porém a prevalência da infecção foi maior em fêmeas, sendo sugerido que tal resultado poderia ser devido à maior exposição das fêmeas aos carrapatos. Pode-se sugerir o mesmo no presente estudo, considerando que cães machos com acesso não controlado ao extradomicílio podem estar mais expostos à infestação por carrapatos ao se engajarem em disputas territoriais ou por fêmeas ou se deslocarem por grandes distâncias. Entretanto, a presença de carrapatos e sua associação com a infecção por *A. platys* não foi avaliada no presente estudo. Silva (2016a) demonstrou a relação entre a ocorrência e grau de infestação por carrapatos e a infecção por *A. platys*. Todavia, a influência do sexo como um fator de risco ainda não está estabelecida, haja vista a divergência entre os estudos acerca do tema. É provável que a relevância do sexo como fator de risco varie conforme o tipo de população estudada, porém, mais estudos são necessários a fim de elucidar esta questão.

Alterações hematológicas significativamente correlacionadas com a infecção por *A. platys* se limitaram aos parâmetros eritrocitários. No presente estudo, os resultados médios de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito foram menores em cães positivos para *A. platys*, o que foi corroborado pela associação significativa com anemia. Esta observação está de acordo com vários autores que indicam a presença de anemia em cães positivos para *A. platys* (Almosny 2002; Harvey 2012; Bouzouraa *et al* 2016; Krause *et al*, 2016). Harvey (2012) salienta que a anemia é tipicamente discreta, normocítica e normocrômica. Embora a anemia no presente estudo tenha sido discreta quanto à severidade (Tvedten, 2022), observou-se uma associação significativa com o padrão morfológico hipocrômico (valor de CHCM menor que o limite inferior do intervalo de referência).

Anemia normocítica hipocrômica foi o segundo padrão mais frequentemente observado por Accetta (2008) e Krause *et al* (2016). Hipocromia está relacionada com hipoferremia, que foi observada por Baker, Gaunt e Babin (1988), em cães infectados por *A. platys*, associada a redução na capacidade total de ligação e ferro e estoques de ferro medulares normais ou aumentados. Estes achados são compatíveis com a síndrome da anemia da inflamação, uma das causas mais frequentes de anemia em cães (Chervier *et al*, 2012; Andrade, 2022). Vale salientar que outra explicação possível é o intervalo de referência adotado. Optou-se por seguir o

intervalo adotado pelo laboratório que realizou as avaliações hematológicas, o que pode ter classificado como hipocromia valores de CHCM característicos da idade dos cães.

Hipoproteinemia foi outro achado com associação significativa com a infecção por *A. platys*, entretanto, a frequência com que esta alteração foi observada (2/15; 13,3%) refere-se a animais com idade igual ou inferior a 2 meses, o que suscita a possibilidade de uma tendência ligada à faixa etária. Alterações das frações de proteínas séricas (hiperglobulinemia e hipoalbuminemia) descritas anteriormente (Almosny, 2002; Harvey, 2012; Bouzouraa *et al* 2016) poderiam justificar alterações da proteína plasmática total, porém esta hipótese só poderia ser confirmada pelo fracionamento em exame bioquímico sérico.

Não houve diferença significativa quanto à trombocitopenia observada em cães positivos e negativos. Embora a diminuição do número de plaquetas seja historicamente associada à infecção por *A. platys* (Harvey; Gaskin; Simpson, 1978; Baker; Gaunt; Babin, 1988; Almosny, 2002; Bouzouraa *et al*, 2016), já foi demonstrado não existir correlação deste achado com o diagnóstico do agente (Ribeiro *et al.*, 2017). Esta observação ratifica o caráter inespecífico da trombocitopenia, o que foi corroborado pelos resultados deste estudo.

Ao contrário do observado por Turbett *et al* (2020) para *Anaplasma phagocytophilum*, e Bulla *et al* (2004) e Costa (2011) para *E. canis*, não parece haver um ponto de corte indicativo da infecção por *A. platys* com base na contagem de plaquetas, provavelmente por causa do caráter cíclico da trombocitopenia neste quadro. Portanto, este parâmetro não deve ser usado como único critério diagnóstico. De fato, as causas patológicas de trombocitopenia podem ser divididas em cinco categorias gerais: diminuição da produção, aumento da destruição, aumento do consumo, sequestro e perda de sangue maciça (Botsch *et al*, 2009). Embora a trombocitopenia provocada por *A. platys* tenha origem multifatorial (Harvey, 2012), este agente foi relacionado com trombocitopenia em uma frequência de apenas 9,3% em um grupo de cães trombocitopênicos do município de Goiânia (Costa, 2011).

Cabe salientar que as amostras utilizadas neste estudo foram obtidas da rotina clínica, logo, as alterações hematológicas podem ter causas não obrigatoriamente associadas à infecção por *A. platys*. Em resumo, embora a infecção por *A. platys* desencadeie alterações hematológicas, estas são inespecíficas e, portanto, insuficientes para um diagnóstico assertivo, conforme assinalado por Paschoal *et al* (2020).

