

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Letícia dos Santos Petry

**MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA
CIDADE DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Santa Maria, RS
2016

Letícia dos Santos Petry

**MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA CIDADE DE
SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Petry, Leticia dos Santos
MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA
CIDADE DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL /
Leticia dos Santos Petry.-2016.
44 p.; 30cm

Orientadora: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2016

1. Mycoplasma haemofelis 2. \'Candidatus Mycoplasma
haemominutum\' 3. \'Candidatus Mycoplasma turicensis\'
4. Reação em cadeia da Polimerase I. Lopes, Sonia
Terezinha dos Anjos II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Leticia dos Santos Petry. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Fone: (55) 3220-8814 - e-mail: leticiapetry_mv@yahoo.com.br

Letícia dos Santos Petry

**MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA CIDADE DE
SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 18 de fevereiro de 2016:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Silvia Gonzalez Monteiro, Dr^a. (UFSM)

Patricia Wolkmer, Dr^a. (UNICRUZ)

Santa Maria, RS

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Professora Dra. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes pela confiança depositada durante todo o mestrado, e por todos os ensinamentos carinho e amizade;

Aos meus pais Terezinha Petry e Deoclecio Petry, que sempre foram um exemplo de determinação para mim, por todo amor, carinho, apoio e dedicação;

À minha irmã Natália Petry, que sempre será uma inspiração, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao meu namorado Anderson Munari, pelo apoio e companheirismo;

Aos meus amigos Guilherme Lopes Dorneles e Camila Benaduce Emanuelli Mello, pelo carinho, amizade, dedicação, auxílio e companheirismo;

À Dra. Cinthia Melazzo de Andrade pela co-orientação e auxílio durante o mestrado;

À toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias, pela amizade e apoio durante o mestrado. Principalmente à Evelin Dupont, pela dedicação, amizade e apoio, à Daniele Rodrigues e a Márcia Silveira Netto Machado, pela amizade e companheirismo, à Ana Martiele Engelmann e a Diandra Visentini Felin pelo auxílio;

À toda a equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Estresse Oxidativo, pelo apoio e companheirismo;

À Maria, por todo carinho e dedicação a todos os alunos do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM;

À CAPES, por possibilitar a execução deste trabalho por meio da bolsa a mim concedida, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional.

RESUMO

MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA CIDADE DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

AUTORA: Letícia dos Santos Petry
ORIENTADORA: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

A anemia infecciosa felina é uma doença causada por bactérias pertencentes ao gênero *Mycoplasma*, que compreendem um grupo distinto, pois são encontradas aderidas à superfície dos eritrócitos, no entanto, são incapazes de romper a membrana celular. São conhecidas como hemoplasmas ou micoplasmas hemotrópicos. *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, são as espécies capazes de infectar felinos domésticos. A infecção pelos hemoplasmas está presente em quase todos continentes, exceto na Antártida. A doença pode variar de uma forma assintomática a grave e fatal, dependendo da espécie envolvida e da susceptibilidade do hospedeiro. A principal forma de diagnóstico da infecção é através da reação em cadeia do polimerase (PCR), método bastante sensível e específico. O objetivo deste trabalho foi verificar a frequência da infecção por hemoplasmas felinos na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil e, também analisar os parâmetros hematológicos dos animais positivos, assim como o sexo e a idade. Dessa forma, foram analisadas 192 amostras de sangue de felinos domésticos provenientes do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria (LACVet- UFSM). Hemograma, extração de DNA e PCR, para as três espécies de hemoplasmas supracitadas, foram realizados, bem como a análise do histórico clínico, sexo e idade. A frequência total de micoplasmas hemotrópicos encontrada foi de 14,6%, sendo que, 7,83% foram positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’, 4,17% para *Mycoplasma haemofelis*, 1,56% para ‘*Candidatus M. turicensis*’, 0,52% para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *Mycoplasma haemofelis* e 0,52% para ‘*Candidatus M. turicensis*’ e ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Quanto ao sexo 10,95% de amostras infectadas eram de machos, enquanto que 3,65% eram de fêmeas. Os animais até quatro anos de idade foram mais acometidos pela infecção do que os felinos mais velhos e, apenas 3 animais apresentaram anemia, não foram observadas alterações no leucograma dos animais positivos. Sendo assim, foi possível verificar que a infecção causada por estes organismos está presente na cidade de Santa Maria e, que o ‘*Candidatus M. haemominutum*’ é a espécie mais frequente associada à infecção, além disso, os felinos machos e jovens são mais acometidos.

Palavras-chave: *Mycoplasma haemofelis*. ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’. ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. Anemia. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

HEMOTROPHIC MYCOPLASMAS IN DOMESTIC CATS IN THE CITY OF SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

AUTHOR: Letícia dos Santos Petry

ADVISOR: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Feline infectious anemia is a disease caused by bacteria belonging to the genus *Mycoplasma*, comprising a different group since they are found attached to the surface of erythrocytes, however, are unable to break the cell membrane. They are known as hemoplasmas or mycoplasma Hemotrophic. *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', are species capable of infecting domestic cats. Infection by hemoplasmas is present in almost all continents except Antarctica. The disease can vary from asymptomatic to severe and fatal form, depending upon the species involved and host susceptibility. The main tool for diagnosing the infection is by polymerase chain reaction (PCR), highly sensitive and specific method. The objective of this study was to determine the frequency of infection hemoplasmas cats in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, and also analyze the hematological parameters of positive animals, as well as sex and age. Thus, it analyzed 192 blood samples from domestic cats from the Laboratory of Analyzes Clinics Veterinaries at Universidade Federal de Santa Maria (LACVet-UFSM). CBC, DNA extraction and PCR for the three species hemoplasmas above were performed, and the analysis of the medical history, age and sex. The overall frequency of Hemotrophic mycoplasmas found was 14.6%, and, 7.83% were positive for '*Candidatus M. haemominutum*', 4.17% for *Mycoplasma haemofelis*, 1.56% for '*Candidatus M. turicensis*', 0.52% for '*Candidatus M. haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* and 0.52% for '*Candidatus M. turicensis*' and '*Candidatus M. haemominutum*'. The sex 10.95% of infected samples were males, while 3.65% were females. The animals up to four years of age were most affected by the infection than older cats and only 3 animals had anemia, there were no changes in white blood cell count of positive animals. Thus, it observed that the infection caused by these organisms is present in the city of Santa Maria and the '*Candidatus M. haemominutum*' is the most common species associated with infection, in addition, males and young cats are most affected.

Keywords: *Mycoplasma haemofelis*. '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'. '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'. Anemia. Polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Árvore filogenética dos micoplasmas baseada no gene 16S RNA.....	12
Figura 2 – Esfregaço sanguíneo de felino infectado por <i>Mycoplasma haemofelis</i>	13
Figura 3 – Fotomicrografia eletrônica de eritrócitos infectados por <i>Mycoplasma haemofelis</i>	13
Figura 4 – Fotomicrografia eletrônica de eritrócitos infectados por <i>Mycoplasma haemofelis</i>	14
Figura 5 – Gráfico representando a prevalência das três espécies de hemoplasmas em diferentes países.....	16

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

- Tabela 1 – Características dos felinos infectados pelos micoplasmas hemotrópicos, conforme cada espécie, na cidade de Santa Maria, Rio grande do Sul, Brasil.....30
- Tabela 2 – Média e desvio padrão do hemograma de felinos infectados por micoplasmas hemotrópicos, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.....30
- Tabela 3 – Média e desvio padrão do leucograma de felinos infectados por micoplasmas hemotrópicos, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Anemia Infecciosa Felina
16S rRNA	Gene 16S que codifica o RNA ribossômico
<i>Mhf</i>	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
CMhm	‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’
CMt	‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’
PCR	Reação em cadeia da polimerase
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	MANUSCRITO.....	23
	RESUMO.....	24
	ABSTRACT.....	25
	INTRODUÇÃO.....	26
	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
	RESULTADOS.....	29
	DISCUSSÃO.....	30
	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS.....	33
3	CONCLUSÃO.....	38
4	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A anemia infecciosa felina (AIF) é uma doença de patogenicidade variável, causada por bactérias do gênero *Mycoplasma*, pertencentes a classe dos Mollicutes, ordem Mycoplasmatales e família Micoplasmataceae. As espécies que infectam felinos domésticos representam um grupo distinto de bactérias, pois são encontradas associadas à superfície das hemácias, sendo denominadas de hemoplasmas ou micoplasmas hemotrópicos (MESSICK, 2004; HARVEY, 2006). Descrito pela primeira vez em 1942, na África do Sul, o organismo causador da AIF, foi inicialmente nomeado como *Eperythrozoon felis*, contudo, em 1955, através de avaliações morfológicas foi sugerido que este organismo fosse reclassificado, sendo chamado de *Haemobartonella felis* (CLARK, 1942; FLINT, et al., 1959).

