

Detección molecular de *Anaplasma platys* en perros de Costa Rica

L. Ábrego^{1*}, G. Dolz², J. Romero², B. Vargas² y A. Meneses³

1. Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud; Departamento de Microbiología, Universidad de Panamá, Panamá.
2. Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
3. Laboratorio de Análisis Clínico, Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional, Costa Rica.

RESUMEN

En este trabajo, se analizó, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), la presencia de *Anaplasma platys*, agente causal de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina (ICCT, infectious canine cyclic thrombocytopenia, por sus siglas en inglés), en sangre de perros de Costa Rica. Se analizaron 300 muestras sanguíneas; 20 provenían de perros con sintomatología sospechosa de ICCT, las restantes 280 muestras se obtuvieron de un banco de sangre, recolectadas previamente de perros con sintomatología sospechosa de erliquiosis. Para cada muestra, se recopiló la siguiente información: ubicación geográfica, época de recolecta, raza, edad y sexo. Las muestras de sangre se analizaron mediante dos ensayos de PCR, uno para amplificar un fragmento del gen 16S ARNr de la familia Anaplasmataceae, y un PCR anidado para amplificar, específicamente, *A. platys*. Un total de 19 (6.3%) muestras resultaron positivas a *A. platys*, lo cual demuestra la presencia del agente en perros de Costa Rica. Una cepa de *A. platys* mostró un 100% de similitud con una secuencia parcial del gen 16S ARNr de *A. platys* (AF156784) publicado en GenBank. El PCR de Anaplasmataceae detectó menor cantidad de muestras positivas a *A. platys* que el PCR anidado; sin embargo, proporcionó evidencia sobre la posible presencia de otras especies de la familia Anaplasmataceae en perros de Costa Rica.

Palabras claves: *Anaplasmaplatys*, Anaplasmataceae, Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina, perros, Costa Rica.

Molecular detection of *Anaplasma platys* in Costa Rican dogs

Abstract

The presence of *Anaplasma platys*, causal agent of infectious canine cyclic thrombocytopenia (ICCT) was analyzed in Costa Rican dogs using a polymerase chain reaction (PCR) assay. A total of 300 blood samples were analyzed; 20 samples were collected from dogs with suspected ICCT, while the other 280 were obtained from blood bank samples previously collected from dogs with suspected ehrlichial infection. The following information was collected for each sample: geographical location, period of sample collection, race, gender, and age. Blood samples were analyzed using two different PCR assays: one to amplify a fragment of the 16S rRNA gene of the Anaplasmataceae family and a nested PCR to specifically amplify *A. platys*. A total of 19 samples (6.3%) were positive for *A. platys*, showing the presence of the agent in dogs in Costa Rica. A strain of *A. platys* showed 100% similarity to a partial sequence of 16S rRNA gene of *A. platys* (AF156784) published in GenBank. Anaplasmataceae PCR detected less samples being positive for *A. platys* than nested PCR; however, this study showed evidence regarding the probable presence of other species of the Anaplasmataceae family in dogs in Costa Rica.

Keywords: *Anaplasma platys*, Anaplasmataceae, Infectious Canine Cyclic Thrombocytopenia, dogs, Costa Rica.

Fecha de recepción: 18 de junio de 2010.

Fecha de aceptación: 30 de agosto de 2011.

Fecha de publicación: 15 de noviembre de 2012.

* Autor para correspondencia: leabrego@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Anaplasma platys fue descrita, por primera vez, en 1978 en Estados Unidos (Harvey et al., 1978), como el agente causal de la trombocitopenia cíclica infecciosa canina (ICCT, infectious canine cyclic thrombocytopenia, por sus siglas en inglés). La enfermedad afecta solamente a caninos. A la fecha, no se ha encontrado en otras especies, incluyendo a los humanos (Gaunt et al., 2010). La bacteria estuvo clasificada dentro del género *Ehrlichia* (*E. platys*), hasta el año 2001, pero hoy, se encuentra en el género *Anaplasma*, perteneciente al orden Rickettsiales y a la familia Anaplasmataceae (Dumler et al., 2001). Este agente rickettsial es Gram negativo, intracelular obligado e infecta plaquetas. Se presenta en forma individual, en pares o grupos llamados mórulas; a su vez, dentro de una vacuola (Foglia et al., 2006). Se sospecha que *A. platys* es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*; sin embargo, el papel de esta garrapata, como vector biológico, no ha sido confirmado (Harvey et al., 1978; Foglia et al., 2006; Dantas-Torres, 2008.).