Houve diferença significativa entre o diagnóstico direto e a PCR na caracterização da infecção por *A. platys*, corroborando o relato de Ramos *et al* (2009). A concordância entre as duas técnicas foi fraca, 36,9%, semelhante ao que foi observado por Lara *et al* (2020), onde a

concordância foi de apenas 20,3%. Uma segunda análise estatística revelou ainda não haver sequer associação entre as duas técnicas. Isto traduz a baixa sensibilidade do diagnóstico direto, também demonstrada por este estudo. É interessante destacar, porém, que Ferreira *et al* (2007) não observaram diferença significativa entre os dois métodos diagnósticos. Isso foi devido à precaução adicional em classificar as inclusões observadas em específicas e inespecíficas, este último caso considerado negativo para a infecção. A correta identificação morfológica das inclusões sustenta fortemente o diagnóstico da infecção (Harrus; Waner, 2011), caracterizando elevada especificidade, que também foi demonstrada por este estudo.

Ratifica-se, desta forma, a relação direta entre o diagnóstico microscópico e a experiência do avaliador, já relatada por Silaghi *et al* (2017). Grandes grânulos citoplasmáticos decorrentes de ativação plaquetária e resquícios nucleares de megacariócitos estão entre as possíveis inclusões plaquetárias inespecíficas que podem levar a um diagnóstico falso-positivo (Ferreira *et al*, 2007; Harvey, 2012). Embora relativamente simples, a pesquisa direta de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo pode demandar tempo até que um número adequado de campos microscópicos ou células seja apropriadamente examinado, e isso interfere na sensibilidade do teste (Harrus; Waner, 2011).

As sequências do gene *gltA* de *A. platys* obtidas neste estudo mostraram entre 99-100% de identidade entre si e com sequências depositadas no GenBank oriundas de países da Europa, África, Ásia e Américas Central e do Sul. Isso denota a pouca variabilidade genética deste gene nas sequências estudadas e pode indicar movimentos recentes deste patógeno via hospedeiros vertebrados e/ou carrapatos infectados (Alhassan *et al*, 2021).

Na análise filogenética, todas as sequências se agruparam em um único clado, incluindo a única sequência (isolado 109), dentre as quinze analisadas, que não apresentou 100% de identidade com as sequências de outros países. Esta observação difere dos estudos de de la Fuente *et al* (2006) e Silva (2016a), que identificaram três genótipos diferentes a partir de sequências do mesmo gene utilizado neste estudo. Diante disso, sugere-se que há apenas um genótipo circulante, não havendo, portanto, diferentes cepas de *A. platys* nas mesorregiões estudadas. Entretanto, tais relações filogenéticas só podem ser determinadas precisamente pela comparação de múltiplos genes (Silva, 2016a).

## 6 CONCLUSÃO

*Anaplasma platys* está presente infectando cães trombocitopênicos nas Mesorregiões Metropolitana e do Sul Fluminense do estado do Rio de Janeiro, com uma prevalência de 4,7%.

Anemia normocítica hipocrômica e hipoproteinemia foram as únicas alterações hematológicas associadas à infecção neste estudo. Não houve diferença entre os valores médios de plaquetas entre animais infectados e não infectados por *A. platys*. A técnica de PCR se mostrou superior à observação microscópica de mórulas para o diagnóstico do agente.

O gene *gltA* é pouco variável nas mesorregiões estudadas, indicando haver apenas um genótipo de *A. platys* infectando cães. Deve-se caracterizar este genótipo de forma mais robusta pela comparação de outros genes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCETTA, E. M. T. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães (*Canis familiaris*, *Linnaeus*, 1758) trombocitopênicos na Região dos Lagos do Rio de Janeiro. 2008. 75 f. Dissertação (Patologia e Ciências Clínicas), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.
- ACOSTA, I. C. L.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. Human parasitism by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in Mato Grosso do Sul, West-Central Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 96-99, 2017.
- AGRANONIK, M.; HIRAKATA, V. N. Cálculo de tamanho de amostra: proporções. **Clinical & Biomedical Research [online]**, v. 31, n.3, p. 382-388, 2011. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/view/23574> . Acesso em: 07 jul 2023.
- AKTAS, M.; OZUBEK, S. Molecular evidence for transstadial transmission of *Anaplasma platys* by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato under field conditions. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 32, v. 1, p. 78-83, 2017.
- ALHASSAN, A.; HOVE, P.; SHARMA, B.; MATTHEW-BELMAR, V.; KARASEK, I.; LANZA-PEREA, M.; WERNERS, A. H.; WILKERSON, M. J.; GANTA, R. R. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the Caribbean. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 12, n. 4, 101727, 2021
- ALLISON, R. W.; LITTLE, S. E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 2, p. 127-144, 2013.
- ALMEIDA, A. M. *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia* spp. e *Hepatozoon* spp. em cães com trombocitopenia. (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Federal da Paraíba, Areia. 2017.



ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C. L. Erliquiose em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonose. In: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, 2002. p. 14-56.

ANDRADE, A. S. S. **Prevalence of the Causes of Anemia in Dogs**. 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária), Universidade de Lisboa, Lisboa, 2022.