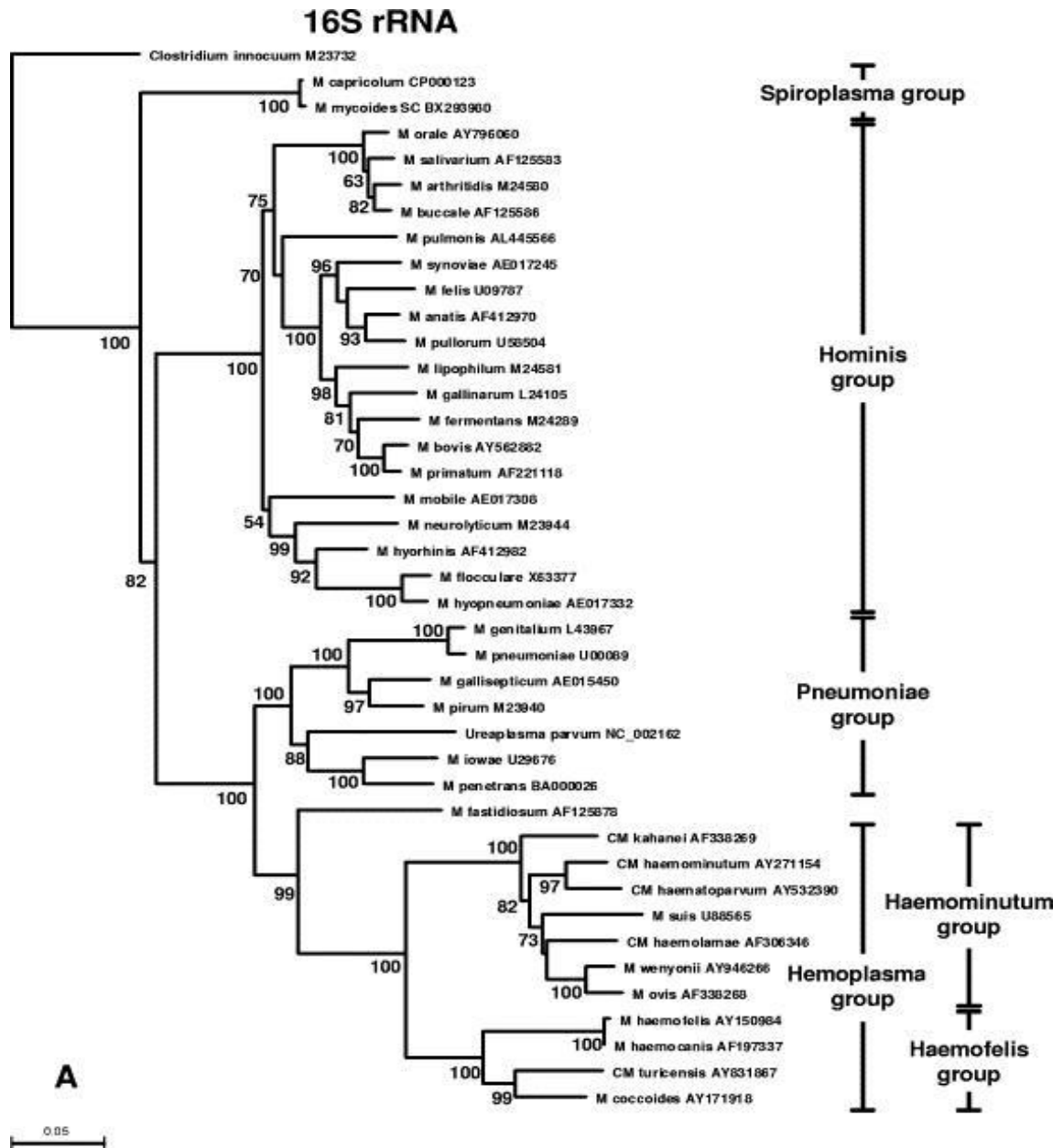
Entretanto, características como ausência de parede celular, flagelos e parasitismo intracelular, além do pequeno tamanho e resistência a penicilina e susceptibilidade a tetraciclina levantavam a suspeita de que este organismo estaria ligado à classe dos Mollicutes. Assim, através de estudos moleculares do gene 16S que codifica o RNA ribossômico (16S rRNA) observou-se a estreita similaridade destes organismos com os micoplasmas e, desta forma, *Haemobartonella felis* foi renomeada como *Mycoplasma haemofelis* (NEIMARK, et al., 2001; BERENT; MESSICK, 2003; TASKER et al., 2003b).

No estado da Califórnia, Estados Unidos, outro organismo epieritrocitário foi detectado em um gato infectado pelo vírus da leucemia felina (FeLV). No entanto, este organismo apresentava menor tamanho e patogenicidade quando comparado ao *Mycoplasma haemofelis*, sendo inicialmente referido como cepa Califórnia ou forma pequena de *H. felis* e, posteriormente denominado como ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (FOLEY et al., 1998). Em 2005, Willi e colaboradores relataram uma terceira espécie, nomeada como ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. Esta foi identificada através de técnicas moleculares, uma vez que, o diagnóstico por avaliação citológica do esfregaço sanguíneo não foi possível. O termo *Candidatus* indica designação provisória, uma vez que, estes organismos ainda não foram completamente descritos (MESSICK; HARVEY, 2011).

Peters e colaboradores (2008), através das sequências do gene 16S rRNA e o Ribonuclease P (RNase P) modificaram as árvores filogenéticas, até então conhecidas. Os hemoplasmas foram realocados em um único grupo, próximo ao *Mycoplasma fastidiosum*, dividido em: Grupo haemominutum, que inclui, dentre outras espécies, o *M. haemominutum*, *M.*

haematoparvum, *M. suis* e o Grupo haemofelis: *M. haemofelis*, *C.M. turicensis*, *M. haemocanis* e *M. coccoides* (Figura 1).

Figura 1- Árvore filogenética dos micoplasmas baseada no gene 16S rRNA.



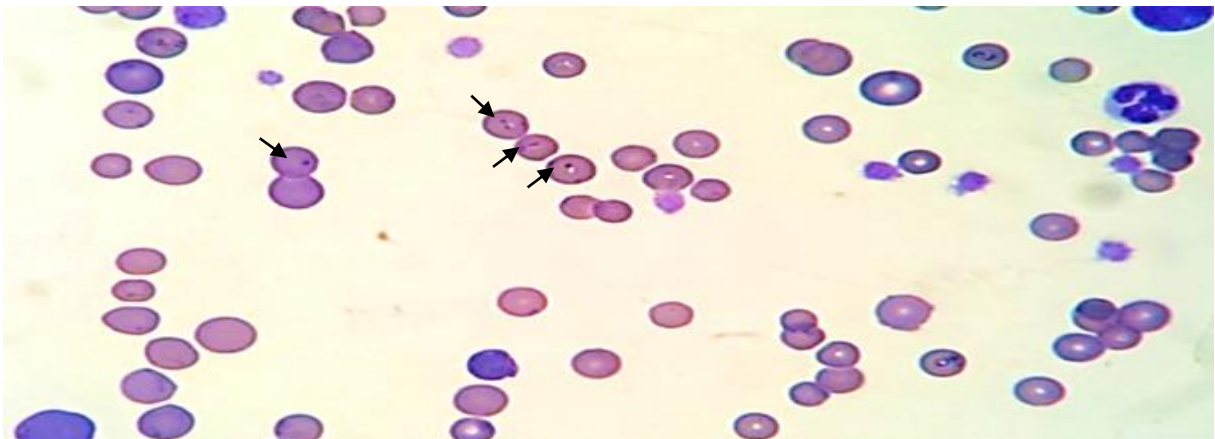
Fonte: (Peters et al., 2008).

Os hemoplasmas são parasitos obrigatórios devido à ausência de vias metabólicas essenciais, sendo dependentes dos nutrientes da célula hospedeira para sobrevivência. Estas bactérias possuem diâmetro variando de 0,2 a 0,5 μm e apesar de não apresentarem parede celular estão geneticamente relacionadas às bactérias gram-positivas, a partir das quais

evoluíram geneticamente por redução, levando a perda de muitos genes e por isso comportam-se como organismos gram-negativos (BROWN, 2011).

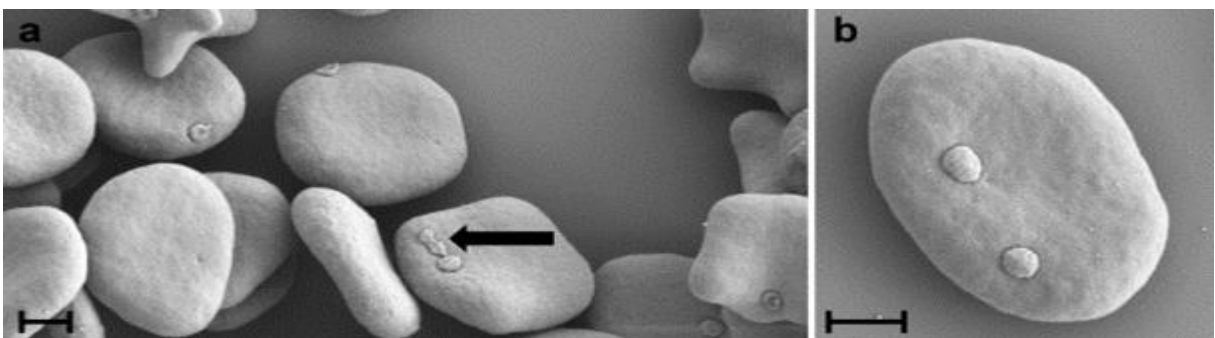
Os micoplasmas são altamente pleomórficos (Figura 2), podendo ser visualizados como cocos, cocobacilos ou hastes e, ainda isolados, dispostos em pares ou agrupados como correntes epicelulares que não invadem os eritrócitos. Além disso, por meio da microscopia eletrônica (Figuras 3 e 4) é possível observar pontos intermitentes de contato destas bactérias com a membrana eritrocitária, não sendo observada erosão da membrana celular, no entanto, a fixação do hemoplasma gera distorção no formato da célula infectada (HARVEY, 2006). A reprodução destes parasitos ocorre através de fissão binária ou brotamento na superfície da hemácia. Estes organismos possuem ribossomos e DNA dupla fita, contendo informações necessárias para replicação, transcrição e síntese proteica (BERENT; MESSICK, 2003). Até o momento, não se obteve sucesso nas tentativas de cultivar estes organismos *in vitro*, assim, técnicas moleculares são fundamentais para o estudo da AIF (MESSICK, 2004; PITCHER; NICHOLAS, 2004).

Figura 2- Esfregaço de sangue periférico com *Mycoplasma haemofelis* na superfície das hemácias (setas), corado pelo método de Romanowsky (aumento de 1000x).



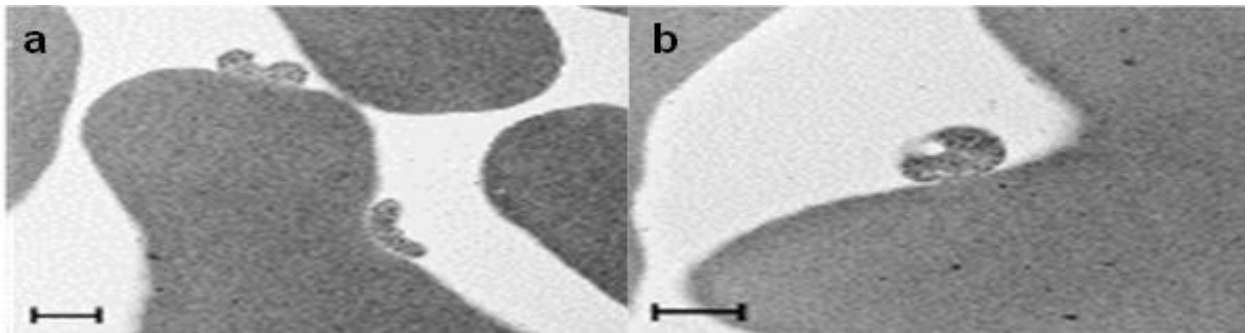
Fonte: (A autora).

Figura 3- Fotomicrografia eletrônica de eritrócitos infectados por *Mycoplasma haemofelis* (a, b), observa-se organismos discóides com cerca de 0,5 μm de diâmetro e, fissão binária na superfície da célula (seta). Barras representam 1 μm .