La infección aguda se caracteriza por una parasitemia en las plaquetas, seguida por episodios de trombocitopenia que ocurren en intervalos de 7 a 14 días (Harvey et al., 1978; Foglia et al., 2006). Algunos reportes indican que los perros infectados, por lo general, no son afectados clínicamente, y rara vez muestran signos relevantes de hemorragia (Gaunt et al., 2010). Sin embargo, otros trabajos han reportado fiebre, anorexia, letargia, depresión, pérdida de peso, descarga nasal mucopurulenta, mucosas pálidas, linfadenomegalia, hiperplasia linfoide, proliferación de macrófagos en nódulos linfáticos, hígado y bazo, hemorragia leve o edema en múltiples órganos, incluida hemorragia intrafolicular del bazo. Además, se mencionan alteraciones sanguíneas diferentes a la trombocitopenia, hematocritos bajos, monocitosis y baja concentración de albúmina. También, se menciona la presencia de garrapatas (Harrus et al., 1997; Eddlestone et al., 2007). La fase crónica de la enfermedad se asocia con parasitemias

esporádicas y trombocitopenias cíclicas (Harvey et al., 1978; Chang and Pan, 1996). La presencia de macroplaquetas es otro hallazgo sanguíneo que se puede presentar en ambas fases (Harvey et al., 1978). Los signos clínicos asociados con ICCT no son específicos; por consiguiente, se dificulta su diagnóstico (Inokuma et al., 2002).

Actualmente, el diagnóstico de la ICCT se basa en la demostración al microscopio de luz de inclusiones basofílicas en plaquetas mediante tinción de Giemsa a partir de un frotis sanguíneo. La detección de la mórula en plaquetas consume mucho tiempo y, usualmente, no es satisfactoria, sobre todo en casos crónicos por la aparición cíclica de las bacterias en las plaquetas (Foglia et al., 2006; Ramos et al., 2009). La detección de anticuerpos, mediante inmunofluorescencia indirecta, es otra metodología de diagnóstico. Parece ser relativamente específica para identificar perros expuestos al agente, pues no se reportan reacciones cruzadas con *Ehrlichia canis*; sin embargo, tiene la desventaja, como toda prueba serológica, que reconoce tanto un animal expuesto al agente, con enfermedad activa, como un animal recuperado, dado que los perros pueden presentar anticuerpos por mucho tiempo (Chang and Pan, 1996; Mathew et al., 1997; Brown et al., 2001). *A. platys* ha sido diagnosticado, mediante esta técnica, en diversas regiones del mundo, tales como: Grecia (Kontos et al., 1991), Japón (Inokuma et al., 2002), Tailandia (Suksawatet al., 2001), España (Sainz et al., 1999) y Venezuela (Arraga-Alvarado et al., 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza, mundialmente, como herramienta en el diagnóstico de enfermedades infecciosas; también, para caracterizar agentes patógenos. *A. platys* ha sido detectado, mediante PCR, en estudios realizados en Estados Unidos (Mathew et al., 1997), China (Chang and Pan, 1996), Japón (Motoi et al., 2001), Australia (Brown et al., 2001; Martin et al., 2005; Brown et al., 2006), Francia (Beaufils et al., 2002), Inglaterra (Sparagano et al., 2003), Venezuela (Huang et al., 2005), Italia (De la Fuente et al., 2006), España (Aguirre et al., 2006), Tailandia

(Pinyoowong *et al.*, 2007) y Brasil (Cardozo *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *A. platys* en perros de Costa Rica mediante PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y tamaño de muestra

Se realizó un estudio observacional, no aleatorio, para detectar la presencia de *A. platys* en muestras de sangre de perros con sintomatología sospechosa de ICCT y erliquiosis, atendidos en clínicas veterinarias de Costa Rica. Para calcular el tamaño de muestra necesario, para detectar el agente, en al menos el 1% de animales en la población, se utilizó la fórmula de Cannon and Roe (1982). La población de perros de Costa Rica se asumió superior a los 350,000; así, con una prevalencia esperada de 1% y un nivel de confianza de 95%, la cantidad de animales por muestrear fue de 300. Un total de 20 muestras fueron remitidas por el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Escuela de Medicina Veterinaria, de casos de perros con sintomatología sospechosa de ICCT y con recuento plaquetario por debajo de 150,000 pks/ μ l. Las restantes 280 muestras se obtuvieron de un banco de sangre recolectado previamente para un estudio de detección molecular de *Ehrlichia* spp., de perros con sintomatología sospechosa (Romero *et al.*, 2011). Para cada muestra se anotó la siguiente información: fecha de recolecta, ubicación de la clínica veterinaria, lugar de procedencia, raza, sexo y edad del perro.