ANDRÉ, M. R.; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; ZANATTO, D. C.; HORTA, B. C. L. S.; TASSO, J. B.; RAMOS, I. A. S.; MELLO, V. V. C.; MACHADO, R. Z. The co-infection with *Ehrlichia minasensis*, *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys* is not associated with anemia in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 21, 100437, 2020.

ARRAGA-ALVARADO, M. C.; QUROLLO, B. A.; PARRA, O. C.; MARIBEL A. BERRUETA, M. A.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Case Report: Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two Women from Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1161-1165, 2014.

ASGARALI, Z.; PARGASS, I.; ADAM, J.; MUTANI, A.; EZEOKOLI, C. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 4, p. 207-211, 2012.

ATIF, F.A. Alphaproteobacteria of genus *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Epidemiology and characteristics of *Anaplasma* species related to veterinary and public health importance. **Parasitology**, v. 143, p. 659-685, 2016.

ATIF, F.A.; MEHNAZ, S.; QAMAR, M.F.; ROHEEN, T.; SAJID, M.S.; EHTISHAM-UL-HAQUE, S.; KASHIF, M.; BEN SAID, M. Epidemiology, Diagnosis, and Control of Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia and Granulocytic Anaplasmosis: Emerging Diseases of Veterinary and Public Health Significance. **Vet. Sci.**, 8, 312, 2021.

BAHIENSE, C. R.; DE MATOS, A. C.; ABATE, H. L.; DOS SANTOS, N. J. R.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Babesia vogeli*, *Mycoplasma* spp., *Ehrlichia canis* and *Anaplasma* spp. in a hospital dog population of western Paraná. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 41, n. 6 suplemento 2, p. 3133-3144, 2020.

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 lowcopy-number plasmids in Rickettsia species associated with blood-feeding arthropods. **Applied Environmental Microbiology**, v.76, p.1718-1731, 2010.

BANETH, G. Babesia of Domestic Dogs. In: FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. **Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets**. 1. ed. New York: Springer, p. 241-258, 2019.

BAKER, D. C.; SIMPSON, M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E. Acute *Ehrlichia platys* Infection in the Dog. **Veterinary Pathology**, v. 24, p. 449-453, 1987.

BAKER, D. C.; GAUNT, S. D.; BABIN, S. S. Anemia of inflammation in dogs infected with *Ehrlichia platys*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 7, p. 1014-1016, 1988.

BATTILANI, M.; DE ARCANGELO, BALBONI, A.; DONDI, F. Genetic Diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p.195-211. 2017.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BIRKENHEUER, A. J. *Ehrlichia/ Anaplasma*. In: VADEN, S. L.; KNOLL, J. S.; SMITH JR, F. W. K.; TILLEY, L. P. **Exames Laboratoriais e Procedimentos Diagnósticos em Cães e Gatos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2013, p. 228-230.

BIRKENHEUER, A. J. Babesiose. In: GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 76, p. 1689-1716, 2015.

BOUZOURAA, T.; RENÉ-MARTELLET, M.; CHÊNE, J.; ATTIPA, C.; LEBERT, I.; CHALVET-MONFRAY, K.; CADORÉ, J. L.; HALOS, L.; CHABANNE, L. Clinical and laboratory features of canine *Anaplasma platys* infection in 32 naturally infected dogs in the Mediterranean basin. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1256-1264, 2016.

BRANDÃO, V. M. D., BARROZO, P. H. M., SOUSA, L. O.; SANTOS, R. C. D., SCHWANKE, K., SAMPAIO, F. D., CAVALCANTE, G. G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, 2019.

BRAZELL, J. L. Hematócrito. In: VADEN, S. L.; KNOLL, J. S.; SMITH JR, F. W. K.; TILLEY, L. P. **Exames Laboratoriais e Procedimentos Diagnósticos em Cães e Gatos**. 1ª Ed., São Paulo: Editora Roca, 2013. p. 338-340.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; QUROLLO, B. A.; SAITO, T. B.; MAGGI, R. G.; BLANTON, R. S.; BOUYER, D. H. Intravascular persistence of *Anaplasma platys*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* DNA in the blood of a dog and two family members. **Parasites & Vectors**, v. 7:298, 2014.

BROWN, J. K.; MARTIN, A. R.; ROBERTS, T. K.; DUNSTAN, R. H. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, p. 101-102, 2005.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAUJO JUNIOR, J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, Ottawa, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGARTH, E.; RIBEIRO, M.F.; DA SILVEIRA, J.A.; DE LA FUENTE, J.; GRUBHOFFER, L.; VALDÉS, J.J.; PASSOS, L.M. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. **Parasites and Vectors** 5:291, 2012.

CARDINOT, C. B. **Prevalência e alterações clínico-laboratoriais de erliquiose, babesiose, anaplasmose, hepatozoonose e leishmaniose visceral caninas**. 155 f. 2017. Tese (Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRÉCIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T. P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot Microbiol.*, v. 46, p. 298-303, 1999.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; DE AQUINO, L. P.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parasitol.**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 7-76, 2002.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 271, p. 1251-1262, 2004.