Fonte: (Willi et al. 2011).

Figura 4- Fotomicrografia eletrônica de eritrócitos infectados por *Mycoplasma haemofelis* 10 dias após a infecção (a, b). Observam-se estruturas aderidas à superfície do eritrócito, mas que não invadem a célula. Barras representam 0,5µm.



Fonte: (Willi et al. 2011).

Embora a transmissão dos hemoplasmas ainda seja pouco compreendida, sabe-se que estes organismos podem ser transmitidos através de transfusão sanguínea com sangue fresco ou estocado, pois os micoplasmas hemotrópicos são capazes de sobreviver por até uma semana em sangue armazenado (GARY et al., 2006; WILLI et al., 2006). Estudos antigos relatam a transmissão de hemoplasmas através da ingestão de sangue contaminado, no volume de 2 a 5mL (FLINT et al., 1959), sendo que, trabalhos recentes tentaram reproduzir a infecção com volumes menores de sangue ingerido e não obtiveram sucesso na tentativa de infecção experimental com ‘*Candidatus M. turicensis*’ nos animais (MUSEUX et al., 2009). Este organismo já foi detectado através da PCR na saliva e fezes de felinos e, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi detectado na saliva e glândula salivar de gatos experimentalmente infectados (WILLI et al., 2007a; DEAN et al., 2008). Em animais com infecção natural foi detectado a presença de *M. haemofelis* isolado e em associação ao ‘*Candidatus M. haemominutum*’ na mucosa oral (BENNETT et al., 2011). A inoculação oro-nasal e subcutânea de saliva contaminada com ‘*Candidatus M. turicensis*’ não levou a infecção nos gatos receptores, obtendo-se positividade apenas com a inoculação subcutânea de sangue infectado (MUSEUX et al., 2009). A transmissão subcutânea de pequenos volumes de sangue contaminado com *M. haemofelis* também foi descrita, confirmando que o comportamento agressivo dos felinos, com contato físico através de arranhaduras e mordeduras, desempenha papel na transmissão dos hemoplasmas (MUSEUX et al., 2009; BAUMANN et al., 2013).

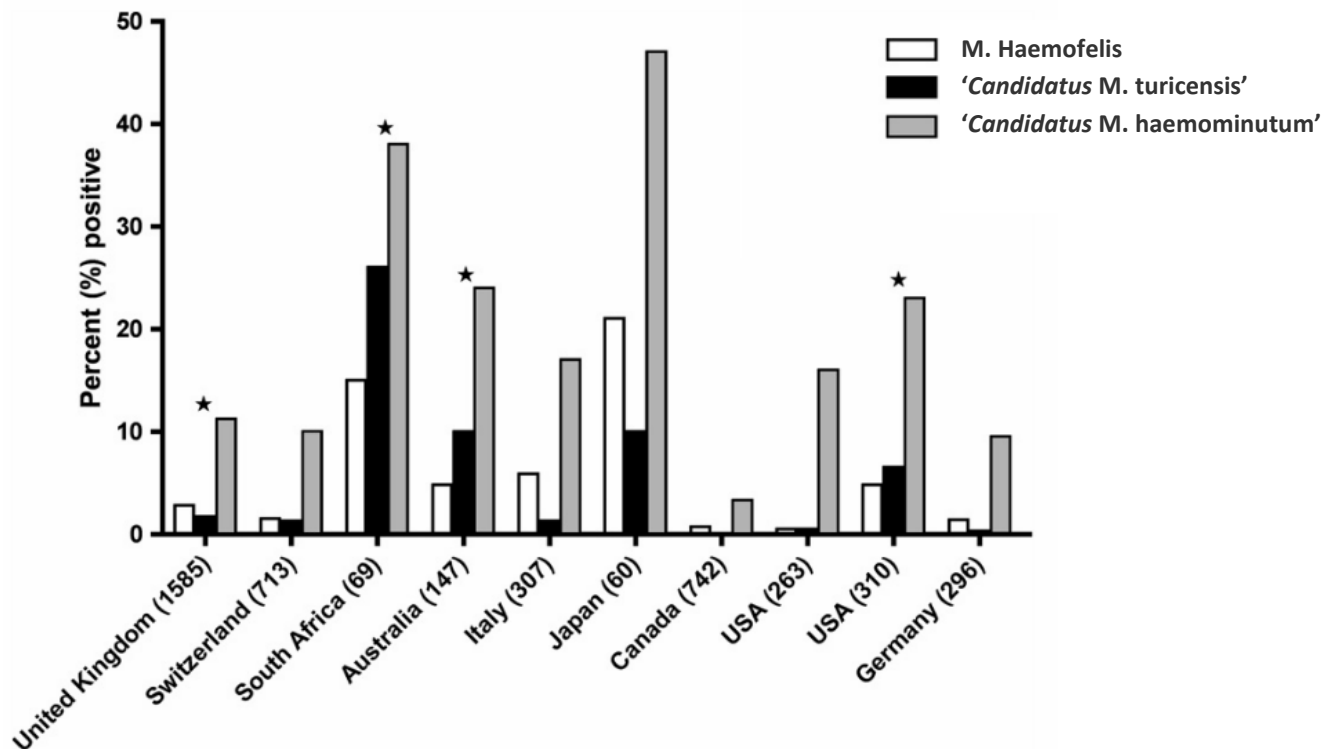
Pulgas têm sido implicadas na transmissão dos micoplasmas hemotrópicos, já tendo sido detectado no seu interior DNA dos organismos responsáveis pela AIF, no entanto, este fato já era esperado devido aos hábitos hematófagos das pulgas (WOODS et al., 2005; WILLI et al., 2007b; KAMRANI et al., 2008). Porém, a infecção pelos hemoplasmas pode ser amplamente difundida em locais onde não há infestação por estes artrópodes (JENSEN, 2001) e a tentativa

de transmitir *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ a felinos através das pulgas apresentou resultados falhos, pois apenas um animal dos 6 estudados apresentou PCR positiva para *M. haemofelis* não desenvolvendo nenhum sinal clínico da doença (WOODS et al., 2005). Especula-se que moscas (*Stomoxys calcitrans*) e mosquitos (*Aedes aegypti*) também possam estar envolvidos na transmissão dos micoplasmas hemotrópicos (NEIMARK et al., 2001). Além disso, os carrapatos são descritos como vetores potenciais dos hemoplasmas, já tendo sido detectado *M. haemofelis* em carrapatos do gênero *Ixodes* na Europa e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ no Japão (SCHABEREITER-GURTNER et al., 2003; TAROURA et al., 2005). Contudo, um estudo que examinou aproximadamente 2.000 carrapatos (*Ixodes spp.*) na Suíça não comprovou esta hipótese (WILLI et al., 2007; WILLI et al., 2010) e muitas infecções são descritas em áreas mesmo com população mínima de carrapato (SYKES et al., 2007). No entanto, a variação na prevalência da infecção em diferentes regiões do mundo corrobora com a hipótese de que os artrópodes atuem como vetores dos hemoplasmas. Ainda, a grande semelhança entre os micoplasmas hemotrópicos encontrados em felinos domésticos e selvagens sugere que estes últimos sejam reservatórios da doença e que os hemoplasmas podem ser transmitidos por artrópodes (WILLI et al., 2007b).

Acredita-se que a transmissão vertical, embora ainda não comprovada, possa ser uma das formas de transmissão, mas não se sabe se ocorre por via transplacentária, durante o parto ou na amamentação (HARVEY, 2006; SYKES, 2010). Segundo Tasker (2010) a transmissão iatrogênica também pode ocorrer, principalmente em ambientes hospitalares, através da manipulação de fômites e em condições inadequadas de higienização e desinfecção de materiais cirúrgicos ou ambulatoriais.

A infecção em gatos domésticos por *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ já foi descrita em todos os continentes, exceto na Antártida (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; SYKES et al., 2008). Estes organismos já foram detectados tanto em felinos domésticos quanto em selvagens (KRENGEL et al., 2013). E, a prevalência da infecção varia conforme a região e a população estudada (Figura 5). Frequentemente a infecção pelo *M. haemofelis* é a menos prevalente, variando de 0,5 a 6%, no entanto em algumas localidades a infecção pelo ‘*Candidatus M. turicensis*’ aparece com menor prevalência. A infecção pelo ‘*Candidatus M. haemominutum*’ é a mais comum dentre as três espécies de hemoplasmas e, é detectado em 1/5 a 1/2 dos animais que visitam hospitais por uma diversidade de razões (SYKES, 2010).

Figura 5- Gráfico representando a prevalência das três espécies de hemoplasmas em diferentes países, felinos foram analisados pela técnica da PCR. Observa-se que independente da porcentagem de animais positivos, o '*Candidatus M. haemominutum*' é a espécie mais prevalente.



Fonte: (Sykes, 2010).

No Brasil diversos trabalhos têm abordado a prevalência dos micoplasmas hemotrópicos e, já foram descritas as três espécies conhecidas capazes de infectar felinos domésticos. Em Botucatu, estado de São Paulo, região Sudeste, estudo comparando 80 gatos saudáveis com 74 gatos doentes, revelou positividade de 10% nos animais sem anormalidades e 20% nos doentes, sendo que, no total de 23 animais positivos, 11 eram *M. haemofelis* positivos, 4 '*Candidatus M. haemominutum*' positivos e 8 infectados por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*', demonstrando a ligação entre doença clínica e a infecção pelo *M. haemofelis* (BATISTA, 2004). Em São Luís, Maranhão, '*Candidatus M. haemominutum*' foi detectado como a espécie mais prevalente (10%), seguido de *M. haemofelis* (2,5%) e '*Candidatus M. turicensis*' (2%) (BRAGA et al., 2012). Em Cuiabá, Mato Grosso, o resultado da detecção da infecção por hemoplasmas foi semelhante ao estudo conduzido em São Luís, pois a espécie mais prevalente encontrada foi '*Candidatus M. haemominutum*' (6,7%), *M. haemofelis* (2,2%) e '*Candidatus M. turicensis*' (0,5%) (MICELI et al., 2013).