Las 300 muestras fueron sometidas, en forma paralela, tanto al PCR para la familia Anaplasmataceae, como al PCR específico para *A. platys*. Solo se consideraron positivas a *A. platys* las muestras que resultaron positivas al PCR específico para el agente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la extracción de ADN de las muestras de sangre, se utilizó el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®),

siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los productos obtenidos de estas extracciones se guardaron a -20°C hasta su análisis posterior mediante PCR.

PCR para determinar especies de la familia Anaplasmataceae

Las extracciones de ADN se sometieron a un PCR utilizando los cebadores EHR16D (5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3') y EHR16R (5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3), que amplifican un fragmento de 345 pb del gen 16S ARN ribosomal (ARNr) de varias especies de la familia Anaplasmataceae (Inokuma *et al.*, 2000). La mezcla de la reacción fue la siguiente: 12,5 μ l DreamTaq™ PCR Master Mix2X (Fermentas), 12,5 pmol de cada cebador, 7,5 μ l ADN (1.8-116,5 μ g); la reacción se completó con agua grado molecular (Fermentas) para un volumen final de 25 μ l. Se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador: desnaturalización inicial (95°C por 5 min.), 34 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 30 seg.), alineamiento (55°C por 30 seg.), extensión (72°C por 90 seg.) y una extensión final (72°C por 5 min). Como control positivo se utilizó un plásmido construido con la secuencia del gen 16S ARNr de *E. canis*, donado por el Dr. R. Ganta de la Universidad de Kansas, USA, y agua como control negativo.

PCR para determinar la presencia de *A. platys*

Las extracciones de ADN se sometieron, además, a un PCR anidado que amplifica específicamente un fragmento de 678 pb del gen 16S ARNr de *A. platys*, empleando los cebadores 8F (5'-AGTTTGATCATGGCTCAG-3') y 1448R (5'-CCATGGCGTGACGGGCAGTGTG-3) (Martin *et al.*, 2005). Este primer PCR consistió de desnaturalización inicial (94°C por 1 min), 40 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 1 min.), alineamiento (45°C por 1 min.) y extensión (72°C por 1 min. y 40 seg.) y extensión final (72°C por 5 min.). La mezcla de reacción se preparó utilizando 5 μ l de ADN (1,2-77,7 μ g), 12,5 pmol de cada cebador, 12,5 μ l de DreamTaq™

PCR Master Mix 2X (Fermentas) completado con agua grado biología molecular (Fermentas) para llegar a un volumen final de 25 µl. En el segundo PCR se utilizaron los cebadores EHR-16SR y PLATYS (5'-GATTTTGTCTAGCTT-GCTATG-3) (Martin et al., 2005). La mezcla de reacción fue la siguiente: 1 µl de la reacción anterior, 12,5 µl de DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (Fermentas), 12,5 pmol de cada cebador, completado con agua grado biología molecular (Fermentas) hasta llegar a un volumen final de 25 µl. Las condiciones para este PCR fueron: desnaturalización inicial (94°C por 1 min.), 40 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 30 seg.), alineamiento (55°C por 30 seg.) y extensión (72°C por 30 seg.); con una extensión final de 72°C por 5 min. (Martin et al., 2005). Como control positivo se utilizó ADN de una muestra de sangre de perro, positiva a *A. platys*, mediante observación de mórulas en plaquetas y confirmación mediante secuenciación. Como control negativo se usó agua grado biología molecular (Fermentas).

La visualización de los productos amplificados, en el PCR, se realizó en geles de agarosa (1,5%) en amortiguador TBE (0,5X), teñidos con bromuro de etidio y corridos en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 30 min. El marcador utilizado fue ThermoScientificGeneRuler100bp Plus DNA Ladder (Sm0321) Las muestras que generaron una banda de 345 pb se consideraron como positivas a la familia Anaplasmataceae, y las que produjeron una de 678 pb se consideraron como positivas a *A. platys*.

Secuenciación

El producto amplificado de una muestra sanguínea que resultó positiva, en el PCR, para *A. platys*, fue purificada con columnas Centri-con® (Amicon), siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial. La reacción de la secuenciación se realizó de la siguiente manera: desnaturalización inicial de 96°C por 1 min. y 25 ciclos repetidos de desnaturalización (96°C por 10 seg.), alineamiento (50°C por 5 seg.) y extensión (60°C por 4 min) (Martin et al., 2005). La secuencia del producto se determinó

utilizando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1® y el secuenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica. La secuencia obtenida se analizó con el programa ClustalW2 y se comparó con una secuencia parcial del gen 16S ARNr de *A. platys* (AF156784) depositada en GenBank.

RESULTADOS

Detección de *A. platys* mediante técnicas moleculares

De las 20 muestras remitidas por el Laboratorio de Análisis Clínicos, con sospecha de ICCT, siete (35,0%) resultaron positivas en el PCR de Anaplasmataceae; mientras que solamente una (5,0%) resultó positiva a *A. platys*. De las 280 muestras provenientes del banco de sangre recolectado para un estudio de erliquiosis, 124 (44,3%) resultaron positivas en el PCR de Anaplasmataceae, mientras que 18 (6,4%) fueron positivas a *A. platys* (Figura 1).

La comparación de los resultados obtenidos en las dos técnicas, en el análisis de 300 muestras de caninos, se muestra en el Cuadro 1. Hubo coincidencia en el resultado de 178 (59,3%) muestras, determinándose 14 (4,7%) muestras como positivas a *A. platys* y familia Anaplasmataceae; mientras que 164 (54,7%) muestras resultaron negativas a ambos análisis. Un total de 131 (43,7%) muestras resultaron positivas, en el PCR, de Anaplasmataceae; mientras que 19 (6,3%) resultaron positivas en el PCR de *A. platys*. Cinco (1,6%) muestras resultaron positivas para *A. platys*; sin embargo, no fueron detectadas en el PCR para Anaplasmataceae. Un total de 117 (39,0%) muestras resultaron positivas para alguna especie de Anaplasmataceae en el PCR, pero negativas para *A. platys*. De estas 117 muestras, seis muestras formaron parte de las 20 remitidas por el Laboratorio de Análisis Clínicos y 111 provenían del banco de sangre recolectado previamente para el estudio de detección molecular de *Ehrlichia* spp. De las 111 muestras, 61(55%) habían sido diagnosticadas

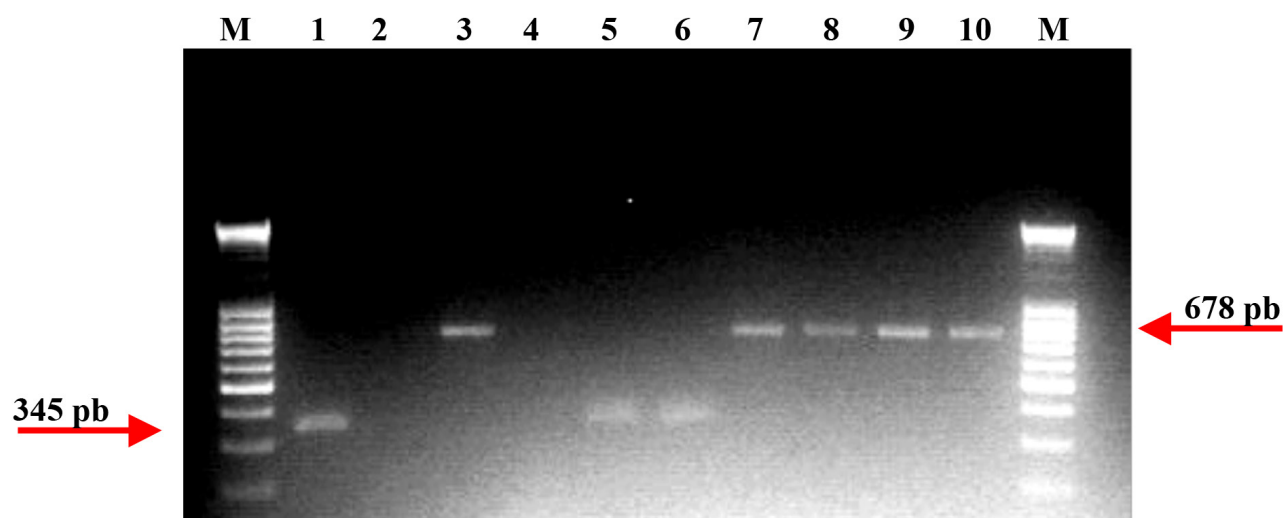


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de los PCR mostrando la presencia de Anaplasmatataceae (amplicón de 345 pb) y *A. platys* (amplicón de 678 pb). M: marcador de peso molecular; 1: control+ Anaplasmatataceae; 2: control-; 3: control+ *Anaplasmaplatys*; 4: control-; 5-6: muestras caninas + Anaplasmatataceae; 7-10, muestras caninas positivas *A. platys* en Costa Rica.

Cuadro 1. Comparación de resultados obtenidos en el PCR para Anaplasmatataceae y en el PCR para *Anaplasma platys* en el análisis de 300 muestras de sangre de caninos de Costa Rica.

PCR para Anaplasmatataceae		PCR para <i>A. platys</i>		
		+	-	Total
-	5 (1,6%)	164 (54,7%)	169 (56,3%)	
Total	19 (6,3%)	281 (93,7%)	300 (100%)	

previamente como positivas a *E. canis* y negativas a *E. chaffeensis* y *E. ewingii* (Romero et al., 2011); adicionalmente siete (2,3%) muestras se determinaron con infecciones mixtas (*E. canis* y *A. platys*).

Se logró secuenciar una muestra que resultó positiva, tanto al PCR, para familia

Anaplasmatataceae, como para *A. platys*. La alineación de esta secuencia arrojó un porcentaje de homología del 100% al compararla con una secuencia parcial del gen 16S ARNr de *A. platys* (AF156784) perteneciente a una cepa aislada de sangre de perro en Guangzhou, China y depositada en GenBank (Figura 2).

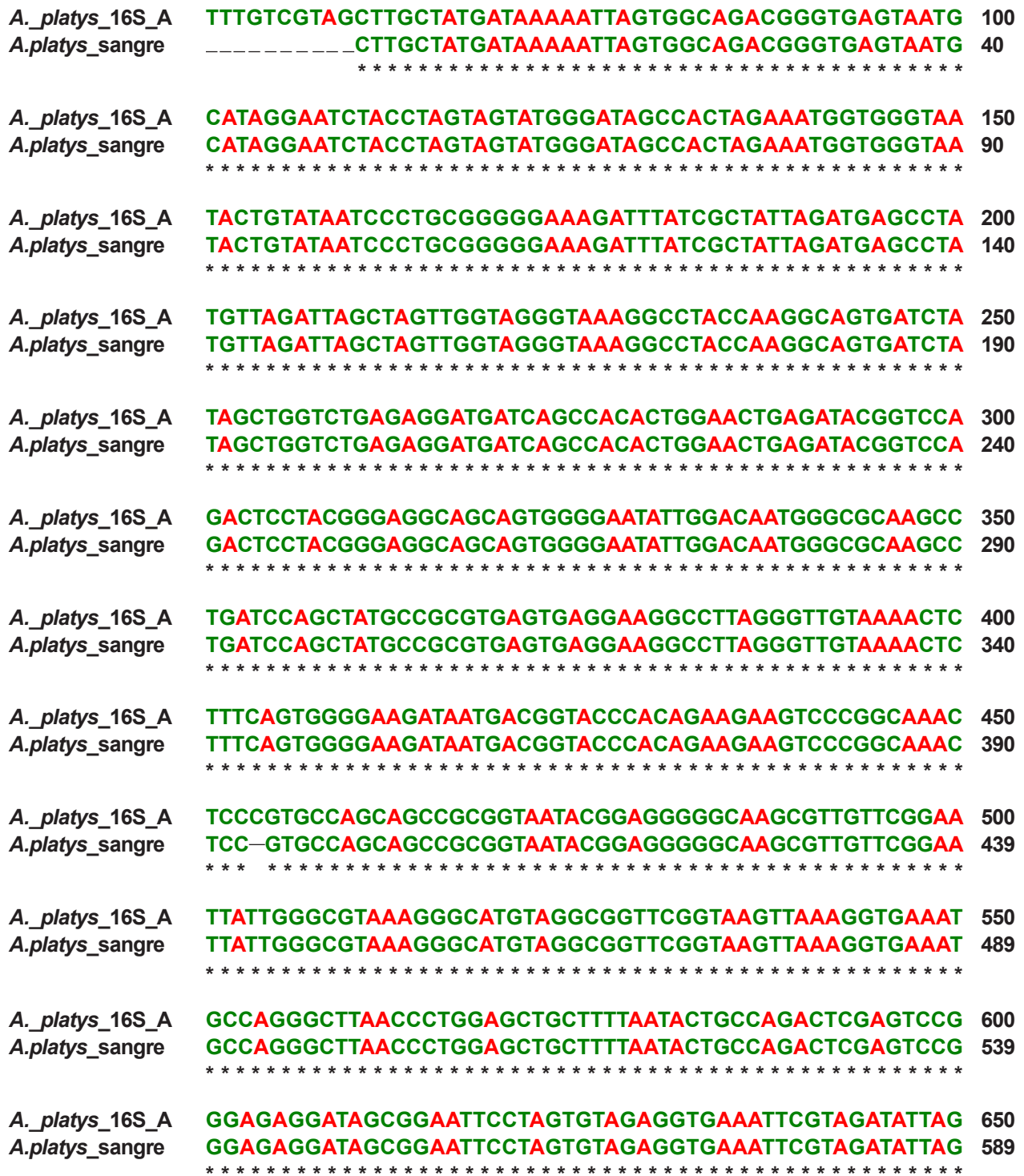


Figura 2. Alineamiento de la secuencia de una muestra de *Anaplasma platys* obtenida de un perro de Costa Rica (secuencia *A. platys_sangre*) y una secuencia parcial del gen 16S ARNr de *A. platys* depositado en el Genbank (*A._platys_16S_A*_ARNr) utilizando el programa ClustalW2.

Descripción de las muestras positivas en la PCR para *A. platys*.

Se detectó muestras caninas positivas a *A. platys*, en PCR, en todas las provincias analizadas: Alajuela (5), San José (6), Heredia (4), Guanacaste (2), Cartago (1). De una muestra no se obtuvo la ubicación geográfica. Las características de los perros, en los cuales se detectó la presencia de *A. platys*, se muestra en el Cuadro 2.

DISCUSIÓN

En el estudio se reporta el diagnóstico de *A. platys* en sangre de perros de Costa Rica, utilizando un PCR anidado. La secuenciación y comparación de homología de la cepa costarricense, con una cepa depositada en GenBank, confirma el hallazgo de la presencia del agente en el país.

El porcentaje de perros diagnosticados como positivos a *A. platys*, en este estudio (6,3%) concuerda con estudios reportados previamente en Venezuela (6%) e Italia (4%) (Huang et al., 2005; De la Fuente et al., 2006). Las muestras de sangre analizadas, de perros positivos a *A. platys*, provenían de clínicas veterinarias de todas las provincias: (Alajuela, San José, Heredia, Guanacaste y Cartago), indicando una distribución amplia del agente en el país,

lo que concuerda, parcialmente, con el estudio realizado por Ábrego (2008), en el cual logró detectar *A. platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* provenientes de perros de Alajuela y Heredia. Es posible que el porcentaje de muestras positivas, obtenidas en el estudio, represente una sobre-estimación de la prevalencia real de infección por este agente, dado que no se trató de un muestreo probabilístico. Sin embargo, se logró el objetivo inicial, establecer la presencia de *A. platys* en perros del país; lo cual justifica realizar futuras investigaciones sobre la prevalencia y distribución del agente en Costa Rica.

La razón por la que el PCR de Anaplasmataceae detectó una gran cantidad de muestras como positivas, que a su vez fueron negativas en el PCR de *A. platys*, se debe, posiblemente, a que la primera técnica permite detectar otras once especies de la familia, además de *A. platys* (Inokuma et al., 2000). En algunas de las muestras positivas se había diagnosticado, previamente, la presencia de *E. canis* (Romero et al., 2011); sin embargo, los resultados positivos obtenidos también indican la presencia de otros agentes de la familia Anaplasmataceae en estos animales, además de *A. platys*, *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* (Allsopp and Allsopp, 2001; Inokuma et al., 2005; Lester et al., 2005).

Cuadro 2. Características de caninos positivos a *Anaplasma platys* en Costa Rica.

Variable	Categoría	n	Muestras Positivas	Porcentaje (%)
Raza	Pelo largo	64	2	3,1
	Pelo mediano	37	4	10,8
	Pelo corto	40	1	2,5
	Sin datos	159	12	7,5
Edad	0-12 meses	22	2	9,1
	13-24 meses	19	1	5,3
	>24 meses	125	6	4,8
	Sin datos	134	10	7,5
Sexo	Macho	116	6	5,2
	Hembra	93	7	7,5
	Sin datos	91	6	6,6

La razón por la que se utilizó dos técnicas moleculares en el 100% de las muestras de este estudio, se debió a que se buscaba incrementar la sensibilidad mediante un procesamiento en paralelo. Los resultados obtenidos, sin embargo, mostraron una sensibilidad analítica disminuída del PCR de Anaplasmataceae para detectar *A. platys*; lo cual previamente había sido reportado por Martín et al. (2005). Por consiguiente, para el diagnóstico molecular de *A. platys*, se recomienda utilizar el PCR anidado.

CONCLUSIONES

El agente infeccioso *A. platys* está presente en perros de Costa Rica. Por tanto, debe ser tomado en cuenta por los médicos veterinarios practicantes en pequeñas especies en el diagnóstico diferencial de enfermedades que afectan el sistema hematopoyético. Es recomendable realizar el diagnóstico molecular de *A. platys* mediante el PCR anidado.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con el estudio de *A. platys* y de ICCT, para establecer prevalencia, distribución y factores de riesgo de infección y de enfermedad por este agente en perros. Además, determinar la posible presencia de otras especies de la familia Anaplasmataceae (p. ej. *A. phagocytophilum*) en Costa Rica.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Rectores (CONARE), por aportar el financiamiento de esta investigación (Fondos del Sistema 2007-2008, proyecto IFEG19, Detección y caracterización molecular de *Ehrlichia* spp. en Costa Rica) y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por la beca de estudio otorgada a Leyda Ábrego. Un especial agradecimiento a todos los veterinarios que participaron en esta investigación.

REFERENCIAS

- Ábrego, L. 2008. Detección de Anaplasmataceae en garrapatas colectadas de perros y *Anaplasma platys* en muestras de sangre de perros de Costa Rica mediante la técnica de PCR (Tesis de M.Sc.) Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional, 48p.
- Aguirre, E., M.A Tesouro, L. Ruiz, I. Amusatogui, and A. Sainz. 2006. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *J. Vet. Med.* 53:197-200.
- Allsopp, M.T.E.P., and B.A. Allsopp. 2001. Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 39:4204-4207.
- Arraga-Alvarado, C., M. Palmar, O. Parra, and P. Salas. 2003. *Ehrlichia platys (Anaplasma platys)* in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections. *Vet Pathol.* 40:149-56.
- Beaufils, J.P., H. Inokuma, J. Martin-Granel, P. Jumelle, M. Barbault-Jumell, and P. Brouqui. 2002. *Anaplasma platys (Ehrlichia platys)* infection in a dog in France: description of the case and characterization of the agent. *Rev. Med. Vet.* 153:85-90.
- Brown, G.K., A.R. Martin, T.K. Roberts, and R.J. Aitken. 2001. Detection of *Ehrlichia platys* in dogs in Australia. *Aust. Vet.* 79:554-558.
- Brown, G.K., P.J. Canfield, R.H. Dunstan, T.K. Roberts, A.R. Martin, C.S Brown, and R. Irving. 2006. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. *Aust. Vet. J.* 84:321-325.
- Cannon, R.M., and R.T. Roe. 1982. *Livestock Disease survey: a field manual for veterinarians.* Australian Government Publishing Service.

- Cardozo, G.P., L.P. Oliveira, V.G. Zissou, I.A.N. Donini, P.G. Roberto, and M. Marins. 2007. Analysis of the 16S rRNA gene of *Anaplasma platys* detected in dogs from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 38:478-479.
- Chang, W.L., and M.J. Pan. 1996. Specific amplification of *Ehrlichia platys* DNA from blood specimens by two-step PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34:3142-3146.
- Dantas-Torres, F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* 152(3-4):173-85
- De la Fuente, J., A. Torina, V. Naranjo, S. Nicosia, A. Alongi, F. La Mantia, and K.M. Kocan. 2006. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC Vet Res* 2:24.
- Dumler, J.S., A.F. Barbet, C.P. Bekker, G.A. Dasch, G.H.S. Palmer, C. Ray, Y. Rikihisa, and F.R. Rurangirwa. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* and *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2145-2165.
- Eddlestone S.M., S.D. Gaunt, T.M. Neer, C.M. Boudreaux, A. Gill, E. Haschke, and R.E. Corstvet 2007. PCR detection of *Anaplasma platys* in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. *Exp Parasitol.* 115:205-10.
- Foglia M.V., S. Cappiello, and G. Oliva. 2006. Tick-transmitted diseases in dogs: clinic pathological findings. *Parasitologia.* 48:135-136.
- Gaunt, S.D., M.J. Beall, B.A. Stillman, L. Lorenzen, P.P.V.P. Diniz, R. Chandrashekar, and E.B. Breitschwerdt. 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit Vector* 3:33.
- Harrus, S., I. Aroch, E. Levy, and H. Bark. 1997. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *Vet. Rec.* 141:247-250.
- Harvey, J.W., C.F. Simpson, and J.M. Gaslin. 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsia-like agent in dogs. *J. Infect. Dis.* 137:182-188.
- Huang, H., A. Unver, M.J. Pérez, N.G. Orellana, and Y. Rikihisa. 2005. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. *Braz. J. Microbiol.* 36:211-216.
- Inokuma, H., D. Raoult, and P. Brouqui. 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 38:4219-4221.
- Inokuma, H., K. Kujii, K. Matsumoto, M. Okuda, K. Nakagome, R. Kosugi, M. Hirakawa, and T. Onishi. 2002. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan. *Vet. Parasitol.* 110:145-152.
- Kontos, V.I., O. Papadopoulos, and T.W. French. 1991. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. *Vet. Clin. Pathol.* 20:101-105.
- Lester, S.J., E.B. Breitschwerdt, C.D. Collis, and B.C. Hegarty. 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *Can. Vet. J.* 46:825-827.
- Martin, A.R., G.K. Brown, R.H. Dunstan, and T.K. Roberts. 2005. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp. Parasitol.* 109:176-180.

- Mathew, J.S., S.A. Ewing, G.L. Murphy, K.M. Kocan, R.E. Corstvet, and J.C. Fox. 1997. Characterization of a new isolate of *Ehrlichia platys* (order *Rickettsiales*) using electron microscopy and polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 68:1-10.
- Motoi, Y., H. Satoh, H. Inokuma, T. Kiyuuna, Y. Muramatsu, H. Uenoand, and C. Morita. 2001. First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol.Immunol.* 45:89-91.
- Pinyoowong, D., S. Jittapalapong, F. Suk-sawat, R.W. Stich, and A. Thamchaipenet. 2007. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. *Infect. Gen. Evol.* 8:433-438.
- Ramos C. A, R.A. Ramos, F.R. Araújo, D.S. Guedes, I. I. Souza, T.M.Ono, A.S. Vieira, D.S. Pimentel, E.O. Rosas, M.A. Faustino, and L.C. Alves. 2009. [Comparison of nested-PCR with blood smear examination in detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 1:58-62.
- Romero, L. E., A. I. Meneses, L. Salazar, M. Jiménez, J. J. Romero, D. M. Aguiar, M. B. Labruna, and G. Dolz. 2011. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Costa Rica, Central America. *Res. Vet. Sc.* 91:95-97.
- Sainz, A., I. Amusatogui, and M.A. Tesouro.1999. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:382-384.
- Sparagano, O. A. E., A.P. de Vos, B. Paoletti, C. Cammá, P. de Santis, D. Otranto, and A. Giangaspero. 2003. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:527-534.
- Suksawat, J., C. Pitulle, C. Arraga-Alvarado, K. Madrigal, S.I. Hancock, and E.B. Breitschwerdt. 2001. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. *J. Clin. Microbiol.* 39:90-93.