CHERVIER, C.; CADORÉ, J. L.; RODRIGUEZ-PIÑEIRO, M. I.; DEPUTTE, B. L.; CHABANNE, L. Causes of anaemia other than acute blood loss and their clinical significance in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 4, p. 223–227, 2012.

CHOCHLAKIS, D.; IOANNOU, I.; SHARIF, L.; KOKKINI, S.; HRISTOPHI, N.; DIMITRIOU, T.; TSELENTIS, S.; PSAROULAKI, A. Prevalence of *Anaplasma* sp. in goats and sheep in Cyprus. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 5, p. 457-463, 2009.

CHOMEL, B. Tick-borne infections in dogs—an emerging infectious threat. **Veterinary parasitology**, v. 179, n. 4, p. 294-301, 2011.

CODNER, E. C.; FARRIS-SMITH, L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, New York, v. 189, n. 1, p. 47-50, 1986.

CORDEIRO, M. D.; FIGUEIROA, T.; TROVA, G. B.; ARAÚJO, I. M.; VALIM, J. R. A.; RAMOS, C. R.; RICCI, N.; FONSECA, A. H. *Anaplasma platys* in dog and *Rhipicephalus sanguineus* in the city of Salta in Salta Province, Argentina. **Revista de Salud Animal**, v. 42, n. 3, sept-dec 2020.

COSTA, H. X. **Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia**. 2011. 70f. Dissertação (Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

COSTA, H. X. ***Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cães: Avaliação de alterações oculares, desenvolvimento e validação de técnica de diagnóstico molecular**. Dissertação (Tese de Doutorado) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; REMBECK, K.; PASSOS, L. M.; RIBEIRO, M. F. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 3-4, p. 321-326, maio, 2013

DAGNONE, A. S.; AUTRAN, H. S. M.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Anaplasmosis. In: MARCONDES, C. B. **Arthropod Borne Diseases**. ed. Springer International Publishing Switzerland, p. 215–222, 2016.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 208 (1-2), p. 9-13, feb. 2015.

de TOMMASI, A. S.; BANETH, G.; BREITSCHWERDT, E. W.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D.; CAPRARIIS, D. *Anaplasma platys* in Bone Marrow Megakaryocytes of Young Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2331-2334, june 2014.

DINIZ, P. P. V. P.; AGUIAR, D. M. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 52, p. 1225-1256, 2022.

DUMLER, J. S., BARBET, A. F., BEKKER, C. P. J., DASCH, G. A., PALMER, G. H., RAY, S. C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA. 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 ‘HE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DYACHENKO, V.; PANTCHEV, N.; BALZER, H. J.; MEYERSEN, A.; STRAUBINGER, R. K. First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 49, 2012.

FERNANDES, M. **Identificação molecular da *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* e *Hepatozoon* spp. em cães anêmicos atendidos no Hospital Veterinário da UFPB.** (Trabalho de conclusão de curso). Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB. 2017.

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. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 5: 113-119, 2007.

FRENCH, T.W.; HARVEY, J.W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **American Journal of Veterinary Research** v.44, p.2407-2411, 1983.

FUNDAÇÃO CEPERJ. Divisão regional - Regiões de Governo, mesorregiões e microrregiões geográficas. 2019. Disponível em [http://arquivos.proderj.rj.gov.br/sefaz\\_ceperj\\_imagens/Arquivos\\_Ceperj/ceep/dados-estatisticos/series-historicas/excel/cogeo/Tab%202.0.0.40.html](http://arquivos.proderj.rj.gov.br/sefaz_ceperj_imagens/Arquivos_Ceperj/ceep/dados-estatisticos/series-historicas/excel/cogeo/Tab%202.0.0.40.html) . Acesso: 06 jul 2023.

FUNDAÇÃO CEPERJ. Perfil dos Municípios do Estado do Rio de Janeiro. 2021. Disponível em [https://arquivos.proderj.rj.gov.br/sefaz\\_ceperj\\_imagens/Arquivos\\_Ceperj/ceep/dados-estatisticos/perfil-municipal/](https://arquivos.proderj.rj.gov.br/sefaz_ceperj_imagens/Arquivos_Ceperj/ceep/dados-estatisticos/perfil-municipal/) . Acesso: 06 jul 2023.

GALÁN, A.; MAYER, I.; RAFAJ, R. B.; BENDELJA, K.; SUSIC, V.; CERON, J. J.; MRLJAK, V. MCP-1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by *Babesia canis*. **PloS one**, v. 13, n. 1, p. e0190474, 2018.

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*, 2nd Ed, v. 2 (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), Springer, New York, p. 1, 2005.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. Hemograma. In: \_\_\_\_\_. **Manual de hematologia veterinária**. 2 ed. São Paulo: Varela, Cap. 5, p. 79-100, 2005.

GARCIA, D. A.; MARTINS, K. P.; CORTEZI, A. M.; GOMES, D. E. Erliquiose e Anaplasmose canina-Revisão de literatura. **Revista Científica Unilago**, v. 1, n. 1, 2018.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Class I. Alphaproteobacteria *class. nov.* In: GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd Ed., v. 2, Part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), New York: Springer, p.1, 2005.