Na região Sul do país, em em Porto Alegre, 21,3%, dos 369 gatos testados pela PCR, eram positivos para pelo menos uma das três espécies de hemoplasmas, sendo que, o '*Candidatus M. haemominutum*' era a espécie mais prevalente (13,5%), seguido de '*Candidatus M. turicensis*'

(2,7%) e *M. haemofelis* (2,2%) (SANTOS et al., 2014). Na cidade de Belém, região Norte, um estudo comparando gatos de rua capturados pelo centro de zoonoses, gatos domiciliados e saudáveis e gatos domiciliados e com alguma afecção, totalizando 201 felinos, encontrou prevalência igual a 19,9% e, destes, 7,96% eram positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’, 1,49% *M. haemofelis* e 12,93% ‘*Candidatus M. turicensis*’ (SINEREY et al., 2013). No Rio de Janeiro, de 149 amostras testadas, 10% eram ‘*Candidatus M. haemominutum*’ positivas e 4% *M. haemofelis* positivas (MACIERA et al., 2006; MARICEIRA et al., 2008).

A ocorrência menos frequente de *M. haemofelis* em alguns estudos, provavelmente ocorre devido a diferença na patogenicidade entre estes organismos, pois ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ são menos patogênicos e, dessa forma, mais bem-sucedidos no estabelecimento da relação parasito-hospedeiro, mantendo a infecção sem desencadear doença grave (BIONDO et al., 2009). As diferentes frequências encontradas nos trabalhos realizados no Brasil ocorrem devido a diferença no tipo de população estudada, além disso, parece existir diferença geográfica relacionada a infecção pelos micoplasmas hemotrópicos, já que o Brasil é um país de dimensões continentais com muitas variações climáticas, o que influencia a frequência de vetores, agentes infecciosos e doenças.

Alguns fatores, predispõe a AIF e podem ser considerados. Neste contexto, podemos ressaltar a espécie de micoplasma, pois sabe-se que *M. haemofelis* é mais patogênico do que as outras espécies que afetam felinos, podendo levar a anemia severa e desenvolvimento de sinais clínicos mesmo sem nenhuma infecção concomitante (MESSICK, 2004; SYKES et al., 2008a; TASKER et al., 2009a; AGUIRRE et al., 2009). Em estudo realizado por Berent (2002), anemia foi observada 15 a 17 dias após a infecção experimental com *M. haemofelis* e o hematócrito variou de 15% a 19%, sendo que, durante o pico da parasitemia, 80% dos eritrócitos estavam infectados. A doença apresentou resolução após o tratamento com doxiciclina por 21 dias, no entanto, os animais tornaram-se portadores da doença. A infecção experimental por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ levou ao desenvolvimento de doença aguda com menor gravidade e sinais clínicos mínimos (JENSEN et al., 2001; TASKER et al., 2009). Entretanto, alguns relatos de caso têm descrito anemia hemolítica aguda em gatos domésticos infectados por ‘*Candidatus M. haemominutum*’, sem outra causa aparente para a anemia (LORIMIER; MESSICK, 2004; HORNOK, et al., 2008). Dessa forma, as diferenças na patogenicidade relatadas na infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ podem estar relacionadas a diferentes cepas do agente ou ao número de organismos inoculados, revelando um efeito dose-dependente (WESTFALL et al., 2001). Infecção experimental com ‘*Candidatus M. turicensis*’

em dois gatos, ambos sem doenças concomitantes, resultou em anemia grave em um indivíduo e anemia leve no outro, o animal que desenvolveu anemia grave apresentava-se imunossuprimido devido ao tratamento com glicocorticoides. O pico de parasitemia foi relatado entre os dias 16 e 18 pós-infecção (WILLI et al., 2005).

A presença de retrovírus também podem predispor a AIF, particularmente FeLV, que compromete o sistema imunológico do animal e aumenta a susceptibilidade a infecções secundárias ou ativa infecção latente (SYKES et al., 2008a; TASKER et al., 2009a; BAUMANN et al., 2013). A infecção por *M. haemofelis* e FeLV resulta em quadro clínico mais grave do que o encontrado quando apenas um destes agentes está presente no organismo do animal. Em contrapartida, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) em associação ao *M. haemofelis* não parece desencadear anemias mais graves do que as encontradas nas infecções isoladas destes organismos (HARRUS et al., 2002). Quanto ao '*Candidatus M. haemominutum*', há controvérsias quanto a ligação com as retrovírus, pois Macieira e colaboradores (2008) ressaltam maior associação ao FIV, no entanto, Laberke e colaboradores (2010) descrevem que a infecção pelo FeLV é mais frequente quando se trata '*Candidatus M. haemominutum*' e neste caso, o quadro anêmico é mais grave do que aqueles encontrados em associação ao FIV (GEORGE et al., 2002). Já a infecção pelo '*Candidatus M. turicensis*' ocorre comumente em associação a outros hemoplasmas e em infecções isoladas por este organismo condições imunossupressoras podem aumentar seu potencial patogênico (MESSICK; HARVEY, 2011).

Deve-se, ainda, destacar que a AIF tem sido frequentemente associada ao sexo, no qual, gatos machos são mais afetados do que as fêmeas, o que provavelmente ocorre devido ao comportamento mais agressivo, com inteiração social por brigas, o que acaba expondo os animais aos organismos responsáveis pela infecção. A idade também tem sido descrita como um fator de risco, no entanto, alguns autores sugerem que animais jovens são mais susceptíveis a infecção, provavelmente devido a imaturidade imunológica, enquanto outros afirmam que a idade avançada dos gatos é mais frequentemente associada à infecção. Gatos com acesso à rua e sem raça definida são mais afetados e animais submetidos a condições estressantes, gestação, remoção do baço ou presença de ectoparasitos podem apresentar predisposição a infecção (TASKER et al., 2003a; SYKES et al., 2008).

A micoplasmose pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda compreende o período decorrido entre o primeiro e o último pico de parasitemia e, costuma ser acompanhada de sinais clínicos, que incluem letargia, fraqueza, palidez das mucosas, dispneia,

taquicardia, linfadenopatia, anorexia e icterícia. Outras anormalidades podem ser encontradas no exame físico e incluem hepatomegalia, esplenomegalia, murmúrios cardíacos e febre intermitente, no entanto, animais muito debilitados podem apresentar hipotermia (FOLEY et al., 1998; SYKES, 2003). Esta fase é marcada pela extensa destruição dos eritrócitos, que pode ser intravascular, devido à lesão na membrana das células infectadas, com aumento da fragilidade osmótica, ou extravascular, em órgãos do sistema fagocítico mononuclear. Além disso, auto-aglutinação pode ser observada nos esfregaços sanguíneos dos animais infectados, ocorrendo devido à deposição dos organismos nos eritrócitos, ocasionando a exposição de antígenos na superfície destas células e consequentemente deposição de anticorpos anti-eritrocitários. (MESSICK, 2004; PETERS et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

Normalmente a anemia causada por estes hemoplasmas apresenta caráter regenerativo e, desta forma, pode-se encontrar na análise citológica do esfregaço sanguíneo anisocitose, macrocitose, reticulocitose, policromasia e corpúsculos de Howell-Jolly. Em alguns casos, anemia arregenerativa pode ser encontrada e ocorre devido a coinfeções, como FeLV, ou pelo tempo insuficiente de resposta da medula óssea (KEWISH et al., 2004; TASKER, 2006a).

A fase crônica da micoplasmose normalmente não cursa com sinais clínicos, mas os animais acometidos podem apresentar anemia leve. Devido às características gerais dos micoplasmas, estes são capazes de permanecerem latentes no organismo do animal mesmo após o tratamento específico e, dessa forma, os felinos podem desenvolver doença clínica quando expostos a estresse ou infecções concomitantes que cursam com imunodepressão (BERENT, 2002). A detecção de organismos no interior de vacúolos fagocíticos nos macrófagos esplênicos e pulmonares (MESSICK; HARVEY, 2011) e o sequestro de '*Candidatus M. turicensis*' nos tecidos têm sido apontados como mecanismos responsáveis pela manutenção do estado portador (NOVACCO et al., 2013). Estes fatos não foram confirmados na infecção por *M. haemofelis* e por '*Candidatus M. haemominutum*' (TASKER et al., 2009b; WOLF-JÄCKEL et al., 2012). Além disso, os hemoplasmas tem capacidade de evasão ao sistema imune, o que contribui para o desenvolvimento do estado de portador e, assim, permanecem positivos a PCR durante meses ou anos após a infecção aguda (NOVACCO et al., 2011). O *M. haemofelis* apresenta grande diversidade antigênica, fato provavelmente responsável pela manutenção do parasito no hospedeiro (SANTOS et al., 2011).

Doenças que cursam com anemia e sinais clínicos inespecíficos são descritas como diagnósticos diferenciais da infecção por micoplasmas hemotrópicos e incluem babesiose felina, cytauxzoonose, infecção pelo FIV e/ou FeLV. Clinicamente é difícil diferenciar gatos

portadores de sádios e, dessa forma, testes moleculares como a PCR tornam-se pré-requisito para selecionar animais doadores de sangue, evitando a propagação da infecção pelo *Mycoplasma*, uma vez que este teste é altamente sensível e específico, representando método diagnóstico de eleição. A metodologia da PCR é baseada na amplificação *in vitro* de um fragmento de DNA para detecção de genes específicos. Através desta técnica podem-se detectar tanto animais com doença aguda quanto crônica (NOVACCO et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Contudo, a PCR deve ser realizada antes do início da antibioticoterapia, pois resultados falso-negativos podem ser encontrados durante o tratamento (TASKER, 2006b; MACIEIRA et al., 2009), retornando à positividade aproximadamente uma semana após a suspensão da terapia (FOLEY et al., 1998).

Técnicas moleculares baseadas na PCR em tempo real para detecção de hemoplasmas em felinos têm sido desenvolvidas. Estas técnicas combinam a PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência, mensurando a carga de organismos da amostra e permitindo que os processos de amplificação, detecção de produto amplificado e quantificação de DNA ocorram em uma única etapa, reduzindo risco de contaminação (TASKER et al., 2003b; WILLI et al., 2006; SYKES et al., 2007; COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012) Peters e colaboradores (2008) desenvolveram uma técnica de diagnóstico por PCR em tempo real combinada com um controle interno, utilizado a fim de eliminar resultados falso-negativos.

