

## OCORRÊNCIA DE *Anaplasma platys* EM CÃES ATENDIDOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

CAMILA XAVIER SILVEIRA<sup>1</sup>; PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN<sup>2</sup>; DIAGO DUTRA LIMA<sup>3</sup>; THAINÁ SAN MARTINS FERNANDEZ<sup>4</sup>; PEDRO MACHADO MEDEIROS DE ALBUQUERQUE<sup>5</sup>; RODRIGO CASQUERO CUNHA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – camilaxavier.vet@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – thainasanmartinsfernandez@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – albuquerque95pedro@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha\_vet@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As enfermidades transmitidas por carrapatos representam um desafio crescente para a medicina veterinária e a saúde pública, devido à ampla distribuição geográfica, à elevada adaptabilidade dos vetores e ao potencial zoonótico. Entre os agentes envolvidos, o *Anaplasma platys* — bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, pertencente à ordem Rickettsiales e à família Anaplasmataceae — apresenta tropismo específico pelas plaquetas, sendo reconhecida como o agente etiológico da trombocitopenia cíclica infecciosa canina (LLANES, 2020; ATIF *et al.*, 2021). Essa enfermidade, de ocorrência global, é transmitida principalmente pelo carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineus*), vetor amplamente adaptado a diferentes condições ambientais e responsável pela disseminação de outros hemoparasitos de importância veterinária (ATTIPA *et al.*, 2017; SNELLGROVE *et al.*, 2020).

Embora os cães sejam considerados os principais hospedeiros, *A. platys* já foi detectado em felinos domésticos, diversos mamíferos silvestres e, de forma relevante, em seres humanos — com registros na Venezuela e nos Estados Unidos da América — evidenciando seu potencial zoonótico e reforçando sua importância sob a perspectiva da Saúde Única (ARRAGA-ALVARADO *et al.*, 2014; DAHLGREN *et al.*, 2015). As infecções podem variar de assintomáticas a sintomáticas graves, caracterizando-se por febre, letargia, anorexia, perda de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia e distúrbios hemorrágicos, como petéquias e sangramentos espontâneos decorrentes de trombocitopenia acentuada (SHAPIRO *et al.*, 2017; ATIF *et al.*, 2021). Coinfecções com *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e outros patógenos transmitidos por carrapatos são frequentes e podem agravar o quadro clínico, prolongar a evolução da doença e dificultar o diagnóstico diferencial (ATTIPA *et al.*, 2017; DINIZ, 2022).

A patogênese caracteriza-se por ciclos recorrentes de parasitemia e trombocitopenia, com intervalos de 8 a 15 dias, resultantes da destruição plaquetária direta pela replicação intracelular do microrganismo, associada a mecanismos imunomediados. O diagnóstico baseado exclusivamente em sinais clínicos e achados hematológicos é limitado pela inespecificidade e pela sobreposição com outras hemoparasitoses (ATTIPA *et al.*, 2017; ATIF *et al.*, 2021). A observação de corpúsculos de inclusão em plaquetas por meio de esfregaço sanguíneo, embora útil, apresenta baixa sensibilidade em fases iniciais ou de baixa parasitemia. Nesse contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) destaca-se como ferramenta de referência, por sua elevada sensibilidade e

especificidade na detecção do agente *A. platys* (BUDDHACHAT *et al.*, 2020; LLANES, 2020). Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo definir a prevalência molecular de *A. platys* em amostras de sangues de cães atendida no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), utilizando a PCR.

## 2. METODOLOGIA

### Amostragem

Foram amostrados 62 cães provenientes de atendimentos realizados no HCV/UFPEL durante o primeiro semestre de 2024. Todas as análises e o processamento das amostras foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Veterinária (LaBMol-Vet) da UFPEL.

### Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico total foi obtido a partir das amostras de sangue utilizando o reagente Brazol™ (LGC Biotecnologia®, Cotia, SP, Brasil), conforme protocolo do fabricante. A pureza e a concentração do material genético foram determinadas por espectrofotometria de absorvância na faixa de luz ultravioleta, empregando-se o equipamento NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As amostras de DNA foram posteriormente armazenadas a -70 °C até o processamento nas análises moleculares.

### Identificação molecular de *Anaplasma platys*

A detecção de *A. platys* foi realizada por PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região do gene 16S rDNA, conforme descrito por Inokuma *et al.* (2000). O par de primers empregado foi: Platys (5'-GAT-TTT-TGT-CGT-AGC-TTG-CTA-TG-3') e EHR16SR (5'-TAG-CAC-TCA-TCG-TTT-ACA-GC-3'), o que possibilita a amplificação de um fragmento de 678 pares de bases.

As reações foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo: 2,5 µL de tampão 10×, 0,5 µL de solução de dNTPs (0,2 mM de cada nucleotídeo), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 0,5 µL de cada primer (0,2 pmol), 0,25 µL de Taq DNA polimerase (1,25 U; Ludwig Biotecnologia®, Alvorada, RS, Brasil), 16,5 µL de água ultrapura estéril (Ludwig Biotecnologia®) e 2 µL de DNA genômico da amostra. Em todas as reações, foram incluídos controles positivo e negativo (substituindo-se o DNA por água ultrapura). O protocolo consistiu em desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, finalizando-se com uma etapa de extensão a 72 °C por 5 minutos.

### Eletroforese em gel de agarose

Os amplicons obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, previamente corado com brometo de etídio. A visualização foi realizada sob luz ultravioleta, em transiluminador, e o tamanho dos fragmentos foi estimado utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder; Ludwig Biotecnologia®, Alvorada, RS, Brasil).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 62 amostras analisadas, 21 cães (33,9%) apresentaram resultado positivo para *A. platys*, evidenciando uma ocorrência relevante da infecção na população canina estudada. Entre os animais positivos, 11/21 (52,4%) eram assintomáticos ou foram atendidos por outras enfermidades, enquanto 10/21 (47,6%) apresentaram sinais clínicos compatíveis com *A. platys*, como: anemia, petéquias, equimoses, perda de peso, mucosas pálidas, letargia e/ou linfadenomegalia, além de apresentarem trombocitopenia acentuada, corroborando com estudos de *Llanes* (2020) e *Atif* (2021).

A presença de *A. platys* tem sido identificada em diferentes países. Na Venezuela, foi detectado em 16% de 43 amostras sanguíneas de cães; na Itália, em 3,7% de 135 amostras; no Chile (Santiago), em 20% de 30 amostras; e no México, em 27% de 100 amostras (JERÉZ-SULVARÁN *et al.*, 2024). Relatos de casos de anaplasmoze em humanos na Venezuela e nos Estados Unidos da América indicam um potencial zoonótico deste agente, reforçando a importância de sua vigilância epidemiológica (ARRAGA-ALVARADO *et al.*, 2014; DAHLGREN *et al.*, 2015).

No Brasil, um estudo molecular realizado por *Ramos* (2010), em Recife, PE, identificou *A. platys* em 48,78% das 205 amostras de sangue analisadas. Nesse mesmo estudo, coinfeções envolvendo dois ou três patógenos foram observadas em 23,9% (49/205) dos cães avaliados. Já em Campo Grande, MS, entre 181 amostras analisadas, 108 (59,66%) foram positivas para *E. canis*, 28 (15,46%) para *A. platys* e 18 (9,94%) apresentaram coinfeção por ambos os agentes (SOARES, *et al.*, 2017).

A detecção de *A. platys* tem sido relatada em diferentes espécies, incluindo felinos (ARRAGA-ALVARADO *et al.*, 2014; DAHLGREN *et al.*, 2015). Estudos moleculares confirmaram a presença de DNA do agente em gatos, sugerindo que esses animais possam atuar como reservatórios, hospedeiros ou sentinelas, mesmo na ausência de sinais clínicos evidentes (DAY, 2016; ANDRÉ *et al.*, 2022). Essa constatação sugere que *A. platys* pode envolver múltiplos hospedeiros e que a vigilância não deve se restringir à população canina.

É importante destacar que reações cruzadas entre *A. platys*, outras bactérias da mesma família e determinados hemoprotozoários têm sido relatadas (JERÉZ-SULVARÁN *et al.*, 2024). Essas interações podem comprometer a especificidade de métodos sorológicos e exame direto (esfregaço sanguíneo), resultando em diagnósticos falso-positivos, além de agravar a evolução clínica do paciente, reforçando a necessidade de confirmação por técnicas moleculares, como a PCR.

Dito isso, é relevante ressaltar que os resultados apresentados são preliminares. As 62 amostras ainda serão submetidas à PCR para investigação de outros agentes, incluindo *E. canis*, *Babesia* spp., *Rangelia vitalii* e *H. canis*.

### 4. CONCLUSÕES

O estudo demonstra a circulação de *A. platys* em cães atendidos no HCV da UFPEL, com prevalência molecular prévia de 33,9%, reforçando a importância do uso de técnicas diagnósticas sensíveis e específicas. Além disso, ressalta-se a necessidade de investigar coinfeções com outros hemoparasitos transmitidos por carrapatos, a fim de ampliar o conhecimento epidemiológico e contribuir para o desenvolvimento de protocolos diagnósticos e terapêuticos mais eficazes.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉ, M.R.; CALCHI, A.C.; FURQUIM, M.E.C.; ANDRADE, I. *et al.* Molecular Detection of Tick-Borne Agents in Cats from Southeastern and Northern Brazil, **Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 106, 2022.
- ARRAGA-ALVARADO, C.M.; QUROLLO, B.A.; PARRA, O.C. *et al.* Case report: molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1161–1165, 2014.
- ATIF, F.A.; MEHNAZ, S.; QAMAR, M.F.; ROHEEN, T. *et al.* Epidemiology, Diagnosis, and Control of Canine Infectious Cyclic Thrombocytopenia and Granulocytic Anaplasmosis: Emerging Diseases of Veterinary and Public Health Significance. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 12, p. 312, 2021.
- ATTIPA, C.; HICKS, C.A.E.; BARKER, E.N.; CHRISTODOULOU, V. *et al.* Canine tick-borne pathogens in Cyprus and a unique canine case of multiple co-infections. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 3, p. 341-346, 2017.
- BUDDHACHAT, K.; MEEROD, T.; PRADIT, W.; SIENGDEE, P. *et al.* Simultaneous differential detection of canine blood parasites: Multiplex high-resolution melting analysis (mHRM). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.11, n. 3, p. 101370, 2020.
- DAHLGREN, F.S.; HEITMAN, K.N.; DREXLER, N.A.; MASSUNG, R.F.; *et al.* Human granulocytic anaplasmosis in the United States from 2008 to 2012: A summary of national surveillance data. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 1, p. 66-72, 2015.
- DAY, M.J. Cats are not small dogs: is there an immunological explanation for why cats are less affected by arthropod-borne disease than dogs? **Parasit Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2016.
- DINIZ, P.P.V.P.; MOURA DE AGUIAR, D. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p.1225-1266, 2022.
- JERÉZ-SULVARÁN, I.A.; MARTÍNEZ-HERRERA D.I.; VIVANCO-CID H., *et al.* Frequency of *Anaplasma platys* in dogs from the municipality of Veracruz, Mexico. **Vet Res Forum**, v.15, n.12, p.697-700, 2024.
- INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T.; RAOULT, D. *et al.* Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 7, p. 815-7, 2000.
- LLANES, A.; RAJEEV, S. First Whole Genome Sequence of *Anaplasma platys*, an Obligate Intracellular Rickettsial Pathogen of Dogs. **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. :277, 2020.
- RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F., *et al.* Levantamento molecular e caracterização genética de patógenos transmitidos por carrapatos em cães na região metropolitana do Recife (Nordeste do Brasil). **Parasitol Res**, v. 107, p. 1115–1120, 2010.
- SHAPIRO, A.J.; BROWN, G.; NORRIS, J.M.; BOSWARD, K.L. *et al.* Vector-borne and zoonotic diseases of dogs in North-west New South Wales and the Northern Territory, Australia. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 238–241, 2017.
- SNELLGROVE, A.N.; KRAPIUNAYA, I.; FORD, S.L.; STANLEY, H.M. *et al.* Vector competence of *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto for *Anaplasma platys*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 6, p. 101517, 2020.
- SOARES, R.; RAMOS, C. A.; PEDROSO, T., *et al.* Molecular survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **An Acad Bras Cienc**, v.89, n.1, p. 301-306, 2017.