GAUNT, S. D.; BAKER, D. C.; BABIN, S. S. Platelet aggregation studies in dogs with acute *Ehrlichia platys* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 2, 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. **Parasites and Vectors**, v. 3:33, 2010.

GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J. M.; PEIXOTO, M. P.; SILVA, C. B.; PIRES, M. S.; SANTOS, H. A.; BALDANI, C. D. Molecular detection, characterization of *Anaplasma* spp. in domestic cats from Rio de Janeiro state. **Acta Tropica**, v. 191, p. 239-242, 2019.

GIESZCZYKIEWICZ, M. Zagadnienie systematiki w bakteriologii—Zür Frage der Bakterien-Systematic. **Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences**, Ser. Sci. Biol., v. 1: p. 9 - 27, 1939.

GOUY, M.; TANNIER, E.; COMTE, N.; PARSONS, D.P. Seaview Version 5: A Multiplatform Software for Multiple Sequence Alignment, Molecular Phylogenetic Analyses, and Tree Reconciliation. **Methods in Molecular Biology**, 2231, p. 241-260, 2021.

GUIMARÃES, M. C. N. **Ocorrência de hemoparasitoses em cães domésticos: achados hematológicos e moleculares**. 2019. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém, PA, 2019.



GUO, W. P.; ZHANG, B.; WANG, Y. H.; XU, G.; WANG, X.; NI, X.; ZHOU, E. M.

Molecular identification and characterization of *Anaplasma capra* and *Anaplasma platys*-like in *Rhipicephalus microplus* in Ankang, Northwest China. **BMC Infectious Diseases**, v. 19: 434, 2019.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 292-296, 2011.

HARVEY, J. H.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic Thrombocytopenia Induced by a *Rickettsia*-Like Agent in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

HARVEY, J. W. *Anaplasma platys* infection (Thrombocytotropic Anaplasmosis). In: GREENE, C. E. (Ed). **Infectious diseases of the Dog and Cat**. 4<sup>th</sup> Ed. Elsevier, 2012. Cap 26, p. 257-259.

HARVEY, J. W. Infecção por *Anaplasma platys* - Anaplasmoze trombocitotrópica. In: GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 26, p. 565-571, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rio de Janeiro. 2023. Disponível em <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/panorama> . Acesso: 06 jul 2023

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hameatology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; IRWIN, P. J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 20–27, 2007.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; JARDINE, J.; ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. J. *Babesia gibsoni*: detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. **Experimental parasitology**, v. 117, n. 2, p. 115-123, 2007.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, abr. 2013.

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

KOCAN, K. M.; de la FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. **Clinical and Microbiological Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

KOCAN, K. M.; de la FUENTE, J.; CABEZAS-CRUZ, A. The genus *Anaplasma*: new challenges after classification. **Revue Scientifique et Technique/ Office International des Épizooties**, v. 34, n. 2, p. 577-586, 2015.

KRAUSE, L. E., SAMPAIO, L. C., & RIBEIRO, C. L. Molecular characterization of *Anaplasma platys* in dogs in Pelotas city, Southern Brazil. **Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 20-25, 2016.

KUTTLER, K. L. World-wide impact of babesiosis. In Babesiosis of Domestic Animals and Man; **CRC Press: Boca Raton, FL, USA**, p. 1–22, 2018.

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

LASTA, C. S. **Fatores de risco, parâmetros hematológicos, detecção molecular e sorológica de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em Porto Alegre/RS**. 2011. 83 f. Dissertação (Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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. **Parasites and Vectors** 8: 313, 2015.

LI, Y.; CHEN, Z.; LIU, Z.; LIU, J.; YANG, J.; LI, Q.; LI, Y.; GUAN, G.; LUO, J.; YIN, H. Molecular survey of *Anaplasma* and *Ehrlichia* of red deer and sika deer in Gansu, China in 2013. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 6, e228-e236, 2016

LIMA, M. L. F.; SOARES, P. T.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; RAMOS, R. A. N.; SOUZA, I. I. F.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 381-385, 2010.

LIU, J.; DREXEL, J.; ANDREWS, B.; EBERTS, M.; BREITSCHWERDT, E.; CHANDRASHEKAR, R. Comparative Evaluation of 2 In-Clinic Assays for Vector-Borne Disease Testing in Dogs. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 33, n. 4, p. 114-118, 2018.

LLANES, A.; RAJEEV, S. First Whole Genome Sequence of *Anaplasma platys*, an Obligate Intracellular Rickettsial Pathogen of Dogs. **Pathogens** 9, 277, doi:10.3390/pathogens9040277, 2020.

LOBETTI, R. G. Canine babesiosis. **Compendium**, v. 20, p. 418-432, 1998.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. Eritrograma I. In: \_\_\_\_\_. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3ª Ed., Santa Maria: UFSM/ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007a. p. 5-10.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. Leucograma II. In: \_\_\_\_\_. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3ª Ed., Santa Maria: UFSM/ Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007b. p. 38-45.

LPSN - LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE.