A análise citológica do esfregaço sanguíneo, único método diagnóstico disponível até pouco tempo e ainda rotineiramente empregado em muitos locais, não apresenta resultados sensíveis e específicos para detecção destes agentes, visto que, '*Candidatus M. turicensis*' nunca foi diagnosticado através deste método e o '*Candidatus M. haemominutum*' raramente é visualizado devido a suas pequenas dimensões. Ainda, apesar da diferença de tamanho entre o '*Candidatus M. haemominutum*' e o *M. haemofelis* estes podem ser confundidos quando se analisa o esfregaço sanguíneo (TASKER et al., 2004; WILLI et al., 2005). Outra problemática deste método deve-se à característica cíclica da parasitemia na infecção pelo *M. haemofelis*, assim a não observação dos hemoplasmas na superfície da hemácia não pode excluir o diagnóstico da infecção. Além disso, a presença do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), utilizado como anticoagulante de rotina, promove o desprendimento dos organismos da superfície dos eritrócitos levando, também, a resultados falso-negativos. Dessa forma, em locais onde a avaliação citológica do esfregaço sanguíneo é a única forma de diagnosticar a infecção por hemoplasmas sugere-se que o esfregaço seja confeccionado com sangue fresco

imediatamente após a coleta. Ainda, resultados falso-positivos também podem ser encontrados, corroborando com a não utilização deste método para o diagnóstico da infecção, pois os organismos do gênero *Mycoplasma sp.* pode ser confundidos com precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly e pontilhados basofílicos (TASKER; LAPPIN, 2002; HARVEY, 2006; SYKES, 2010).

Métodos moleculares são imprescindíveis no diagnóstico da infecção por hemoplasmas, pois a análise citologia do esfregaço sanguíneo apresenta diversas restrições, como descrito anteriormente, que são sanadas com o uso da biologia molecular. Têm-se relatado valores de 0 a 37,5% de sensibilidade para micoplasmas hemotrópicos na análise citológica do esfregaço sanguíneo quando comparado a métodos baseados na pesquisa de material genético de *Mycoplasma sp.*, ressaltando a importância do diagnóstico molecular. Em adição, Macieira e colaboradores (2009) descrevem maior sensibilidade da PCR em relação a análise do esfregaço sanguíneo, no qual, dos 149 felinos avaliados, 18 eram positivos para pelo menos uma das duas espécies de *Mycoplasma* testadas (*M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum* ') e, apenas um revelou positividade na avaliação citológica.

Quanto ao potencial zoonótico, os hemoplasmas já foram descritos como agentes causais de alterações clínicas em humanos, sendo que infecção pelo *M. haemofelis* foi diagnosticada, através da PCR, em paciente humano portador do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (SANTOS et al., 2008). No entanto, alguns casos de infecção por micoplasmas hemotrópicos em humanos já haviam sido descritos, porém diagnosticados apenas pela visualização dos organismos na superfície das hemácias em análise citológica do esfregaço sanguíneo (GRETILLAT; KONARZEWSKI, 1978; YANG et al., 2000; BOSNIC et al., 2010). Acredita-se que pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, portadores de HIV ou que estejam em tratamento com glicocorticoides possam ser mais predispostos a desenvolver a infecção pelos hemoplasmas, entretanto, são necessários mais estudos a fim de comprovar esta hipótese, mas até que haja conhecimento necessário sobre o potencial zoonótico destes agentes é necessário cuidados durante a manipulação de sangue ou tecidos de felinos passíveis de infecção (SYKES, 2010).

Em razão da importância dos hemoplasmas felinos, que muitas vezes passam despercebidos pelo clínico e, também devido à ausência de dados sobre sua presença na cidade de Santa Maria, o objetivo deste estudo foi verificar a taxa de infecção na cidade, bem como, sexo, idade e alterações hematológicas dos animais infectados por estes agentes. Os resultados

serão apresentados na forma de artigo científico intitulado como “Mycoplasmas hemotrópicos em felinos domésticos na cidade de Santa Maria, Rio grande do Sul, Brasil”.

2 MANUSCRITO

Micoplasmas hemotrópicos em felinos domésticos na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Letícia dos Santos Petry^{1*}, Guilherme Lopes Dornelles¹, Camila Benaduce Emanuelli Mello¹, Evelin Dupont¹, Cássia Bagolin da Silva¹, Ana Martiele Engelmann¹, Diandra Visentini Felin¹, Juliana Felipetto Cargnelutti², Andrea Pires do Santos³, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes¹

¹Departamento de Clínica de Pequenos animais da Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, RS 97105-900, Brasil.

² Setor de Virologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, RS 97105-900, Brasil.

³ Departamento de Patobiologia Comparada, Universidade de Purdue, Harrison Street 725, 10947907, Estados Unidos.

*Autor para correspondência: leticiapetry_mv@yahoo.com.br

Artigo a ser submetido para a revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Micoplasmas hemotrópicos em felinos domésticos na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas, são bactérias pertencentes ao gênero *Mycoplasma* e, representam um grupo distinto, pois são encontradas junto à superfície das hemácias, parasitando-as sem romper a membrana eritrocitária. Três espécies de bactérias são descritas na infecção em felinos domésticos e são: *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'. Estes organismos são capazes de levar ao desenvolvimento de doença conhecida como anemia infecciosa felina (AIF), que cursa com anemia leve ou grave, podendo levar a óbito. Os micoplasmas hemotrópicos já foram descritos em vários países, inclusive no Brasil, no entanto, estudos sobre a frequência da infecção no interior do estado do Rio Grande do Sul, até o momento não haviam sido desenvolvidos, deste modo, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença dos hemoplasmas na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, bem como, avaliar as alterações hematológicas, a idade e o sexo dos nos felinos positivos. Sendo assim, um total de 192 amostras de sangue de felinos domésticos provenientes do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria (LACVet- UFSM) foram analisadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), método de eleição para diagnóstico da infecção. O hemograma foi realizado anteriormente à PCR, além disso, a análise do histórico clínico, a idade e sexo dos animais foram avaliados. 14,6% dos felinos testados eram positivos para pelo menos uma espécie de hemoplasma, destes, 7,83% eram positivos para '*Candidatus M. haemominutum*', 4,17% para *Mycoplasma haemofelis*, 1,56% para '*Candidatus M. turicensis*', 0,52% para '*Candidatus M. haemominutum*' e *Mycoplasma haemofelis* e 0,52% para '*Candidatus M. turicensis*' e '*Candidatus M. haemominutum*'. Apenas 3 animais infectados apresentaram anemia e, alterações no leucograma não foram detectadas. A infecção foi mais frequente em machos do que em fêmeas, assim como, em animais jovens, até 4 anos, do que nos felinos mais velhos. Conclui-se que a infecção por micoplasmas hemotrópicos está presente na cidade de Santa Maria, interior do Rio Grande do Sul e a espécie mais prevalente é o '*Candidatus M. haemominutum*'. Além disso, felinos machos e jovens foram mais acometidos pelos hemoplasmas e a PCR mostrou ser uma ferramenta indispensável para diagnosticar a infecção.

Palavras-chave: *Mycoplasma*, anemia, hemoplasma.

ABSTRACT

Hemotrophic mycoplasmas or hemoplasmas, are bacteria belonging to the genus *Mycoplasma* and represent a distinct group as they are found together the surface of red blood cells, parasitizing them without breaking the erythrocyte membrane. Three bacterial species are described in infection in domestic cats and are *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'. These organisms are able to lead to the development of disease known as feline infectious anemia (AIF), which runs with mild or severe anemia and can lead to death. The Hemotrophic mycoplasmas have been described in several countries, including Brazil, however, studies on the frequency of infection in the interior of Rio Grande do Sul state, so far had not been developed, thus the aim of this study was to verify the frequency of hemoplasmas in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, as well as evaluating hematological changes, age and sex of the positive cats. Thus, a total of 192 blood samples from domestic cats from the Laboratory of Analyzes Clinics Veterinaries at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-LACVet) were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) method of choice for diagnosis of infection. The hemogram was carried out prior to PCR, moreover, the analysis of clinical history, age and sex of the animals were evaluated. 14.6% of the tested cats were positive for at least one species of hemoplasma of these, 7.83% were positive for '*Candidatus M. haemominutum*', 4.17% for *Mycoplasma haemofelis*, 1.56% for '*Candidatus M. turicensis*', 0.52% for '*Candidatus M. haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* and 0.52% for '*Candidatus M. turicensis*' and '*Candidatus M. haemominutum*'. Only three infected animals showed anemia and changes in white blood cell count were not detected. The infection was more frequent in males than in females, as well as in young animals up to 4 years than in older cats. We conclude that the mycoplasma infection Hemotrophic is present in the city of Santa Maria, the interior of Rio Grande do Sul and the most prevalent species is the '*Candidatus M. haemominutum*'. Moreover, male cats and young people were most affected by hemoplasmas and PCR proved to be an indispensable tool to diagnose the infection.

Keywords: *Mycoplasma*, anemia, hemoplasma

INTRODUÇÃO

1
2
3 Previamente conhecido como *Eperythrozoon* e *Haemobartonella*, os micoplasmas
4 hemotrópicos ou hemoplasmas são pequenas bactérias epieritrocitárias, altamente
5 pleomórficas. Isolados, dispostos em pares ou agrupados como correntes epicelulares,
6 incapazes de romper a membrana eritrocitária (Harvey, 2006). São parasitas obrigatórios,
7 pois não conseguem sintetizar sua própria energia, nem alguns componentes celulares
8 básicos e, até hoje não se obteve sucesso nas tentativas de cultura *in vitro* (Neimark, 2001;
9 Harvey, 2006).

10 Os hemoplasmas infectam ampla variedade de mamíferos e são encontrados em
11 todo o mundo, exceto na Antártida (SYKES et al., 2008; SYKES et al., 2010). As espécies
12 que afetam felinos domésticos são ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’,
13 *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. A transmissão destes
14 agentes ainda não está completamente elucidada, porém sabe-se que pode ocorrer através
15 de transfusão sanguínea, com sangue fresco ou estocado e acredita-se que a interação
16 comportamental entre felinos, através de brigas, seja um dos meios de transmissão. Além
17 disso, pulgas e carrapatos já foram implicados na transmissão deste organismo, no
18 entanto, este fato ainda não foi comprovado (Woods et al., 2005; Willi et al., 2007).

19 A infecção causada pelos hemoplasmas pode levar a doença aguda ou crônica,
20 variando de uma forma fatal, com extensa destruição dos eritrócitos, a leve e
21 assintomática, dependendo da espécie envolvida e da suscetibilidade do hospedeiro
22 (Messick, 2004; Aguirre et al., 2009). Os sinais clínicos frequentemente encontrados são
23 palidez das mucosas, fraqueza, letargia, dispneia, taquicardia, anorexia, icterícia, febre e
24 em alguns casos hipotermia (Sykes, 2003).

25 O método diagnóstico de eleição da infecção pelos hemoplasmas é a reação em
26 cadeia da polimerase (PCR), no entanto, em muitos locais apenas a análise citológica do
27 esfregaço sanguíneo através da microscopia ótica está disponível, dificultando o
28 diagnóstico da infecção, pois este método apresenta pouca sensibilidade e especificidade.
29 Recentemente, no ano de 2014, Santos e colaboradores descreveram a prevalência da
30 infecção pelos hemoplasmas felinos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,
31 entretanto não existem dados sobre a infecção desta doença em outros locais do estado.
32 Deste modo, objetivou-se detectar a infecção pelos micoplasmas hemotrópicos na região

1 de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, bem como, idade, sexo e parâmetros
2 hematológicos dos animais infectados.

3

4

MATERIAL E MÉTODOS

5

6 Um total de 192 amostras de sangue de felinos domésticos provenientes da rotina
7 clínica do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de
8 Santa Maria (LacVet- UFSM), foram avaliadas no presente estudo. O período de coleta
9 das amostras foi de dezembro de 2014 a setembro de 2015, realizado após aprovação do
10 projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSM, protocolo N° 5142100515.
11 Os dados referentes aos animais como histórico clínico, terapia antimicrobiana e as
12 variáveis sexo e idade foram analisados. Os felinos que haviam recebido tratamento com
13 tetraciclina e/ou fluoroquinolonas antes da coleta de sangue foram descartados do estudo
14 devido a possibilidade de resultados falso-negativos. Hemograma completo e análise
15 citológica do esfregaço sanguíneo, a fim de verificar se havia presença de inclusões
16 compatíveis com os hemoplasmas, foram realizados.

17 A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular e Estresse
18 Oxidativo da Universidade Federal de Santa Maria (Bioox- UFSM), a partir de amostras
19 de sangue congeladas com EDTA, sendo utilizado um protocolo semelhante ao descrito
20 por Rebouças (2008), com algumas modificações, para extração de DNA de sangue total.
21 O método consistiu na separação do DNA das células através da lise celular com Dodecil
22 Sulfato de Sódio (SDS), acrescido de proteinase K e Tris-HCl + EDTA + NaCl (TEN),
23 em seguida, foi realizada a extração com fenol e clorofórmio + álcool isoamílico,
24 separando DNA e proteínas, seguido da precipitação do DNA com álcool absoluto e
25 armazenamento do conteúdo extraído com Tris-HCl + EDTA (TE) e RNase a -20°C até
26 que a PCR fosse executada.

27 A PCR seguiu o protocolo descrito na literatura para detecção das três espécies de
28 *Mycoplasma sp.* estudadas com algumas modificações (Berent et al, 1998; Foley et al,
29 1998; Santos, 2009). O Mix utilizado para cada reação era composto por 0,12 µl de
30 AmpliTaq® DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 2,5 µl de 10X Buffer
31 II® (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 2,25 µl de MgCl₂, 2 µl de dNTPs
32 (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) na concentração de 10 mM, 1 µl de cada primer

1 (*Forward e Reverse*), 14,63 µl de água ultrapura (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e, 1,5
2 µl da amostra, totalizando um volume de 25 µl.

3 Para a amplificação de um fragmento parcial de 393 pares de base (pb) do gene
4 16S rRNA de *M. haemofelis*, a sequência primers utilizada foi *Forward* 5'-3':
5 GACTTTGGTTTCGGCCAAGG e *Reverse* 5'-3':
6 CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC. As condições de reação consistiram de uma
7 etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 95°C, seguida de 39 ciclos de 95°C por 30
8 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (hibridização), 72°C por 50 segundos
9 (extensão) e um passo final, de extensão, a 72 °C por 10 minutos. Já para amplificação
10 de 191 pb do '*Candidatus M. haemominutum*' , foram utilizadas as seguintes sequências:
11 *Forward* 5'-3': GCATAATGTGTCGCAATC-3 e *Reverse* 5'-3':
12 GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC. As condições de reação utilizadas foram iguais as
13 descritas para o *M. haemofelis*, exceto a temperatura de hibridização que foi de 50°C,
14 assim como para a amplificação do '*Candidatus M. turicensis*', no qual, a temperatura
15 desta etapa foi de 55,3°C. E, a sequência utilizada para detecção de 488pb, desta última
16 espécie de *Mycoplasma* foi *Forward* 5'-3': CGAATTGTCGAAAGACAATTA GC e
17 *Reverse* 5'-3': AGAAGTTTCATTCTTGACACAATTTAA. Para cada reação foram
18 incluídos controles positivos, gentilmente cedidos pela Universidade de Purdue, EUA e
19 negativos, água ultrapura. O limite de detecção da PCR foi definido como o menor
20 número de cópias do plasmídeo felino detectado. As curvas padrão foram construídas a
21 partir de amostra com concentração conhecida (10⁷ cópias do plasmídeo) e diluídas com
22 água ultrapura até 1x.

23 Após a amplificação acrescentou-se 2 µl de GelRed® (Unisciense, São Paulo, SP,
24 Brasil) e 4 µl de tampão (composto por 0,25% de azul de bromofenol, 30% de glicerol e
25 água) a 9 µl de cada amostra, este composto foi então submetido a eletrofose em gel de
26 agarose a 1,5% por uma hora e dez minutos a 70 Volts, posteriormente o resultado foi
27 visualizado em um transluminador de luz ultravioleta. Uma escala de 100 pb (Invitrogen,
28 São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada para verificar o tamanho dos produtos amplificados.
29 Previamente à amplificação com os primers das três espécies de *Mycoplasma*, todas as
30 amostras foram testadas para o controle endógeno GAPDH, com a finalidade de
31 confirmar a presença de DNA.

1 Tabela 1. Características dos felinos infectados por micoplasmas hemotrópicos, conforme
 2 cada espécie, na cidade de Santa Maria, Rio grande do Sul, Brasil

	CMhm	Mhf	CMt	CMhm/CMt	CMhm/Mhf	Total
Total de infectados:	15	8	3	1	1	28
Sexo						
Macho	10	7	2	1	1	21
Fêmea	6	0	1	0	0	7
Idade						
≤4 anos	10	6	2	0	1	19
>4 anos	5	2	1	1	0	9
Anemia	1	1	1	0	0	3

3

4 Tabela 2. Média e desvio padrão do hemograma de felinos infectados por micoplasmas
 5 hemotrópicos, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

	Média ± desvio padrão		Valor de referência
Hemácias	7,53±2,19	x 10 ⁶ /μL	5,0 – 10,0
Hemoglobina	10,63±2,96	g/dL	8,0 – 15,0
Hematócrito	32,34±9,13	%	24 – 45
VCM	43,19±4,37	fL	39 – 55
CHCM	32,87±1,12	%	31 – 35

6 Fonte: Laboratório de Análises Clínicas- UFSM

7

8 Tabela 3. Média e desvio padrão do leucograma de felinos infectados por micoplasmas
 9 hemotrópicos, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

	Média ± desvio padrão /μL	Valor de referência
Leucócitos Totais	15.552±6.267	5.500-19.500
Bastonetes	362±128	0 – 300
Neutrófilos segmentados	12.363±6.319	2.500 – 12.500
Linfócitos	1.965±2.207	1.500 – 7.000
Monócitos	490±493	0 – 850
Eosinófilos	815±767	0 – 1.500

10 Fonte: Laboratório de Análises Clínicas- UFSM

11

12

DISCUSSÃO

13

14 A infecção por micoplasmas hemotrópicos felinos já foi descrita em várias regiões
 15 do Brasil, e de acordo com Souza e Almosny (2002) a prevalência no país varia de 5 a
 16 23%. Estudos posteriores conduzidos em Porto Alegre (21,4%) (Santos et al., 2014),

1 Belém (19,9%) (Sinerey et al., 2013) Rio de Janeiro (12,1%) (Macieira et al., 2009) e
2 Jaboticabal (6,5%) (Bartoli et al., 2012) estão de acordo com a prevalência descrita por
3 estes autores. No presente estudo verificou-se que 14,60% dos felinos domésticos
4 avaliados estão infectados por pelo menos uma das três espécies de hemoplasmas felinos.
5 A comparação entre as taxas de infecção encontradas em diferentes trabalhos deve ser
6 realizada com cautela, uma vez que, as diferenças nas populações estudadas, as técnicas
7 de diagnóstico utilizadas e as variações geográficas devem ser levadas em consideração,
8 pois influenciam os resultados. Além do mais, alguns trabalhos não analisam as três
9 diferentes espécies de hemoplasmas felinos, o que acaba dificultado ainda mais a
10 comparação (Duarte et al., 2014; Santos et al., 2014).

11 Assim como no presente estudo, muitos outros trabalhos descrevem
12 ‘*Candidatus M. haemominutum*’ como a espécie mais prevalente (Macieira et al., 2008;
13 Tanahara et al., 2010; Santos et al., 2014). O que pode explicar a ausência de anemia na
14 maioria dos animais positivos em nosso trabalho, pois este agente, assim como o
15 ‘*Candidatus M. turicensis*’, apresenta baixa patogenicidade e, são capazes de manter a
16 infecção sem levar ao desenvolvimento de doença grave (Biondo et al., 2009). Além
17 disso, alguns autores afirmam que a ausência de anemia pode estar ligada à presença de
18 portadores crônicos, principalmente em animais acometidos pelo *M. haemofelis*, espécie
19 mais patogênica, pois nesta fase a relação parasito-hospedeiro parece atingir o equilíbrio,
20 no qual a replicação do agente é estabilizada pela fagocitose e eliminação do organismo,
21 tornando a carga parasitária baixa (Duarte et al., 2014; Santos et al., 2014). Dessa forma,
22 as alterações hematológicas encontradas em apenas 3 felinos, podem ser explicadas pela
23 presença de doenças concomitantes nestes animais, pois dois gatos apresentavam
24 insuficiência renal crônica e um doença hepática, ambas as enfermidades são capazes de
25 levar ao desenvolvimento de anemia (Sinerey et al., 2013; Santos et al., 2014). Infecção
26 por mais de uma espécie de micoplasma hemotrópico foi observado em apenas dois
27 animais, no entanto, ambos não apresentavam alterações laboratoriais.

28 O diagnóstico da infecção pelos hemoplasmas, até pouco tempo era realizado
29 através da análise citológica do esfregaço sanguíneo, método pouco sensível e específico,
30 pois é incapaz de distinguir *M. haemofelis* de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e, o
31 ‘*Candidatus M. turicensis*’, devido a sua pequena dimensão, jamais foi diagnosticado
32 através deste método (Tasker et al., 2004; Willi et al., 2005). Neste estudo não foram

1 detectadas estruturas compatíveis com hemoplasmas na análise citológica do esfregaço
2 sanguíneo, o que pode ser explicado pela baixa parasitemia encontrada em animais
3 portadores de infecção crônica ou devido a presença de ácido etilenodiaminotetracético
4 (EDTA), utilizado como anticoagulante de rotina, que promove o desprendimento dos
5 hemoplasmas da superfície dos eritrócitos, resultando em falso-negativos (Sykes, 2010;
6 Tasker, 2010).