*Anaplasma platys*. Disponível em <https://lpsn.dsmz.de/species/anaplasma-platys>. Acesso em 02/09/2023.

MACHADO, G. P.; DAGNONE, A. S.; SILVA, B. F. Anaplasmosse trombocítica canina—uma breve revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** [online], 2010.

Disponível em:

[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/8J0itKMfE0OXrcN\\_2013-6-25-16-43-23.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/8J0itKMfE0OXrcN_2013-6-25-16-43-23.pdf).

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V.;

BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6: 103, 2013.

MATEI, I. A.; STUEN, S.; MODRY, D.; DEGAN, A.; D'AMICO, G.; MIHALCA, A. D. Neonatal *Anaplasma platys* infection in puppies: Further evidence for possible vertical transmission. **The Veterinary Journal**, v. 219: 40-41, 2017.

MELO, A. T. L.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, MR. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick borne Disease**, Berlin, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2011.

MELO, A. L. T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, 2015.

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. e Zootec.**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.

NAIR, A.D.; CHENG, C.; GANTA, C.K.; SANDERSON, M. W.; ALLEMAN, A. R.; MUNDERLOH, U. G.; GANTA, R. R. Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. **PLoS One**, v. 11, n. 2, e0148239, 2016.

O'CONNOR, T. P. SNAP Assay Technology. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 30, n. 4, p. 132-138, 2015.

OLIVEIRA, D.; TIE NISHIMORI, C.; COSTA, M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. Anti- *Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

OLIVEIRA, A. C. **Diagnóstico das hemoparasitoses caninas por biologia molecular, alterações hematológicas e centrifugação por gradiente**. 2015. 64 f. Tese (Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

OLIVEIRA, M. S. D. **Estudo retrospectivo da anaplasmosse em cães no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido**. (Trabalho de conclusão de curso) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.

OREN, A.; GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 10: 005056, 2021.

PARK, S-J.; McCABE, J.; TURNA, J.; GUNSALUS, R. P. Regulation of Cytrate-Sinthase Gene (gltA) Gene of *Escherichia coli* in Response to Anaerobiosis and Carbon Supply: Role of the *arcA* gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 5086-5092, Aug., 1994.

PAROLA, P., CORNET, J.P., SANOGO, Y.O., MILLER, R.S., THIEN, H.V., GONZALEZ, J.P., RAOULT, D., TELFORD III, S.R., WONGSRICHANALAI, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1600–1608, 2003.

PASCHOAL, A.; SILVA, A. C.; BERNARDES, J.; CALDART, E.; FERREIRA, F.; SOARES, J.; MATOS, A.; MORAES, N.; GARCIA, J.; VIDOTTO, O.; MITSUKA-BREGANÓ, R. Molecular detection of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in a hospital population of dogs clinically diagnosed with hemoparasitosis. **Semina Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5., Supl. 1, p. 2143-2152, 2020.

PÉREZ-TANOIRA, R.; RAMOS-RINCÓN, J. M.; MARTÍN-MARTÍN, I.; PRIETO-PÉREZ, L.; TEFASMARIAM, A.; TIZIANO, G.; ANDA, P.; GONZÁLEZ-MARTIN-NIÑO, R. M.; RODRÍGUEZ-VARGAS, M.; GÓRGOLAS, M.; JADO, I. Molecular Survey of *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., and *Borrelia* spp. in Fleas and Lice in Ethiopia. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 1, p. 10-14, 2019.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia. Teoria e Prática**. 1ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

PHILIP, C.B. Family IV. Anaplasmataceae *fam. nov.* In: BREED, R. S.; MURRAY, E.G.D.; SMITH, N. R. (Eds), **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 7th Ed., Baltimore: The Williams & Wilkins Co., p. 980–984, 1957.

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. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, dez. 2009.

RAMOS, R. A. N., LATROFA, M. S., GIANELLI, A., LACASELLA, V., CAMPBELL, B. E., DANTAS-TORRES, F., & OTRANTO, D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 285-288, 2014.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1842-1861, 2011.

RAR, V; TKACHEV; TIKUNOVA, N. Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria: Twenty years later. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 91, 104833, 2021.

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

RIKIHISA, Y. The Tribe *Ehrlicheae* and Ehrlichial diseases. **Clinical and Microbiological Reviews**, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991.

RIZZI, T. E.; MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. Normal Hematology of the Dog. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6<sup>th</sup> ed, Ames (Iowa): Wiley-Blackwell, 2010. p. 799-810.

RYMASZEWSKA, A.; GREINDA, S. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 53, n.11, p. 573-584, 2008.

SAINZ, A.; ROURA, X.; MIRÓ, G.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOHN, B.; HARRUS, S.; SOLANO-GALLEGU, L. Guideline for veterinary practioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 8:75, 2015.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SALEM, N. Y.; FARAG, H. S. Clinical, hematologic, and molecular findings in naturally occurring *Babesia canis vogeli* in Egyptian dogs. **Veterinary medicine international**, v. 1, 2014.

SANTOS, F.; COPPED, 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. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, Jan. 2009.

SCHETTERS, T. Mechanisms Involved in the Persistence of *Babesia canis* Infection in Dogs. **Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 94, 2019.

SELIM, A.; ALMOHAMMED, H.; ABDELHADY, A.; ALOUFFI, A.; ALSHAMMARI, F. A. Molecular detection and risk factors for *Anaplasma platys* infection in dogs from Egypt. **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1:429, Ago. 2021.

SELMİ, R.; BEN SAİD, M.; DHİBİ, M.; BEN YAHİA, H.; MESSADI, L. Improving specific detection and updating phylogenetic data related to *Anaplasma platys*-like strains infecting camels (*Camelus dromedarius*) and their ticks. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 10, 101260, 2019.

SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I. A.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; BELL-SAKYI, L.; SPRONG, H.; von LOEWENICH, F. D.; OTEO, J. A.; de la FUENTE, J.; DUMLER, J. S. Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp in Diagnosis and Epidemiological Studies. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 12-22, 2017.

SILVA, G. C.; BENITEZ ADO, N.; GIROTTI, A.; TARODA, A.; VIDOTTO, M. C.; GARCIA, J. L.; FREITAS, J. C.; RLINGTON, S. H.; VIDOTTO, O. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Parana. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 379-385, 2012.

SILVA, C. B. **Deteccão 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**. 2016a. 109 f. Tese (Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2016a.



SILVA, C. B.; SANTOS, H. A.; NAVARRETE, M. G.; RIBEIRO, C. C. D. U.; GONZALEZ, B. C.; ZALDIVAR, M. F.; PIRES, M. S.; PECKLE, M.; COSTA, R. L.; MASSARD, C. L. Molecular detection and characterization of *Anaplasma platys* in dogs and ticks from Cuba. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 938-944, 2016b.

SILVA, A. B.; DUARTE, M. M.; DA COSTA CAVALCANTE, R.; DE OLIVEIRA, S.V.; VIZZONI, V.F.; DE LIMA DURÉ, A.Í.; DE MELO IANI, F.C.; MACHADO-FERREIRA, E.; GAZÊTA, G. S. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 173, p. 30-33, set. 2017.

SILVA, A. C., DE SOUSA, S. X., MELO, H. M., DE SOUZA, A. L., DE MELO VAZ, A. F. Incidência de *Anaplasma platys*, *Babesia* sp. e *Hepatozoon* sp. em cães atendidos no hospital veterinário da universidade federal de Campina Grande em Patos-PB. **Revista de Agroecologia no Semiárido**, v. 4, n. 4, p. 30-33, 2020.

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*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 1537-1541, 1991.

SNELLGROVE, A. N.; KRAPIUNAYA, I.; FORD, S. L.; STANLEY, H. M.; WICKSON, A. G.; HARTZER, K. L.; LEVIN, M. L. Vector competence of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto for *Anaplasma platys*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, 101517, 2020.

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

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Plaquetas. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 186-212.

TAMURA, K.; GLEN STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, July 2021, p. 3022–3027, jul. 2021.

TATEISHI, V.; LI, O.; HOYOS, L.; RIVERA, H.; MANCHEGO, A.; BARRIOS, L.; MORE, J. Identificación hematológica y molecular de *Anaplasma platys* en en caninos domésticos de Lima Metropolitana con signos clínicos compatibles con anaplasmosis. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 26, n. 1, p. 111-118, 2015.

THEILER, A. "Anaplasma marginale (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease." Report to the Government, Transvaal, South Africa. **Veterinary Bacteriology**, Department of Agriculture (1908-9), p. 7-64, 1910.

THRALL, M. A.; WEISER, M. G. Hematologia. In: HENDRIX, C. M. **Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários**. 4ª Ed., São Paulo: Roca, 2006. p. 31-78.

TURBETT, S. E.; ANAHTAR, M. N.; PATTANAYAK, V.; AZAR, M.M.; COFFEY, K. C.; ENG, G.; RUDOLF, J.W.; LEWANDROWSKI, K.B.; BARON, J.; ROSENBERG, E.S.; BRANDA, J.A. Use of Routine Complete Blood Count Results to Rule Out Anaplasmosis Without the Need for Specific Diagnostic Testing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, n. 6, p. 1215-1221, Mar. 2020.

TVEDTEN, H. Classification and Laboratory Evaluation of Anemia. In: BROOKS, M. B.; HARR, K. E.; SEELIG, D. M.; WARDROP, K. J.; WEISS, D. J. (Ed). **Schalm's Veterinary Hematology**. 7<sup>th</sup> Ed. Wiley-Blackwell, 2022. Cap 25, p. 672-699.

UENO, T. E.; GUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

WATERHOUSE, A.M.; PROCTER, J.B.; MARTIN, D.M.A; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench".

**Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

WEN-PING G.; JUN-HUA T.;, XIAN-DAN, L.; XUE-BING N.; XIAO-PING C.; YONG, L.; SI-YUAN Y.; DUMLER, J. S.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. Extensive genetic diversity of Rickettsiales bacteria in multiple mosquito species. **Scientific Reports**, v. 9, 6:38770, 2016.