7 A associação entre alterações no leucograma e a infecção pelos micoplasmas
8 hemotrópicos não apresenta padrão definido, podendo variar de leucocitose por
9 neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo a leucopenia, quando os felinos se tornam
10 muito debilitados pela infecção. Alguns animais podem, também, apresentar monócitos
11 ativados (Messik; Harvey, 2011). Em nosso estudo não foram observadas alterações no
12 leucograma, o que pode corroborar com a hipótese de que todos os animais apresentavam
13 infecção crônica.

14 Quanto à idade, alguns autores observaram maior predisposição a infecção por
15 felinos jovens (Sykes et al., 2008), no entanto, outros descrevem maior relação em
16 animais com idade avançada, onde a infecção crônica assume papel importante e, os
17 animais permanecem em estado portador durante anos (Bauer et al., 2008; Santos et al.,
18 2014). A infecção, no presente estudo, foi mais frequente em animais jovens (até 4 anos),
19 o que pode ser observado na tab. 1. Este fato pode estar associado à imaturidade
20 imunológica que os animais jovens apresentam (Duarte et al., 20015).

21 Em relação ao sexo, pode-se observar que os machos foram mais afetados pelos
22 hemoplasmas do que as fêmeas. O DNA dos micoplasmas hemotrópicos já foi encontrado
23 na saliva, glândula salivar, mucosa oral e fezes de felinos, além disso, o desenvolvimento
24 da infecção experimental com inoculação de pequeno volume de sangue sugere que o
25 contato agressivo entre os gatos exerça papel na transmissão do organismo (Willi et al.,
26 2007; Dean et al., 2008; Museux et al., 2009; Bennett et al., 2011). Deste modo, os
27 machos acabam sendo mais acometidos, pois apresentam caracteristicamente maior
28 agressividade influenciada pela presença de diversos hormônios, sendo que, feridas e
29 abscessos por mordeduras e arranhaduras são descritos como fatores de risco associados à
30 infecção (Tasker, 2010).

31

32

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

CONCLUSÃO

Portanto, conclui-se que a infecção por hemoplasmas felinos está presente na região de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Sendo que, a infecção por ‘Candidatus *M. haemominutum*’ é a mais frequente e não houve associação com anemia. Quanto ao perfil dos felinos infectados, detectou-se maior número de machos e jovens com a infecção. Este foi o primeiro trabalho na região retratando a infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, D.H.; THOMPSON, C.; NEUMANN, R. D. et al., Clinical mycoplasmosis outbreak due to *Mycoplasma ovis* in sheep from Shalta, Argentina. *Clinical, microbiological and molecular diagnosis. Rev. Argent. Microbiol.*, v. 41, n. 4, p.212-214, 2009.
- BARTOLI, C.P.; ANDRÉ, M. R.; SEKI, M. C. et al., Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and coinfection with retroviruses in cats subjected to a spying/neutering program in Jaboticabal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 21, n.3, p.219-223, 2012.
- BAUER, N.; BALZER, H.J.; THÜRE S.; MORITZ, A. Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. *J. Feline Med. Surg.* v.10, n. 3, p. 252-258, 2008
- BERENT, L.M.; MESSICK, J.B.; COOPER, SK. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *Am j Vet Res.* v. 59, n. 10, p.1215-1220, 1998.

- 1 BENNETT, A. D.; GUNN-MOORE, D. A., BREWER, M.; LAPPIN, M. R. Prevalence
2 of Bartonella species, haemoplasmas and Toxoplasma gondii in cats in Scotland. *J Feline*
3 *Med Surg*, v.13, n. 8, p.553-557, 2011.
4
- 5 BIONDO, A.W., SANTOS A. P., GUIMARÃES A.M; et al, A review of the occurrence
6 of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 18,
7 n. 3, p. 1-7, 2009.
8
- 9 DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD JONES, T. J.; TASKER, S. Use of real-time
10 PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in
11 the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. *J. Feline Med. Surg.*, v. 10,
12 n.4, p. 413-417, 2008.
13
- 14 DUARTE, A.; MARQUES, V.; CORREIA, J. H. D.; et al. Molecular detection of
15 haemotropic Mycoplasma species in urban and rural cats from Portugal. *J. Feline Med.*
16 *Surg.*, v. 15, n., 6, p. 516-522, 2015.
17
- 18 FOLEY J.E.; HARRUS S.; POLAND A. et al., Molecular, clinical, and pathologic
19 comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am. J. Ve.t*
20 *Res.* v. 59, n.12, p.1581–1588, 1998;
21
- 22 HARVEY J.W. Hemotropic mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In:Greene C. E. ed.
23 Infectious Diseases of the Dog and Cat, 3rd ed. Saint Louis, MO: Elsevier Inc,Elsevier
24 Inc; p. 252-260. 2006
25
- 26 MACIEIRA D.B.; MENEZES R. C. A. A.; DAMICO, C.B. et al., Prevalence and risk
27 factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline
28 immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Feline*
29 *Med. Surg.*, v. 10, n. 2, p. 120-129, 2008.
30
- 31 MACIERA, D.B.; MENEZES R. C. A. A.; DAMICO, C.B. et al., Uso da técnica de
32 southern blot/hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a

- 1 sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. *Rev.*
2 *Bras. Parasitol Vet*, v. 18, p. 1-6, 2009.
- 3
- 4 MESSICK J.B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights
5 into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.*, v.33, n.1, p. 2-13, 2004.
- 6
- 7 MESSICK, J. B.; HARVEY, J. W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In:
8 GREENE, C. E. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th Editio ed. St. Louis:
9 Elsevier Inc., 2011. p. 310-318.
- 10
- 11 MUSEUX, K.; BORETTI F. S.; WILLI B. et al., In vivo transmission studies of
12 '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. *Vet. Res.*, v. 40, n.5, p. 40-45.
13 2009.
- 14
- 15 NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY J.G. Proposal to transfer
16 some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus
17 *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus*
18 *Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus*
19 *Mycoplasma wenyonii*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 891–899, 2001.
- 20
- 21 REBOUÇAS N. A. *Biologia Molecular Aplicada À Medicina*, 2008. Disponível em:
22 <[http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD A-](http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD_A-MEDICINA-FUNDAMENTOS-TEORICOS-E-METODOLOGICIOAS.pdf)
23 [A-MEDICINA-FUNDAMENTOS-TEORICOS-E-METODOLOGICIOAS.pdf](http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICAD_A-MEDICINA-FUNDAMENTOS-TEORICOS-E-METODOLOGICIOAS.pdf)> Acesso
24 em: 22 de dezembro de 2015.
- 25
- 26 SANTOS, A. P.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W. et al, Design, optimization, and
27 application of a conventional PCR assay with an internal control for detection of
28 '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' 16S rDNA in domestic cats from Brazil. *Vet. Clin.*
29 *Pathol.*, v. 38, n. 4, p. 443-452, 2009.
- 30

- 1 SANTOS, A. P.; CONRADO, F. O.; MESSICK, J. B. et al., Hemoplasma prevalence and
2 hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations
3 from Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 23, n. 4, p. 428-434, 2014
4
- 5 SOUZA A.M.; ALMONNY N.R.P. Cytauxzoonose em pequenos animais domésticos e
6 como zoonose. In: Almonny N. R.P. *Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos*
7 *e como Zoonoses*. L.F. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária Editora, 2002, p. 70-78.
8
- 9 SYKES, J. E. Feline Hemotropic Mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). *Vet Clin*
10 *North Am Small Anim Pract*, v. 33, n. 4, p. 773-787, 2003.
11
- 12 SYKES J.E.; TERRY J.C.; LINDSAY L.L.; OWENS S.D. Prevalences of various
13 hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *J Am*
14 *Vet Med Assoc*. v. 232, n.3, p. 372-379, 2008.
15
- 16 SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. *The Vet clin of North America. Small*
17 *animal practice*, v. 40, n. 6, p. 1157-70, 2010.
18
- 19 SINEREY, K. S.; SAMPAIO-JUNIOR, F.D.; SOUSA, L.O. et al., Diagnóstico molecular
20 da infecção por hemoplasmas em gatos domésticos naturalmente infectados da cidade de
21 Belém, Pará. *Pesq. Vet. Bras*, v. 33, n. 9, p.1116-1120, 2013.
22
- 23 TANAHARA M.; MIYAMOTO S.; NISHIO T.; YOSHII Y. et al., An epidemiological
24 survey of feline hemoplasma infection in Japan. *J Vet Med Sci*, v. 72, n.12, p.1575-1581,
25 2010.
26
- 27 TASKER, S. Hemobartonellafelis. In: Lappin, M. R. Segredos em medicina interna
28 felina. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.455-459.
29
- 30 TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? *J. feline*
31 *Med. Surg.*, v. 12, n. 5, p. 369-81, 2010.
32

- 1 WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V. et al., Identification, molecular
2 characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat
3 with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 6, p. 2581-2585, 2005.
4
- 5 WILLI B.; BORETTI F.S.; MELI M.L.; et al., Real-time PCR investigation of potential
6 vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas.
7 *Appl Environ Microbiol*, v. 73, n. 12, p. 3798–802, 2007.
8
- 9 WOODS J.E.; BREWER M.M.; HAWLEY J.R. et al., Evaluation of experimental
10 transmission of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and *Mycoplasma*
11 *haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 66, n.6, p.1008–12. 2005.

3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluiu-se que a infecção por micoplasmas hemotrópicos está presente na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. No entanto, não houve associação entre a infecção e a presença de anemia, alterações no leucograma também não foram detectadas. A espécie mais frequente foi '*Candidatus M. haemominutum*', seguida de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus M. turicensis*'. Os felinos jovens e machos apresentaram maior acometimento pela infecção. Nenhum dos felinos testados havia sido diagnosticado pela análise citológica do esfregaço sanguíneo, desta forma, a reação em cadeia da polimerase (PCR) mostrou ser de extrema importância no diagnóstico da infecção pelos hemosplasmas em felinos.

4 REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, D.H. et al., Clinical mycoplasmosis outbreak due to *Mycoplasma ovis* in sheep from Shalta, Argentina. Clinical, microbiological and molecular diagnosis. **Revista de lá asociación Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 41, n. 4, p.212-214, Out.-Dez., 2009.
- BAUMANN et al., Establishment and characterization of a low-dose *Mycoplasma haemofelis* infection model. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 167, p. 410-416, Dez., 2013.
- BATISTA, T.N. **Frequência de infecção do *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ em gatos (*Felis catus*).** 2004. 44 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2004.
- BENNETT, A. D.; GUNN-MOORE, D. A., BREWER, M.; LAPPIN, M. R. Prevalence of Bartonella species, haemoplasmas and *Toxoplasma gondii* in cats in Scotland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Langford, v.13, n. 8, p.553-557, Ago., 2011.
- BERENT, L. M. **Haemobartonella felis (*Mycoplasma haemofelis*): Molecular Diagnostics and Genomic Studies.** Urbana, Illinois – 2002. 124 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – University of Illinois, Urbana-Champaign, USA, 2002.
- BERENT, L.M.; MESSICK, J.B. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 3657-3662, Jun., 2003.
- BIONDO, A.W. et al, A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 1-7, Jul.- Set., 2009.
- BRAGA, M.S.C.O.et al., Molecular Detection Of Hemoplasma Infection Among Cats from São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 569-575, Abr.- Jun., 2012
- BOSNIC, D. et al., Rare zoonosis (hemotrophic mycoplasma infection) in a newly diagnosed systemic lupus erythematosus patient followed by a *Nocardia asteroides* pneumonia. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.14, n. 1, p. 92–95, Jan.- Fev., 2010.
- BROWN, D. R. et al., Genome Sequences of *Mycoplasma alligatoris* A21JP2^T and *Mycoplasma crocodyli* MP145^T. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n.11, p. 2892-2893, Jun., 2011
- CLARK, R. *Eperythrozoon felis* (sp. nov.) in a cat. **Journal of the South African Veterinary Association**, Durbanville, v. 13, n. 1, p.15-16, 1942.
- COX, M.M., DOUDNA, J.A., O’DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e técnicas.** Porto Alegre: Artmed, 2012. 944 p.

CRIADO-FORNELIO, A. et al., Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 93, n. 4, p.307-317, Jan., 2003.

DEAN, R. S. et al., (2008). Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Langford, v.10, n. 4, p. 413-417, Ago., 2008.

FLINT J.C. et al., Feline infectious anemia. II. Experimental cases. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 20, p.33-40, Jan., 1959.

FOLEY J.E. et al., Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 59, n. 12, p.1581-1588, Dez., 1998.

GEFFEN, C. v. Coinfection with *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in a cat with immune-mediated hemolytic anemia in Belgium. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.81, n. 4, p. 224-228, 2012.

GEORGE, J. W. et al., Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 63, n. 8, p. 1172-1178, Ago., 2002.

GRACE, S.F.; NORSWORTHY, G.D. Hemoplasmosis. In: NORSWORTHY, G.D. et al., **The Feline Patient**. 4. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. Cap. 92, p.218-219.

GARY, A. et al., Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in blood of cats used for transfusions. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Langford, v. 8, n. 5, p. 321-326, Jun., 2006.

GRÉTILLAT, S.; KONARZEWSKI, B. Presence of a prokaryote of the genus *Haemobartonella* Tyzzer and Weinman, 1939, in the blood of Nigerians in the Niamey region. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales**, Paris, v.71, n. 6, p. 412-416, Nov.- Dez., 1978.

GUIMARÃES A. M. S. et al., Comparative Genomics and Phylogenomics of Hemotrophic *Mycoplasmas*. **PLOS one**, São Francisco, v. 9, n. 3, Mar., 2014.

HARVEY J.W. Hemotrophic mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: GREENE C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, 3. ed. Saint Louis: Elsevier, 2006, p.252-260.

HARRUS, S. et al., Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. **Veterinary Record**, Londres, v. 151, n. 3, p. 82-85, Jul., 2002.

HORNOK, S. et al., First molecular identification of 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' from a cat with fatal haemolytic anaemia in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 56, n. 4, p. 441-450, Dez., 2008.

JENSEN W.A. et al., Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 62, n. 4, p. 604-608, Abr., 2001.

KAMRANI A. et al., The prevalence of Bartonella, hemoplasma, and Rickettsia felis infections in domestic cats and cat fleas in Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.72, n. 5, p. 411–419, Out., 2008.

KEWISH, K. E. et al., *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 45, n. 9, p. 749-752, Set., 2004.

KRENGEL, A. et al., First evidence of hemoplasma infection in free-ranging Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 162, 2013, p. 972-976, Mar., 2013.

LABERKE, S. et al., Prevalence of feline hemoplasma infection in cats in Southern Bavaria, Germany, and infection risk factor analysis. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales**, Paris, v.123, p. 42-8, Jan., 2010.

LORIMIER, L.P.; MESSICK, J.B. Anemia associated with 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in a feline leukemia virus-positive cat with lymphoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 40, n. 5, p. 423-427, Set.- Out., 2004.

MACIEIRA, D. B. et al., Hemoplasmas in domestic cats and possible association to feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukemia virus (FELV) in naturally infected animals. **Veterinary Clinical Pathology**, Columbia, v. 35, n. 3, p.368, 2006.

MACIEIRA D.B. et al., Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Langford, v. 10, n. 2, p. 120-129, Abr., 2008.

MACIEIRA D.B., et al., Uso da técnica de southern blot/hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaticabal, v. 18, n. 1, p. 1-6, Dez., 2009.

MESSICK J.B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, Columbia, v.33, n.1, p. 2-13, Mar., 2004.

MESSICK, J. B.; HARVEY, J. W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4. ed. Saint Louis: Elsevier., 2011. p. 310-318.

- MICELI, N.G. et al., Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.3, p. 385-390, Jul.-Set., 2013.
- MUSEUX, K. et al., In vivo transmission studies of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' in the domestic cat. **Veterinary Research**, Schaumburg, v. 40, n. 5, Set.- Out., 2009.
- NASCIMENTO N. C. et al., *Mycoplasma haemocanis* – the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. **Veterinary Research**, Schaumburg, v. 43, n.1, Set., 2012
- NEIMARK H. et al., Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 891–899, Maio, 2001.
- NOVACCO, M. et al., Tissue sequestration of 'Candidatus Mycoplasma turicensis'. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 167, p. 403-409, Dez., 2013.
- NOVACCO, M., et al., Chronic 'Candidatus Mycoplasma turicensis' infection. **Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, n.1, Abr., 2011.
- PETERS I.R. et al., The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real time duplex PCR assays. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 126, p.142-150, Jan., 2008
- PETERS, I. R. et al., Antigen specificity of the humoral immune response to *Mycoplasma haemofelis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, n. 8, p. 1238-1243, Ago., 2010.
- PITCHER D.G.; Nicholas R.A.J. *Mycoplasma* host specificity: Fact or fiction? **The Veterinary Journal**, Londres, v. 170, n. 3, p.300-306, Nov., 2005.
- SANTOS, A. P. et al., Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases journal**, Atlanta, v.14, n. 12, p.1922–1924, Dez., 2008.
- SANTOS, A. P. et al., Genome of *Mycoplasma haemofelis*, unraveling its strategies for survival and persistence. **Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, n.1, p.102, Set., 2011.
- SANTOS, A.P. et al., Hemoplasma prevalence and hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations from Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 23, n. 4, p. 428-434, Out.- Dez., 2014.
- SCHABEREITER-GURTNER C, LUBITZ W, RÖLLEKE S. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdã, v.52, n.2, p. 251–260, Fev., 2003.

SINEREY, K. S. et al., Diagnóstico molecular da infecção por hemoplasmas em gatos domésticos naturalmente infectados da cidade de Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 9, p.1116-1120, Set., 2013.

SYKES J.E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Filadélfia, v. 33, n.4, p. 773-789, Jul., 2003.

SYKES J. E. et al., Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Filadélfia, v. 21, n. 4, p.685-93, Jul.-Ago., 2007.

SYKES J.E., et al., Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association. Ithaca**, v. 232, n. 3, p. 372-379, Fev., 2008.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, Filadélfia, v. 40, n. 6, p. 1157-70, Nov., 2010.

TASKER, S.; LAPPIN, M.R. Haemobartonella felis: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Langford, v. 4, n. 1, p. 3-11, Mar., 2002.

TASKER, S. et al., Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for Mycoplasma haemofelis and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 152, p. 193-198, Fev., 2003a.

TASKER, S. et al., Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: a International study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3877-3880, Ago., 2003b.

TASKER, S. et al., Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using real-time PCR assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Langford, v. 6, n. 6, p. 345-354, Dez., 2004.

TASKER, S. et al., Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infection. **Microbes infection**, Nova Iorque, v. 8, n. 3, p.653-661, Mar., 2006a.

TASKER, S. et al., Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on Mycoplasma haemofelis infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 117, p. 169-179, Out. 2006b.

TASKER S, et al., Description of outcomes experimental infection with feline haemoplasmas: copy numbers, haematology, Coombs testing and blood glucose concentrations. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v.139, Nov., 2009a

TASKER, S. et al., Distribution of *Mycoplasma haemofelis* in blood and tissues following experimental infection. **Microbial Pathogenesis**, Orlando, v.47, n. 6, p.334-340, Dez., 2009b

- TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine And Surgery**, Langford, v. 12, n. 5, p. 369–81, Maio, 2010.
- TAROURA S, et al., Detection of DNA of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Spiroplasma* spp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v. 67, n. 12, p. 1277–1279, Dez., 2005
- WESTFALL D. S. et al., Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.62, n. 5, p. 687-691, Maio, 2001.
- WILLI B. et al., Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 6, p. 2581-2585, Jun., 2005.
- WILLI B., et al., Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 961-969, Mar., 2006.
- WILLI, B. et al., Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 45, n. 4, p. 1159-1166, Abr., 2007a.
- Willi B. et al., Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, n. 12, p.3798–3802, Jun., 2007b.
- WILLI B. et al., Development and application of a universal hemoplasma screening assay based on the SYBR green PCR principle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 12, p. 4049–4054, Out., 2010.
- WILLI B. et al., First morphological characterization of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' using electron microscopy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 149, p. 367-373, Maio, 2011.
- WOLF-JÄCKEL G. A. et al., Quantification of the humoral immune response and hemoplasma blood and tissue loads in cats coinfecting with '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and feline leukemia virus. **Microbial Pathogenesis**, Orlando, v. 53, n. 2, p. 74-80, Ago., 2012.
- WOODS JE, Brewer MM, Hawley JR, et al., Evaluation of experimental transmission of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 66, n. 6, p.1008–1012, Jun., 2005.
- YANG, D., et al., Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 421-426, Out. 2000.