WITTER, R., VECCHI, S. N., DOS ANJOS PACHECO, T., MELO, A. L. T., BORSA, A., SINKOC, A. L., DE AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, Supl. 2, p. 3811-3822, 2013.

XAVIER, M. S. **Estudos de Hemoparasitos por evidências morfológicas, sorológicas e moleculares, com ênfase na família Anaplasmataceae em *Canis familiaris* L., na região litorânea do Estado do Rio de Janeiro**. 2011. 222 f. Tese (Medicina Veterinária, Clínica e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2011.

ZOBBA, R.; ANFOSSI, A. G.; VISCO, S.; SOTGIU, F.; DEDOLA, C.; PINNA PARPAGLIA, M. L.; BATTILANI, M.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Cell tropism and molecular epidemiology of *Anaplasma platys*-like strains in cats. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, p. 272–280, 2015.

## 8 ANEXOS

### Anexo A Protocolo de Aprovação CEUA-UFRRJ



**UFRRJ**  
Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**  
Instituto de Veterinária



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diagnóstico e isolamento de hemoparasitos de cães de duas mesoregiões do estado do Rio de Janeiro", protocolada sob o CEUA nº 7340040222 (ID 002182), sob a responsabilidade de **Bruna de Azevedo Baêta e equipe; Adivaldo Henrique da Fonseca; Matheus Dias Cordeiro ; Diogo dos Santos Maia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 07/02/2022.

We certify that the proposal "Diagnosis and isolation of hemoparasites in dogs f.r.o.m two mesoregions of the state of Rio de Janeiro", utilizing 200 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7340040222 (ID 002182), under the responsibility of **Bruna de Azevedo Baêta and team; Adivaldo Henrique da Fonseca; Matheus Dias Cordeiro ; Diogo dos Santos Maia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 02/07/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2022** a **01/2025**

Área: **Parasitologia Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 180 meses**

N: **200**

Linhagem: **diferentes raças**

Peso: **3 a 40 kg**

Local do experimento: O local de exame dos animais será de acordo com a preferência dos tutores, podendo ser realizado na residência ou na clínica veterinária onde o animal estiver sendo atendido.

Seropédica, 08 de fevereiro de 2022

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Viviane de Souza Magalhães  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## Anexo B Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

*Diagnóstico e isolamento de hemoparasitos de cães de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro*

Razão Social / CEUA: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – CEUA IV

CIAEP: 02.0081.2019

#### Equipe Executora

Nome	Telefone	E-mail	Função
Bruna de Azevedo Baêta	(21)994736838	<a href="mailto:babaeta@ufrj.br">babaeta@ufrj.br</a>	Docente/coordenadora
Adivaldo Henrique da Fonseca	(21)987108868	<a href="mailto:adivaldo@ufrj.br">adivaldo@ufrj.br</a>	Pesquisador/colaborador
Matheus Dias Cordeiro	(21)986191846	<a href="mailto:mathcordeiro@hotmail.com">mathcordeiro@hotmail.com</a>	Técnico/Executante
Diogo dos Santos Maia	(21) 99599-3541	<a href="mailto:dm.patoclin@gmail.com">dm.patoclin@gmail.com</a>	Mestrando/Executante
Jônathan David Ribas Chagas	(24) 99307-0289	<a href="mailto:jonatachagas@hotmail.com">jonatachagas@hotmail.com</a>	Mestrando/Executante

Telefone CEUA/IV/UFRRJ: (21) 2682-3051

Prezado Sr. (Sra.),

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seu animal em projeto de pesquisa, que tem como finalidade diagnosticar cães portadores de *Anaplasma* sp, *Ehrlichia* sp e *Rickettsia* sp de duas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, através de análises hematológicas e moleculares, e proceder o isolamento e propagação in vitro destes patógeno, utilizando cultivo de células de carrapatos.

Os cães serão inspecionados quanto a presença de carrapatos e então será realizada as coletas de carrapatos e de amostra sanguínea desses animais. Após avaliação clínica será realizada coleta de 3mL de sangue por punção da veia cefálica ou jugular. Ao retirar a agulha 23G haverá compressão do local com algodão até coagulação. Animais agressivos serão contidos durante todo o exame clínico com atadura de algodão no focinho apropriada para o seu porte/tamanho. O procedimento não oferece riscos para saúde do animal. Após as análises, os tutores serão informados sobre resultados dos exames dos animais e com os resultados da pesquisa, aumentará o conhecimento sobre os hemoparasitos de cães, podendo servir para futuros estudos de diagnóstico e produção de material diagnóstico.

Todos os procedimentos seguem os princípios éticos no uso de animais elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado



pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob o CEUA Nº \_\_\_\_\_.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) \_\_\_\_\_, inscrito(a) no CRMV sob o nº \_\_\_\_\_. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Bruna de Azevedo Baêta, também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele.

Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos descritos no início deste documento.

#### Declaração de consentimento

*Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.*

Identificação dos animais			
Nome ou número	Espécie	Raça	Idade

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

(local), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

*Baêta*



Responsável:

Nome:

Documento de Identidade: (quando aplicável):

Identificação do(s) animal(is):

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça: