

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO  
FEDERAL**

**FERNANDA DE PAULA FIRMINO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**ESTUDO DA INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO  
FEDERAL**

**FERNANDA DE PAULA FIRMINO**

**ORIENTADOR: GIANE REGINA PALUDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 006 /2008**

**BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO/2008**

DEZEMBRO/2008


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

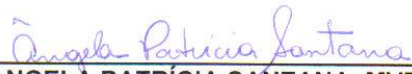
ESTUDO DA INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS DO  
DISTRITO FEDERAL

FERNANDA DE PAULA FIRMINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

  
\_\_\_\_\_  
GIANE REGINA PALUDO, MVD, PhD (Universidade de Brasília - UnB)  
(ORIENTADOR)

  
\_\_\_\_\_  
ANGELA PATRÍCIA SANTANA, MVD, PhD (Universidade de Brasília - UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)

  
\_\_\_\_\_  
NADIA REGINA P. ALMOSNY, MVD, PhD (Universidade Federal Fluminense - UFF)  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 12 de DEZEMBRO de 2008

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FIRMINO, F.P. **Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos do Distrito Federal.** Brasília:Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 67 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Firmino, Fernanda de Paula

Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos no Distrito Federal / Fernanda de Paula Firmino orientação de Giane Regina Paludo– Brasília, 2008. 67p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Hemoplasmose. 2. Felinos domésticos.  
3. Anemia. 4. PCR. I. Firmino, F.P. II. Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos no Distrito Federal.

CDD ou CDU  
Aaris / FAO

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
PREFÁCIO	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I	
Introdução	1
Referencial Teórico	3
Objetivos	11
Referências	12
CAPÍTULO II	
Título do Artigo	16
Introdução	16
Material e Métodos	18
Resultados	22
Discussão	32
Conclusões	36
Referências	37
CAPÍTULO III	
Considerações Finais	41
ANEXOS	42

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Anemias regenerativas e não regenerativas são comuns em gatos. As anemias regenerativas geralmente desenvolvem-se após perda de sangue ou de células sangüíneas já as anemias não regenerativas estão associadas a um elevado número de agentes infecciosos, incluindo o Vírus da Leucemia Felina (FeLV), Vírus da imunodeficiência felina(FIV), coronavírus associado à Peritonite Infecciosa Felina(PIF) e uma variedade de causas não infecciosas como neoplasias, doenças renais, endocrinopatias como Diabete Melito e doenças da medula óssea. A anemia hemolítica está freqüentemente associada com lesão oxidativa às células vermelhas, agentes infecciosos, neoplasias e síndromes imunomediadas primárias. Os agentes infecciosos associados à anemia hemolítica nos gatos incluem *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Cytauxzoon felis* (Ishak et al., 2007).

A *Haemobartonella felis* era conhecida até recentemente como o agente causador da anemia infecciosa felina, porém, com base na análise genética e em similaridades morfológicas do gene 16S RNA, foi reclassificado como *Mycoplasma*, juntamente com o gênero *Eperythrozoon* (Willi et al., 2006). Pelo menos três espécies deste gênero infectam gatos: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*, causando uma doença comumente

conhecida como hemoplasnose. *Mycoplasma haemofelis* é capaz de causar anemia severa em gatos, enquanto *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ainda tem sido associado a doenças imunossupressoras (Sykes et al., 2007). Por outro lado, *Mycoplasma haemofelis* pode também ser considerado um agente oportunista, estando presente em animais sadios e levando a doença quando esses animais são estressados por outras doenças e procedimentos cirúrgicos (Harvey, 2006). Animais de três anos, ou menos, com anemia, FeLV positivos, com histórico de abscessos por mordidas e com acesso a rua fazem parte do chamado “grupo de risco”, animais considerados portanto, susceptíveis a infecção pelos hemoplasmas e outras doenças infecciosas (Jain, 1993). As limitações no estudo da hemoplasnose estavam no fato de que até recentemente o diagnóstico era realizado apenas por meio da identificação citológica em esfregaços sanguíneos. No entanto, o desenvolvimento de novos métodos moleculares tem facilitado a sensibilidade e a especificidade da identificação destes agentes. Ainda pouco se sabe a respeito do *Candidatus Mycoplasma turicensis* (Willi et al, 2005).

O presente trabalho teve por objetivo identificar as espécies infectantes dos felinos domésticos do Distrito Federal por meio da PCR e digestão enzimática e analisar o aspecto hematológicos dos animais estudados infectados ou não por hemoplasma.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Etiopatogenia

*Mycoplasma haemofelis* foi descrito em 1942 por Clark como um eperitroozoon infeccioso de gatos anêmicos no Sul da África, denominado então como sendo da espécie *Eperythrozoon felis*. Em 1953, foi descrito um organismo semelhante causando anemia infecciosa em gatos nos EUA e, finalmente, em 1955 foi classificado como *Haemobartonella felis* (Lappin e Tasker, 2002).

*Mycoplasma haemofelis* é um agente de 0,5 - 0,6 µm Gram - negativo inicialmente classificado como pertencente à família Anaplasmacetae, ordem Rickettsias, não cultiváveis em ágar, chamado de *Haemobartonella felis* (Stoffregen et al., 2006; Foley, 2001; Messick et al., 1998; Berent et al., 1998;). Recentemente, com o seqüenciamento do gene 16S rRNA, o agente foi reclassificado como pertencente à família *Mycoplasmatacetae* (Berent et al., 1998). O microorganismo é altamente pleomórfico (Jain, 1993a) e é parasita obrigatório de eritrócitos (Souza e Almosny, 2002). Uma membrana simples recobre o organismo e o citoplasma é composto de grânulos que variam de tamanho e densidade, podendo ainda ser visualizados organelas e vacúolos no citoplasma (Harvey, 2006). O organismo aparece na superfície

dos eritrócitos, podendo ter formato discóide, de pequenos anéis, hastes, vírgula ou cocos. Frequentemente as formas cocóides aparecem formando correntes cruzando a célula (Souza e Almosny, 2002). O eritrócito parasitado geralmente perde a forma bicôncava e assume a forma de esferócitos e estomatócitos. A adesão do parasita à membrana dos eritrócitos é feita por pontos intermitentes de contato (Harvey, 2006).

O seqüenciamento do gene ribossomal resultou também no conhecimento de duas diferentes espécies: *H. felis* forma pequena, também conhecida como cepa *H.felis California* denominada *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *H. felis* forma grande, também conhecida como cepa *H. felis Illinois* agora denominada *Mycoplasma haemofelis* (Willi et al., 2005; Kewish et al., 2004). A similaridade gênica entre esses organismos é de aproximadamente 83% (Harvey, 2006). Uma nova espécie foi identificada em animais na Suíça, o *Candidatus Mycoplasma turicensis*, associado à relatos de anemia hemolítica severa, que possui filogeneticamente uma maior proximidade com espécies infectantes de roedores como *Mycoplasma haemomuris* e *Mycoplasma coccoides* (Willi et al., 2006; Sykes et al., 2007). Embora incomum, a co-infecção com hemoplasmas vem sendo reportada (Sykes et al., 2007).

O *Mycoplasma haemofelis* contém RNA e DNA e replica por fissão binária. A transmissão pode ocorrer através de artrópodes hematófagos, como pulgas e carrapatos, feridas causadas por mordeduras, transfusão sanguínea e transplacentária (Harvey, 2006). Devido à mobilidade e não-especificidade, a pulga, como a *Ctenocephalides felis*, parece ser o principal vetor (Souza e Almosny, 2002).

A anemia hemolítica causada pelo *Mycoplasma* spp é conhecida também como hemoplasrose. As espécies incluem o prefixo “haemo-” por indicar os únicos mycoplasmas que parasitam eritrócitos. Haemoplasmas foi proposto como um nome geral para esses mycoplasmas hemotrópicos (Harvey, 2006).

A doença foi primeiramente descrita em 1953 por Flint & Moss no Colorado, EUA, que relataram ter notado pequenos corpúsculos arredondados sobre ou aparentemente aderidos às hemácias de um gato infectado naturalmente, que eram similares em aparência ao *Anaplasma marginale* do bovino, exceto por não estarem distribuídos somente na periferia das hemácias onde, como consequência da infecção natural, o gato apresentava-se anorético, debilitado e com marcada anemia (Souza e Almosny, 2002).

O *Mycoplasma haemofelis* pode ser comensal em gatos sãos e a infecção pode resultar em doença aguda quando os gatos infectados são submetidos a condições de estresse ou acometidos por infecções ou doenças concomitantes, como a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), diabetes, dentre outras (Harvey, 2006). Os gatos portadores podem servir como reservatório da infecção. A infecção crônica de animais com *Mycoplasma haemofelis* pode levar a



transformação neoplásica de células hematopoiéticas em gatos com FeLV (Messick, 2004). A hemoplasmosse aguda ocorre em gatos de todas as idades (Harvey, 2006).

Os estudos da hemoplasmosse levaram a classificar os animais em um grupo de risco para a infecção, que são gatos machos, devido aos hábitos de ambulância e luta, não-castrados, com idade avançada, portadores de imunodeficiências (Vírus da leucemia felina, Vírus da Imunodeficiência felina), doenças debilitantes, gatos errantes e com histórico recente de brigas e mordidas. A natureza desses fatores de risco sugerem que a hemoplasmosse pode também ser transmitida pela saliva e a presença de hemoplasmas na saliva de animais infectados, vem sendo reportada (Jain, 1993<sup>a</sup>; Harvey, 2006; Dean et al., 2007).

Infecções experimentais mostraram que as duas principais espécies (*Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*) diferem em sua patogenicidade (Braddock et al., 2004, Tasker et al., 2003). Gatos infectados com *Candidatus Mycoplasma haemominutum* exibem sinais clínicos mínimos, podendo não apresentar anemia (Morais et al., 2007) e não está relacionada à mortalidade, a não ser que esteja associada à infecção pelo vírus da Leucemia Felina (FeLV) ou gatos com doenças imunossupressoras (Harvey, 2006, Sykes et al., 2007), enquanto que infecção com *Mycoplasma haemofelis* resulta em severa anemia hemolítica (Foley, 2001; Messick, 2004; Willi et al., 2005).

Diversos mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da anemia: 1) lesão direta das hemácias, causada pela interação de anticorpos e complemento contra antígeno de *H. felis*; 2) destruição de hemácias, pela exposição de antígenos das próprias hemácias, previamente ocultos e que resultam na produção de anticorpos (hemólise imunomediada); 3) eritrofagocitose, em que as hemácias parasitadas são fagocitadas por macrófagos (monócitos) e destruídas no baço; 4) seqüestro de hemácias (formação de esferócitos, menores e pouco deformáveis, são seqüestrados nos pequenos vasos e destruídos no sistema fagocitário) (Souza, 2003). Além do fato do agente *Mycoplasma haemofelis* parecer infligir dano químico ou físico no eritrócito hospedeiro, o que aumenta a fragilidade osmótica e reduz a meia-vida do eritrócito (Souza e Almosny, 2002).

O grau de anemia varia com o estágio da doença. A fragilidade da membrana dos eritrócitos aumenta com o desenvolvimento da parasitemia e as análises laboratoriais revelam geralmente anemia regenerativa macrocítica e hipocrômica. Gatos inoculados com *M. haemofelis* mostram alterações do hematócrito, hemoglobina e hematimetria durante o período de aparecimento do parasita nos eritrócitos, podendo aumentar ou reduzir repetidamente. A hemoglobina diminui em média para 7 GM/100mL; as hemácias para 1 a 5 milhões/mm<sup>3</sup>. As alterações como anisocitose, macrocitose, basofilia difusa, corpúsculos de Howell-Jolly, reticulócitos e eritroblastos estão quase sempre presentes. A leucometria não apresenta mudança significativa, mas gatos moribundos apresentam leucopenia e gatos com infecção aguda podem apresentar leucocitose. Aparentemente, não há correlação do percentual de

neutrófilos, eosinófilos e linfócitos e a presença de parasitos ou fase da doença. Monocitose e presença de monócitos bizarros são comuns na fase aguda. *Mycoplasma haemofelis* pode induzir neutrofilia extrema. Um exame de medula óssea revela acentuado aumento na eritropoiese e decréscimo na proporção mielóide-eritróide (Souza e Almosny, 2002).

Na fase aguda da hemoplasmose, as mudanças na concentração das proteínas plasmáticas tendem a seguir com as mudanças no hematócrito. O índice de icterícia do plasma aumenta durante a fase aguda e geralmente inicia no mesmo dia ou no dia seguinte que o hematócrito diminui significativamente, devido hemólise (Souza e Almosny, 2002).

### Sinais Clínicos

A infecção pode ser assintomática na doença subclínica com anemia discreta em 25 a 35% dos casos, variando para uma severa anemia hemolítica (Souza, 2003). Os sintomas observados são: depressão, fraqueza, anorexia, perda de peso, palidez de mucosas, esplenomegalia e, às vezes, icterícia. Além disso, podem ocorrer sintomas como febre, gengivite, uveíte, linfadenopatia, refletindo hematopoiese extramedular (ISHAK et al., 2007). Na infecção típica por *Mycoplasma haemofelis* é comum a ocorrência de anemia regenerativa com reticulócitos, anisocitose, macrocitose e policromasia (Lappin e Tasker, 2002). A ausência de anisocitose ou policromasia acentuadas nos casos confirmados de hemoplasmose felina pode sugerir infecções superagudas com um tempo demasiadamente pequeno para responder ou infecção intercorrente com FeLV ou FIV (SOUZA E ALMOSNY, 2002). Os sintomas estão na dependência do estágio da doença e da rapidez com que se desenvolve a anemia. Se a anemia se desenvolver gradualmente, o gato pode exibir perda de peso, mas se mantém vivaz e alerta. Ao contrário, a diminuição precoce acentuada do hematócrito em associação com a parasitemia grave pode causar pouca diminuição de peso corporal, mas uma marcante depressão mental. A temperatura retal é normal, exceto na fase aguda, quando se encontra aumentada e na fase terminal da doença pode se encontrar diminuída (Souza, 2003).

Gatos que se recuperam da infecção aguda se tornam cronicamente infectados por meses ou anos, se não por toda a vida. Gatos portadores estão clinicamente saudáveis, apresentando hematócrito dentro dos valores de referência ou anemia regenerativa leve. Em alguns animais, podem ser detectados um pequeno número de organismos, mas normalmente, estes não são visualizados pelo fato de terem atingido um estágio de equilíbrio com o hospedeiro (Harvey, 2006).

Cabe salientar que o *M. haemofelis* pode ser um agente oportunista, estando presente em animais sadios e levando a doença quando esses animais são estressados por outras doenças e procedimentos cirúrgicos. O aparecimento da doença causada pelo *Mycoplasma haemofelis* em gatos

está intimamente ligado com a infecção destes com o vírus da FeLV, onde, em torno de 40% a 50% dos animais com a clínica de hemoplasmoses são FeLV positivo, pois o FeLV pode suprimir a resposta imunitária dos gatos, aumentando a suscetibilidade do animal. *Mycoplasma haemofelis* e FeLV geralmente resultam em anemia mais severa do que em animais com apenas um dos agentes. Em contraste, a infecção pelo FIV não parece aumentar a gravidade da anemia quando associado ao *Mycoplasma haemofelis* (Harvey, 2006).

Até o presente momento, poucas informações existem a respeito da infecção pelo *Mycoplasma haemominutum*. Uma infecção intensa pode ocorrer sem que o animal apresente grande redução do hematócrito, nos casos de anemia regenerativa. Gatos coinfectados com *Mycoplasma haemofelis*, *M. haemominutum* e FeLV, apresentam anemia mais severa quando comparada a infecção causada apenas por *M. haemominutum*. No entanto, o estresse da infecção por *M. haemominutum* pode levar ao desenvolvimento de anemia (Guimarães et al., 2007) e doença mieloproliferativa em animais com FeLV (Harvey, 2006).

O hemoplasma *Candidatus Mycoplasma turicensis* é ainda pouco estudado (Yu et al., 2007). Até o presente momento, pesquisas mostraram que gatos livres de patógenos infectados experimentalmente com *Candidatus Mycoplasma turicensis* apresentaram anemia de moderada a severa, no entanto experimentos com gatos sugerem que co-fatores como imunossupressões iatrogênicas ou retrovirais, podem estar envolvidos no desenvolvimento da anemia em animais infectados (Willi et al., 2006, Fujihara et al., 2007).

### Diagnóstico

O diagnóstico é, em geral, estabelecido pela visualização do parasita na superfície dos eritrócitos em esfregaços corados de sangue periférico (Inokuma et al., 2004; Lappin e Tasker, 2002). O parasita pode ser encontrado na superfície de eritrócitos isolados, em pares ou em correntes quando há uma alta infecção (Lappin e Tasker, 2002). A ocorrência cíclica da parasitemia em casos agudos pode dificultar a visualização do parasita na lâmina, o que indica que a ausência do parasita não exclui a infecção. Desta maneira, a preparação de múltiplos esfregaços no período de 24 horas ou durante alguns dias pode aumentar as chances de obtenção de um diagnóstico positivo (Lappin e Tasker, 2002). Por outro lado, o agente pode ser confundido com corpúsculos de Howell-Jolly, debris celulares e artefatos, levando a falsos positivos (Lappin e Tasker, 2002). O exame citológico de esfregaço sanguíneo, portanto, possui pouca sensibilidade e especificidade (Sykes et al., 2007). Quando comparado ao *Mycoplasma haemofelis*, o agente *Mycoplasma haemominutum* é raramente visto em esfregaços sanguíneos e quando presente é difícil de ser identificado por ser pequeno (Harvey, 2006). Cabe ainda salientar que os hemoplasmas ainda não podem ser diagnosticados por cultivo celular (Criado - Fornélio et al., 2003; Messick et al., 1998; Berent e Messick, 2003).

A distinção morfológica entre as espécies *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemofelis*, se torna igualmente difícil (Harvey, 2006). O advento da tecnologia da PCR Reação em cadeia da polimerase (PCR) incrementou a habilidade de detectar os hemoplasmas, como uma técnica mais sensível do que o esfregaço sanguíneo (Tasker et al., 2003; Yu et al., 2007). A PCR convencional é capaz de detectar e diferenciar *Mycoplasma haemofelis* do *Candidatus Mycoplasma haemominutum* baseado na amplificação de produtos do gene 16S rRNA (Inokuma et al., 2004; Syakes et al., 2007). Determina, portanto, a presença de um dos hemoplasmas ou uma combinação (co-infecção) deles (Yu et al., 2007).

A técnica da PCR, muito estudada e considerada por muitos a melhor escolha para diagnóstico da infecção por hemoplasmas em gatos (Yu et al., 2003) compreende uma importante e sensível técnica onde um pequeno fragmento de DNA é amplificado exponencialmente até alcançar níveis detectáveis. O DNA produzido pela amplificação do 16S rRNA (RNA ribossomal) foi seqüenciado para o avanço das pesquisas moleculares, como a diferenciação de *Mycoplasma haemofelis* (forma grande) e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (forma pequena) e suas diferentes patogenicidades. A PCR, quando comparada ao exame citológico apresenta uma maior sensibilidade, ao passo que em um estudo comparativo a citologia obteve 37,5% de animais positivos, contra 100% da PCR. A PCR detecta o agente à partir de 8 dias da infecção e 3 dias a 5 semanas após o tratamento com antibióticos, além de detectar animais subclínicos. Isso indica que a interpretação do resultado positivo da PCR deve estar ligada aos sinais clínicos apresentados pelo animal (Lappin e Tasker, 2002).

A ocorrência deste organismo na população felina vem sendo estimada como estando entre 4,9 a 23,3%. Esta flutuação na prevalência desta infecção é pelo menos em parte, um reflexo da ineficiência de métodos atualmente usados para diagnóstico (Souza e Almosny, 2002).

### Tratamento

O tratamento em gatos é feito com Doxiciclina ou tetraciclina administrados durante 3 semanas. As tetraciclinas parecem levar a sinais de intolerância em alguns gatos como febre e problemas gastrintestinais o que levou a estudos para substituir o tratamento nesses gatos por enrofloxacina (10mg/Kg/via oral, uma vez ao dia). Prednisolona ou predinisona em dose imunossupressora (1 a 2mg/Kg, VO, a cada 12 horas), pode ser administrada a gatos com anemias severas para a redução da eritrofagocitose e a dose deve ser reduzida com o aumento do hematócrito. No caso de animais em estado grave, pode haver a necessidade da realização de transfusões sanguíneas, juntamente com tratamento de suporte como fluidoterapia com glicose. É importante salientar que o tratamento antibacteriano reduz ou elimina a parasitemia visível, mas não elimina o parasita do sangue (Harvey, 2006, Souza, 2003).

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- identificar a ocorrência e os agentes causadores da hemoplasmose felina em animais de um mesmo perfil (com contato com a rua e com possíveis vetores da doença) oriundos de diferentes regiões do Distrito Federal.
- determinar as principais alterações hematológicas apresentadas pelos animais infectados e
- verificar a eficiência do exame molecular como método de diagnóstico de animais sintomáticos e assintomáticos.

## REFERENCIAS

BERENT L.M., MESSICK J.B. Physical map and genome survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infection and Immunity.**, v.71,n. 6, p. 3657 – 3662, 2003.

BERENT L.M., MESSICK J.B., COOPER S.K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal Veterinary Reserch.**, vol. 59, n. 10, p. 1215 – 1220, 1998.

BRADDOCK J.A., TASKER S., MALIK R., The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in natural infected cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery.**, vol. 6, p. 161 – 165, 2004.

CRIADO - FORNELIO A., MARTINEZ - MARCOS A., BULING - SARAÑA A., BARBA - CARRETERO J.C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology.**, vol. 93, p. 307 – 317, 2003.

DEAN, R.S., HELPS, C.R. GRUFFYDD JONES, T.J. Use a real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in the salivary glands of haemoplasma-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery.**, vol.10, p.413 – 417, 2008.

FOLEY J. E., PEDERSEN N.C. *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, a low - virulence eperythrocyclic parasite of cats. **Internal Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**., vol. 51, p. 815 – 817, 2001.

FUJIHARA, M., WATANABE, M., YAMADA, T., HARASAWA, R. Occurrence of *Candidatus Mycoplasma turicensis* infection in Domestic Cats in Japan. **Jounal Veterinary Medicine Science**.,vol. 69, n.10, p. 1061 – 1063, 2007.

GUIMARÃES A.M.S., JAVOROUSKI M.L., BONAT M., LACERDA O., BALBINOTTI B., QUEIROZ L.G.P.B., TIMENETSKY J., BIONDO A.W., MESSICK J.B., Molecular detection of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in a lion from a Brazilian Zoológica Garden, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n.3, p. 195 – 196, 2007.

HARVEY J.W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) In: **GREENE C.E. Infectious Diseases of dog and cat**. Terceira edição,p.252 – 260, 2006.

INOKUMA H., TAROURA S., OKUDA M., HISASUE M., ITAMOTO K., UNE S., NAKAICHI M., TAURA Y. Molecular Survey of *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* Infection in Cats in Yamaguchi na Surrounding Áreas. **Journal Veterinary Medicine Science : Parasitology**., vol. 66, n. 8, p. 1017 – 1020, 2004.

ISHAK A.M., RADECKI S., LAPPIN M.R. Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, Bartonella species, Ehrlichia species, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**., vol.9, p. 1 – 7, 2007.

JAIN C.N.. Hemolytic Anemias Associated with Some Infectious Agents. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. Cap. 10, pg. 177 – 192, Philadelphia, 1993.

KEWISH K.E., APPELYARD G.D., MYERS S.L., KIDNEY B.A., JACKSON M.L. *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. **Can Veterinary Journal**., vol.45, p. 749 – 752, 2004.

LAPPIN M.R., TASKER S., *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**., vol. 4, p. 3 – 11, 2002.

MESSICK J.B.Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potencial. **Veterinary Clinical Pathology**., n. 1, p. 5 – 13, 2004.

MESSICK J. B., BERENT L. M., COOPER S.K. Development and Evaluation of PCR - Based Assay for detection of *Haemobartonella felis* in Cats and Differentiation of *H. felis* from Related Bacteria by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal of Clinical Microbiology.**, vol. 36, n. 2, p. 462 – 466, 1998.

MORAIS, H.A., GUIMARÃES, A.M.S., VIDOTTO, O., BAUMANN, A., BIONDO, A.W., MESSICK, J.B., Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in three cats from Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery.**, vol. 9, p.518 – 520, 2007.

SOUZA A.M., Hemobartonelose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses.** Cap. 5, pg. 90 – 109. L.F. Livros. Rio de Janeiro. 2002.

SOUZA H.J.M. Anemia. In: **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina.** Cap. 2, pg. -. L.F. Livros. Rio de Janeiro. 2003.

STOFFREGEN, W. C., ALT, D. P., PALMER, M. V., OLSEN, S. C., WATERS, W. R., STASKO, J. A. (2006). Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (rangifer tarandus). **Journal Wilde Disease.**, v.42, p. 249-258, 2006.

SYKES J.E., DRAZENOVICH N.L., KYLES A.E., BALL L.M., LEUTENEGGER C.M. Detection of mixed infection with “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal Veterinary Diagnosis Investigate.**, n.19, p. 250 – 255, 2007.

TASKER S., HELPS C.R., DAY M.J., HARBOUR D.A., SHAW S.E., HARRUS S., BENETH G., LOBETTI R.G., MALIK R., BEAUFILS J.P., BELFORD C.R., GRUFFYDD-JONES T.J., Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: an International Study. **Journal of Clinical Microbiology.**, p. 3877 – 3880, 2003.

WILLI B., BORETTI F.S., CATTORI V., TASKER S., MELI M.L., REUSCH C., LUTZ H., HOFMANN - LEHMANN R. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology.**, vol. 43, n. 6, p. 2581 – 2585, 2005.

WILLI B., TASKER S., BORETTI F.S., DOHERR M.G., CATTORI V., MELI M.L., LOBETTI R.G., MALIK R., REUSCH C.E., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. Phylogenetic Analysis of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” Isolates from Pets Cats in The United Kingdom, Australia, and South Africa, with Analysis of Risk Factor for Infection. **Journal of Clinical Microbiology.**, vol.44, n.12, p. 4430 – 4435, 2006.

YU D.H., KIM H.W., DESAI, A.R., HAN, I.A., LI Y.H., LEE M.J., KIM I.S., CHAE, J.S., PARK, J. Molecular Detection of Feline Hemoplasma in Feral Cats in Korea. **Journal of Veterinary Medicine Science.**, vol.12, n.69, p. 1299 – 1301, 2007.

## CAPÍTULO II

### ESTUDO DA INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL

#### INTRODUÇÃO

A hemoplasmose é causada pelo *Mycoplasma* spp, um importante agente causador de anemia hemolítica em gatos, principalmente os animais com acesso a rua que entram em contato com um de seus vetores como a pulga (Ishak et al., 2007). As espécies incluem o prefixo “haemo-” por indicar os únicos micoplasmas que parasitam eritrócitos. Foram, portanto, denominados Haemoplasmas, como um nome geral para esses micoplasmas hemotrópicos (Harvey, 2006).



Pelo menos três espécies deste gênero infectam gatos: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* (Peters et al., 2007). *Mycoplasma haemofelis* é capaz de causar anemia severa em gatos, enquanto *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ainda tem sido associado a doenças em gatos imunocompetentes. A terceira espécie, recentemente descoberta, *Mycoplasma turicensis* ainda vem sendo alvo de mais estudos (Sykes et al., 2007; Peters et al., 2007). Em estudo de infecções experimentais, *Mycoplasma haemofelis* é, aparentemente mais patogênico que *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, e no caso deste último, há suspeita da influência de infecções retrovirais em sua manifestação clínica (Willi et al., 2006). Isto tem sido evidenciado pelo fato de que gatos infectados experimentalmente com *Candidatus Mycoplasma haemominutum* exibiram sinais clínicos mínimos, geralmente sem indução de anemia, enquanto infecção por *Mycoplasma haemofelis* frequentemente, resulta em anemia hemolítica severa. Por outro lado, o *Mycoplasma haemofelis* pode ser um agente oportunista, estando presente em animais sadios e levando a doença quando esses animais são estressados por outras doenças e procedimentos cirúrgicos. Cabe salientar que o aparecimento da doença causada pelo *Mycoplasma haemofelis* em gatos está intimamente ligado com a infecção destes com o vírus da FeLV, onde, em torno de 40% a 50% dos animais com a clínica de hemoplasmoses são FeLV positivo, pois o FeLV pode suprimir a resposta imunitária dos gatos, aumentando a suscetibilidade do animal. A associação *Mycoplasma haemofelis* e FeLV geralmente resultam em anemia mais severa do que em animais com apenas um dos agentes (Willi et al., 2005).

O chamado grupo de risco inclui animais de três, ou menos, com acesso a rua, anemia, FeLV positivos, com histórico de abscessos por mordidas (Jain, 1993<sup>a</sup>).

O diagnóstico do *Mycoplasma haemofelis* é, em geral, estabelecido pela visualização do parasita na superfície dos eritrócitos em esfregaços corados de sangue periférico, uma vez que o agente não pode diagnosticado por cultivo celular (Messick et al., 1998; Lappin e Tasker, 2002; Criado - Fornélio et al., 2003; Berent e Messick, 2003; Inokuma et al., 2004). O parasita pode ser encontrado na superfície de eritrócitos em formas isoladas, em pares ou ainda em correntes quando há uma alta infestação. A ocorrência cíclica da parasitemia em casos agudos pode dificultar a visualização do parasita na lâmina, o que indica que a ausência do parasita não exclui a infecção. Desta maneira, recomenda-se a preparação de múltiplos esfregaços no período de 24 ou durante alguns dias para aumentar as chances de obtenção de um diagnóstico positivo. Por outro lado, o agente pode ser confundido com corpúsculos de Howell-Jolly, debris celulares e artefatos, levando a falsos positivos (Lappin e Tasker, 2002). O exame citológico de esfregaço sanguíneo, portanto, possui pouca sensibilidade e especificidade (Sykes et al., 2007).

*Mycoplasma haemominutum* é raramente visto em esfregaço e quando presente é difícil de ser identificado por ser pequeno (Harvey, 2006). É difícil também, a distinção morfológica entre as espécies *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (Harvey, 2006). O advento da tecnologia da incrementou a habilidade de detectar os hemoplasmas, sendo conhecidamente mais

sensível do que a citologia para o diagnóstico (Tasker et al., 2003). A PCR convencional é capaz de detectar e diferenciar o *Mycoplasma haemofelis* do *Candidatus Mycoplasma haemominutum* baseado na amplificação de produtos do gene 16S rRNA (Inokuma et al., 2004; Sykes et al., 2007).

O estudo tem por objetivo identificar animais infectados com *Mycoplasma haemofelis* com o uso da técnica da PCR, além de estudo comparativo de quadro hematológico de animais pertencentes ao grupo de risco da hemoplasmosse de duas populações distintas no Distrito Federal e estudar a eficiência da PCR para das diferentes espécies de hemoplasmas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais e amostras

Foram utilizadas 100 amostras sanguíneas de gatos domésticos colhidas por meio de venopunção da cefálica ou jugular. Foram incluídos nessa amostragem felinos domésticos pertencentes a um grupo de risco para infecção por hemoplasma, ou seja, animais de qualquer idade, com acesso direto a rua, apresentando ou não sintomatologia de hemoplasmosse e animais com sintomatologia de hemoplasmosse, com vetores hematófagos e com diagnóstico laboratorial confirmatório (visualização do agente em esfregaço de sangue fresco). As amostras foram acondicionadas em frascos com anticoagulante (EDTA) e mantidas sob refrigeração até o processamento.

Todos os animais foram submetidos a exame físico para análise de coloração de mucosa e estado geral.

Os 100 animais foram divididos em dois grupos para a análise:

- Grupo 1 : composto de 51 animais, domiciliados no Plano Piloto e regiões urbanas próximas, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília;

- Grupo 2 : composto de 49 animais semi-domiciliados residentes na área da Fercal, região periurbana de Brasília, abordados em suas residências.

## Hematologia

Todas as amostras foram submetidas a hemogramas completos, realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília.

Com a utilização de um contador automático de células para uso veterinário (CC-550 - CELM) foram determinados o número total de hemácias, leucócitos e a concentração de hemoglobina. A quantidade de plaquetas foi estabelecida pela contagem manual em câmara de Neubauer diluídas (1:100) em solução de Brecher (oxalato de amônio 1%). Para a determinação do volume globular (VG) foi utilizada a técnica do micro-hematócrito. As proteínas plasmáticas totais foram determinadas por refratometria. Os índices hematimétricos (concentração de hemoglobina corpuscular média – CHCM e volume corpuscular médio – VCM) foram obtidos por cálculo. O diferencial leucocitário foi realizado manualmente, através da identificação de 100 células em esfregaço sanguíneo corado com corante Panótico, utilizando objetiva de 100 vezes.

Todas as amostras foram submetidas à pesquisa de hemoparasita, realizada por meio de exame citológico (esfregaço sanguíneo) e Reação de Polimerase em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction* - PCR).

Após a realização dos hemogramas, o restante do sangue foi centrifugado (2500 rpm/5min) para a separação do plasma e da capa de células. Tanto o plasma quanto a capa de células foram congelados (-20° C) até o momento da extração do DNA e realização da PCR.

## Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A extração do DNA foi realizada utilizando-se kit comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit - Qiagen), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras de DNA foram mantidas a -20° C até o momento da realização da PCR.

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos para a identificação dos hemoplasmas de acordo com o gênero (*Mycoplasma* spp) e espécie (*Mycoplasma haemofelis*). Os animais de ambos os grupos foram testados. Onde para a realização da PCR Universal *Mycoplasma* spp. Foram utilizados os oligonucleotídeos: HBT-F e HBT-R (Tabela 1) conforme descrito por Criado-Fornélio et al (2003). As reações consistiram de aproximadamente 2 ng de DNA, 1X tampão de PCR, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo e 1,0U de Taq DNA polimerase resultando em um volume final de 50µL. A PCR foi realizada em um termociclador (FTGene5D – Techgene) utilizando-se o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94° C por dez minutos, seguida de 40 ciclos: 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos e posterior extensão final 72° C por dez

minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.0%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta resultando em produtos de 595pb para fragmento de *Mycoplasma haemofelis* e 618pb para fragmento de *Mycoplasma haemominutum* nos animais positivos. Foram utilizados controles negativo (água) e positivo (DNA de gato doméstico positivo para *Mycoplasma* spp.).

Os produtos de PCR obtidos de animais positivos no PCR Universal, foram submetidos à digestão enzimática com a enzima *EcoRI* (REact® - Invitrogen, EUA) que produz dois fragmentos, 269 pb e 349 pb, para determinação da infecção pela espécie *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, a enzima não é capaz de cortar produtos de *Mycoplasma haemofelis*, conforme descrito por Criado-Fornélio et al (2003). A reação consistiu em 1,0 unidade da enzima *EcoRI*, tampão 10X apropriado, 1µg de produto de PCR, resultando em um volume final de 15 µL (Brooks, 1987). A solução foi mantida em banho-maria a 37°C por duas horas e submetida à eletroforese em gel de agarose 1.5%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

Para a reação da PCR foram utilizados os oligonucleotídeos FI e R3 (Tabela 1), específicos para o gene 16S rRNA do hemoplasma *Mycoplasma haemofelis*, conforme descrito por Berent et al (1998). As reações consistiram de aproximadamente 10 ng de DNA, 1X tampão de PCR, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,6 µM de cada oligonucleotídeo e 1,5U de Taq DNA polimerase resultando em um volume final de 25µL. A PCR foi realizada em um termociclador (FTGene5D – Techgene) utilizando-se o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94° C por dez minutos, seguida de 40 ciclos: 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e posterior extensão final 72°C por sete minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.5%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta resultando em um produto de 393pb nos animais positivos. Para cada reação utilizaram-se controles negativo (água) e positivo (DNA de gato doméstico com hemoplasmosse).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados para as PCRs para *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma haemominutum*

Oligonucleotídeos	Seqüência	Fonte
HBT-F	ATA CGG CCC ATA TTC CTA CG	Criado-Fornélio et al., 2003
HBT-R	TGC TCC ACC ACT TGT TCA	Criado-Fornélio et al., 2003
FI	GAC TTT GGT TTC GGC CAA GG e R3: CAG AGT ACT ATC ATA ATT ATC CCT C	Berent et al., 1998
R3	CAG AGT ACT ATC ATA ATT ATC CCT C	Berent et al., 1998

Para a padronização das técnicas de PCR foram utilizadas amostras de DNA de gatos domésticos com diagnóstico laboratorial positivo para hemoplasmosose confirmado por meio da visualização do agente em esfregaço sanguíneo. As condições da PCR foram determinadas experimentalmente.

Os produtos de PCR de animais que apresentaram bandas dentro do tamanho esperado, 400pb para animais positivos para *Mycoplasma haemofelis*, e 600 pb para animais positivos para *Mycoplasma* spp com digestão enzimática positiva, foram encaminhados para seqüenciamento, para confirmação dos resultados obtidos.

Foram considerados como animais positivos para hemoplasmosose aqueles com resultado positivo na pesquisa do agente em esfregaço sanguíneo e/ou na PCR.

#### Análise Estatística

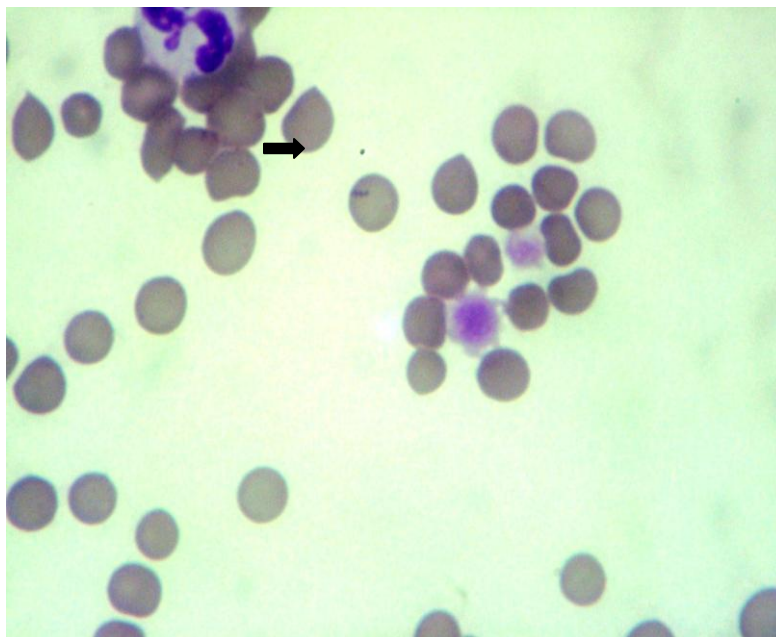
As comparações entre as variáveis sexo (M e F), grupo (Grupo 1 e Grupo 2), resultado (positivos e negativos) e tipo (espécie infectante: *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma* spp e co-infecção) e os dados hematológicos foram realizadas através do teste paramétrico de Duncan. Para verificar a relevância estatística dos dados não paramétricos, como classificação em fêmeas e machos (F e M), espécie infectante e local (Hospital Veterinário e Fercal) foi utilizado o teste não-paramétrico de qui-quadrado ( $\chi^2$ ). A análise estatística foi realizada por meio do programa SAS 9.1.

## RESULTADOS

Levando em consideração o exame clínico dos animais, ficaram evidentes as diferenças entre as duas populações estudadas (Grupo 1 e Grupo 2). Os animais do Grupo 1 eram compostos de animais, em sua maioria, com alguma queixa para atendimento veterinário, onde aproximadamente 90% apresentava, dentre os diversos sinais, apatia, anorexia parcial ou total, mucosas hipocoradas e/ou ictéricas, sinais estes, relacionado à suspeita de infecção por hemoplasmas ou outras doenças debilitantes. Os animais do Grupo 2 consistiam de animais teoricamente saudáveis, pelo relato de proprietários, onde, com exceção de lesões remanescentes de brigas, presença de ectoparasita e estado corporal magro, não apresentavam, em geral, sinal clínico de infecção por hemoplasma ou outra doença debilitante.

A pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo realizada em todos os animais revelou a presença de hemoplasmas (Figura 1) em apenas 5 animais, pertencentes ao grupo dos animais do

Grupo 1 e com sinais clínicos característicos de hemoplasmose como anemia intensa, icterícia, apatia e anorexia.



**Figura1.** Visualização do parasita em lâmina de esfregaço sanguíneo (seta) de felino doméstico de animal atendido no Hospital Veterinário da UnB.

Os resultados da PCR dos animais positivos e negativos para hemoplasmas nos grupos estudados estão apresentados na Tabela 2. Não houve diferença estatística entre os animais da Grupo 1 e Grupo 2 quanto à espécie infectante.

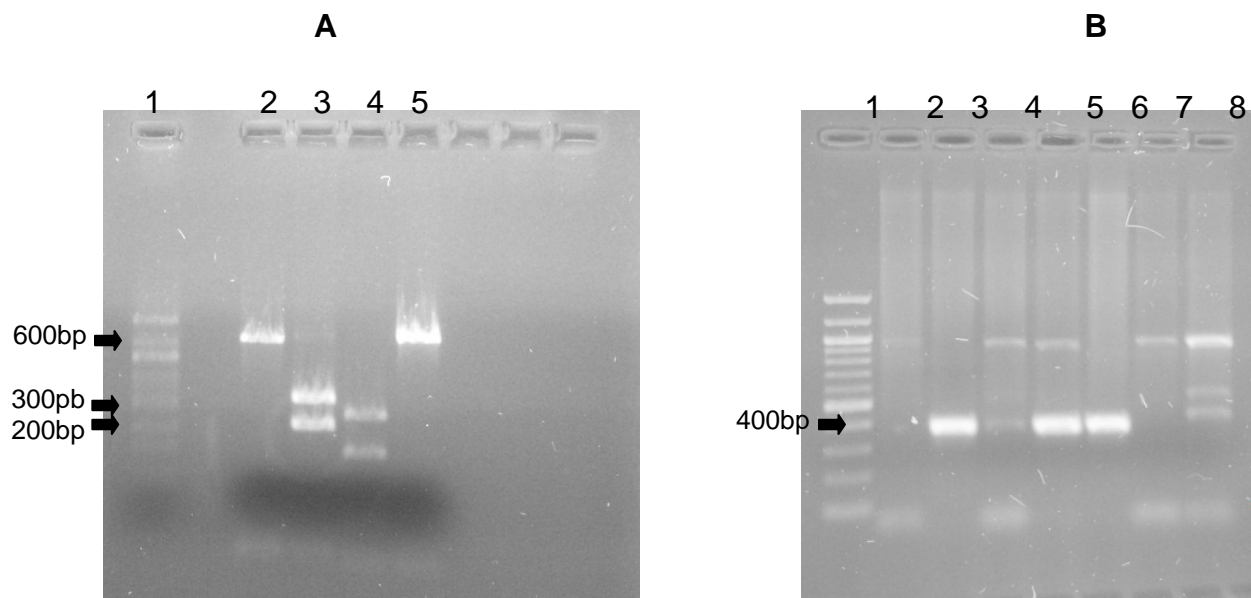
**Tabela 2.** Número e percentual de animais pertencentes ao Grupo 1 e Grupo 2 positivos e negativos na PCR para hemoplasmas, e a freqüência de infecção para cada espécie.

<b>Animais</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>(%)</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>(%)</b>
<b>Animais negativos</b>	34/51	66,6%	33/49	67,3%
<b>Animais positivos para hemoplasmose</b>	17/51	33%	16/49	32,6%
<b>Freqüência para cada</b>				

espécie					
<b>Animais positivos para</b>	<b><i>Mycoplasma haemofelis</i></b>	6/17	35,3%	2/16	12,5%
<b>Animais positivos para</b>	<b><i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i></b>	8/17	47,06%	3/16	18,75%
<b>Animais co-infectados</b>		3/17	17,64%	11/16	68,75%

Os resultados de PCR de *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma* spp. e digestão enzimática para a confirmação da presença de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* estão exemplificados na Figura 2.

Os produtos da PCR com maior intensidade de amplificação e nos tamanhos especificados a partir dos oligonucleotídeos escolhidos foram selecionados para o seqüenciamento onde para os oligonucleotídeos FI e R3 foi encontrado 99% de similaridade com *Mycoplasma haemofelis* e para os oligonucleotídeos HBT-F e HBT-R foi obtido 83% para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, confirmando o resultado da digestão enzimática, neste último caso.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp, utilizando-se os oligonucleotídeos HBT-F e HBT-R (gel A) e HI e R3 (gel B). Figura A: 1. Marcador de peso molecular 100bp DNA ladder (BioLabs, Inglaterra); 2. Positivo para *Mycoplasma* spp. 3. Digestão enzimática em fragmentos de 200 e 300 pb, positivo para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. 4. Digestão enzimática para detecção de *Mycoplasma haemofelis*. 5. Animal positivo para *Mycoplasma* spp. Figura B: 1. Marcador de peso molecular 100bp DNA ladder (BioLabs, Inglaterra); 2. Animal negativo para *Mycoplasma haemofelis*; 3. Animal positivo para *Mycoplasma haemofelis*; 4. Animal positivo para *Mycoplasma haemofelis*; 5. Animal positivo *Mycoplasma haemofelis*; 6. Animal positivo para *Mycoplasma haemofelis*; 7. Animal negativo para *Mycoplasma haemofelis*; 8. Animal negativo para *Mycoplasma haemofelis*.

O resultado da análise da frequência de infecção de acordo com o sexo dos animais não demonstrou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) e está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Análise do número de animais machos e fêmeas positivos para hemoplasmose nas duas populações estudadas.

<b>Animais</b>	<b>Machos</b>	<b>(%)</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>(%)</b>
<b>Animais positivos para hemoplasmose do Grupo 1</b>	10(17)	58,8%	7(17)	41,2%
<b>Animais positivos para hemoplasmose do Grupo 2</b>	12 (16)	75%	4(16)	25%

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentadas as análises dos dados hematológicos dos animais positivos em relação ao grupo (Grupo 1 e Grupo 2), sexo (Machos e fêmeas) e espécie infectante (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e co-infecção).



**Tabela 4.** Análise do eritrograma, plaquetometria e níveis de proteína plasmática total (PPT) nos animais positivos estudados de ambas as populações.

<b>Eritrograma</b>	<b>VG (%)</b>	<b>He (x10<sup>6</sup>)</b>	<b>Hb (g/dL)</b>	<b>VCM (fl)</b>	<b>CHCM (%)</b>	<b>Plaquetas/μL</b>	<b>PPT (g/dL)</b>
<b>Média</b>	28,3 0± 5,37	7,41 ± 1,65	9,93 ± 2,00	39,72 ± 6,54	34,91 ± 1,00	323.090,90 ± 17.996,07	7,02 ± 0,81
<b>R<sup>2</sup></b>	0,73	0,70	0,71	0,34	0,44	0,30	0,29
<b>Coefficiente de variação</b>	19,0 0	22,26	20,21	16,47	2,86	56,08	11,61
<b>Valores de referência<sup>1</sup></b>	24,0 0 – 45,0 0	5,00 – 10,00	8,00 – 10,00	39,00 – 55,00	30,00 – 36,00	300.000,00 – 800.000,00	6,00 – 8,00
<b>Espécie infectante</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Sexo</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Espécie infectante.Sexo</b>	***	**	**	NS	NS	NS	NS
<b>Grupo</b>	*	**	*	NS	NS	NS	NS
<b>Espécie infectante.Grupo</b>	**	NS	**	NS	NS	NS	NS
<b>Sexo.Grupo</b>	***	*	**	NS	NS	NS	NS
<b>Espécie infectante.Sexo.Grupo</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Onde p < 0,05\*, p < 0,01\*\*, p < 0,001\*\*\*, Não Significativos (NS), Volume globular (VG), Hemácias (He), Hemoglobina (Hb), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). <sup>1</sup>Fonte: JAIN N.C., 1993<sup>b</sup>.

**Tabela 5.** Análise do leucograma dos animais positivos de ambas os grupos estudados.

Leucograma	Lec/ $\mu$ L	Seg/ $\mu$ L	Bas $\mu$ L	Linf/ $\mu$ L	Mono $\mu$ L	Eos $\mu$ L	Baso $\mu$ L
<b>Média</b>	11.866,60 $\pm$ 4.930,57	8.371,12 $\pm$ 3.786,25	25,81 $\pm$ 0,05	2.462,81 $\pm$ 2.100,53	243,18 $\pm$ 207,41	706,60 $\pm$ 962,03	3,39 $\pm$ 20,65
<b>R<sup>2</sup></b>	0,65	0,74	444,70	0,39	0,65	0,20	0,22
<b>Coefficiente de variação</b>	41,55	45,23	0,18	65,96	85,29	136,15	609,30
<b>Valores referência<sup>1</sup></b>	de 5.500,00 – 19.500,00	2.500,00 – 12.500,00	0,00 - 300	1.500,00 – 7.000,00	0,00 – 850,00	0,00 – 1.500,0 0	Raros
<b>Tipo</b>	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
<b>Sexo</b>	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS
<b>Tipo.Sexo</b>	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
<b>Grupo</b>	NS	*	NS	NS	*	NS	NS
<b>Tipo.Grupo</b>	NS	*	NS	NS	*	NS	NS
<b>Sexo.Grupo</b>	NS	*	NS	NS	*	NS	NS
<b>Tipo.Sexo.Grupo</b>	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS

Onde  $p < 0,05^*$ , Não Significativo (NS), Leucócitos Totais (Lec), Segmentados (Seg), Bastonete (Bas), Monócitos (Mono), Eosinófilos (Eos), Basófilo (Baso). <sup>1</sup> Fonte: JAIN N.C., 1993<sup>b</sup>.

Estão apresentados nas tabelas 6 e 7 os resultados das análises dos hemogramas do número total de animais de acordo com o grupo (Grupo 1 e Grupo 2) e a ocorrência ou não de infecção por hemoplasmas (positivos e negativos).

**Tabela 6.** Análise do eritrograma, plaquetometria e PPT dos animais quando comparados o local de colheita das amostras (Grupo 1 e Grupo 2) e resultado (positivo ou negativo para hemoplasmosse).

Dados do eritrograma	VG (%)	He ( $\times 10^6$ )	Hb (g/dL)	VCM (fl)	CHCM (%)	PPT (g/dL)	Plaquetas/ $\mu$ L
Valores médios	27,28 $\pm$ 8,40	7,00 $\pm$ 2,20	9,45 $\pm$ 3,00	40,6 $\pm$ 7,00	34,42 $\pm$ 1,40	6,85 $\pm$ 0,83	336.241,90 $\pm$ 175.854,51
Grupo	***	***	***	***	***	NS	NS
Resultado	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS

Onde: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS. Não significativo. Volume globular (VG), Hemácias (He), Hemoglobina (Hb), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

**Tabela 7.** Análise do leucograma dos animais quando comparados o local de colheita das amostras (Fercal ou Hospital Veterinário da UnB) e resultado como positivo ou negativo para hemoplasmosse.

Dados do leucograma	Leucócitos totais/ $\mu$ L	Seg $\mu$ L	Linf $\mu$ L	Eos $\mu$ L	Mono $\mu$ L	Bas $\mu$ L	Baso $\mu$ L
Valores médios	11.642,10 $\pm$ 5.893,23	7,75 $\pm$ 7,15	2.560,04 $\pm$ 1.634,33	917,90	293,96 $\pm$ 362,25	23,93 $\pm$ 82,00	5,83 $\pm$ 24,7
Grupo	***	NS	***	***	*	**	NS
Resultado	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Onde: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , NS. Não significativo. Segmentados (Seg), Bastonete (Bas), Monócitos (Mono), Eosinófilos (Eos), Basófilo (Baso). Valores de Referência: JAIN N.C., 1993<sup>b</sup>.

A análise dos hemogramas do número total de animais (n= 100), considerando o resultado obtido para hemoplasmoses (negativos ou positivos) não demonstrou diferença estatística entre os animais infectados ou não, com exceção do CHCM ( $p < 0,05$ ). Bem como, não houve diferença estatística nos valores hematológicos na análise entre sexos, excetuando-se os valores de monócitos ( $p < 0,05$ ).

Os resultados das análises dos hemogramas dos animais estudados (n= 100) quanto ao grupo de onde foram feitas as colheitas (Grupo 1 e Grupo 2) estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Análise do eritrograma, plaquetometria, PPT e leucograma do número total de animais estudados (n = 100), quanto ao grupo de origem das amostras (Grupo 1 e Grupo 2).

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>
<b>Eritrograma</b>	<b>Valores médios</b>	<b>Valores médios</b>
<b>VG (%)</b>	24,52 ± 10,43 <sup>b</sup>	30,14 ± 5,60 <sup>a</sup>
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>)</b>	5,92 ± 2,71 <sup>b</sup>	8,07 ± 1,50 <sup>a</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,37 ± 3,70 <sup>b</sup>	10,60 ± 2,00 <sup>a</sup>
<b>VCM (fl)</b>	37,45 ± 9,42 <sup>b</sup>	43,61 ± 3,10 <sup>a</sup>
<b>CHCM (%)</b>	33,85 ± 1,72 <sup>b</sup>	35,02 ± 1,00 <sup>a</sup>
<b>Leucograma</b>		
<b>Leucócitos/μL</b>	9.598 ± 6,00 <sup>b</sup>	13.769 ± 5,72 <sup>a</sup>
<b>Segmentados/μL</b>	7.163 ± 5.817,44 <sup>a</sup>	8.375 ± 5.185, 80 <sup>a</sup>
<b>Bastonetes/μL</b>	43,59 ± 111,13 <sup>a</sup>	3,47 ± 24,30 <sup>b</sup>
<b>Linfócitos/μL</b>	1.934,80 ± 1573,02 <sup>b</sup>	3.210,80 ± 1.677,70 <sup>a</sup>
<b>Monócitos/μL</b>	200,73 ± 239,40 <sup>b</sup>	391,00 ± 453,40 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos/μL</b>	424,80 ± 676,80 <sup>b</sup>	1.431,10 ± 1112,07 <sup>a</sup>
<b>Basófilos/μL</b>	11,43 ± 34,40 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Plaquetas/μL</b>	320.802,00 ± 248.334,96 <sup>a</sup>	352.711,00 ± 140773,00 <sup>a</sup>
<b>PPT (g/dL)</b>	6,72 ± 1,00 <sup>a</sup>	6,98 ± 0,70 <sup>a</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste GLM do SAS.

Estão apresentados na Tabela 9 os dados hematológicos analisados dos animais positivos separados pela espécie infectante (*Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e co-infecção).

**Tabela 9.** Análise dos dados encontrados na hematologia de animais infectados por hemoplasmose com as respectivas espécies infectantes.

	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>	Co-infecção
<b>Eritrograma</b>			
<b>VG (%)</b>	20,75 ± 9,62 <sup>b</sup>	29,63 ± 7,13 <sup>a</sup>	31,64 ± 6,72 <sup>a</sup>
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>)</b>	5,27 ± 2,83 <sup>b</sup>	7,78 ± 2,41 <sup>a</sup>	8,35 ± 1,77 <sup>a</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	7,28 ± 3,50 <sup>b</sup>	10,23 ± 2,66 <sup>a</sup>	11,21 ± 2,5 <sup>a</sup>
<b>VCM (fl)</b>	43,04 ± 10,33 <sup>a</sup>	39,52 ± 6,90 <sup>a</sup>	38,00 ± 2,50 <sup>a</sup>
<b>CHCM (%)</b>	35,00 ± 1,16 <sup>ab</sup>	34,34 ± 1,13 <sup>b</sup>	35,32 ± 0,93 <sup>a</sup>
<b>Leucograma</b>			
<b>Leucócitos/μL</b>	9.000,00 ± 6,92 <sup>a</sup>	12.900,00 ± 4,90 <sup>a</sup>	13.529,00 ± 8,02 <sup>a</sup>
<b>Segmentados/μL</b>	8.827,00 ± 6.510,20 <sup>a</sup>	6.752,00 ± 3.772,90 <sup>a</sup>	9.383,00 ± 7.663,93 <sup>a</sup>
<b>Bastonetes/μL</b>	64,50 ± 182,43 <sup>a</sup>	30,55 ± 101,30 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Linfócitos/μL</b>	2.599,50 ± 443,71 <sup>a</sup>	1.655,00 ± 1.732,53 <sup>a</sup>	3.019,40 ± 1655,00 <sup>a</sup>
<b>Monócitos/μL</b>	408,13 ± 480,2 <sup>a</sup>	139,36 ± 126,25 <sup>b</sup>	230,50 ± 206,00 <sup>ab</sup>
<b>Eosinófilos/μL</b>	816,80 ± 677,23 <sup>a</sup>	386,20 ± 452,65 <sup>a</sup>	895,40 ± 1.195,33 <sup>a</sup>
<b>Basófilos/μL</b>	14,00 ± 39,60 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Plaquetas/μL</b>	263.875,00 ± 189.778,4 <sup>a</sup>	383.727,00 ± 216.177,75 <sup>a</sup>	309.286,00 ± 137.978,00 <sup>a</sup>
<b>PPT(g/dL)</b>	6,57 ± 0,90 <sup>a</sup>	7,16 ± 0,85 <sup>a</sup>	7,17 ± 0,67 <sup>a</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste GLM do SAS.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados da análise hematológica dos animais positivos entre os grupos estudados.

**Tabela 10.** Análise do eritrograma, plaquetometria, PPT e leucograma dos animais positivos para hemoplasmoses distribuídos nos dois grupos estudados.

	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>
<b>Eritrograma</b>	<b>Valores médios e desvio padrão</b>	<b>Valores médios e desvio padrão</b>
<b>VG (%)</b>	24,29 ± 9,5 <sup>b</sup>	32,62 ± 4,9 <sup>a</sup>
<b>Hemácias (x10<sup>6</sup>)</b>	6,04 ± 2,65 <sup>b</sup>	8,86 ± 1,35 <sup>a</sup>
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	8,42 ± 3,4 <sup>b</sup>	11,54 ± 1,8 <sup>a</sup>
<b>VCM (fl)</b>	42,40 ± 0,94 <sup>a</sup>	36,88 ± 0,60 <sup>b</sup>
<b>CHCM (%)</b>	34,49 ± 1,23 <sup>b</sup>	35,36 ± 0,77 <sup>a</sup>
<b>Leucograma</b>		
<b>Leucócitos/μL</b>	9.547,00 ± 7,3 <sup>b</sup>	14.331,00 ± 6,16 <sup>a</sup>
<b>Segmentados/μL</b>	7.149,00 ± 7117,14 <sup>a</sup>	9.669,00 ± 5.064,00 <sup>a</sup>
<b>Bastonetes/μL</b>	50,12 ± 145,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Linfócitos/μL</b>	1.650,90 ± 1.020,12 <sup>b</sup>	3.325,50 ± 1935,00 <sup>a</sup>
<b>Monócitos/μL</b>	166,06 ± 239,00 <sup>b</sup>	325,13 ± 327,51 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos/μL</b>	443,60 ± 563,50 <sup>a</sup>	986,00 ± 1097,12 <sup>a</sup>
<b>Basófilos/μL</b>	6,58 ± 27,16 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Plaquetas/μL</b>	345.118,00 ± 215.212,40 <sup>a</sup>	299.688,00 ± 136631,72 <sup>a</sup>
<b>PPT (g/dL)</b>	6,87 ± 0,94 <sup>a</sup>	7,18 ± 0,61 <sup>a</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste GLM do SAS.

## DISCUSSÃO

No presente estudo investigou - se a ocorrência e os aspectos hematológicos de animais infectados por duas espécies diferentes de hemoplasmas: *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, em duas populações com diferentes realidades sócio-econômicas, utilizando métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico.

Os animais selecionados para este estudo pertenciam ao grupo de risco para a infecção por hemoplasmas (animais com acesso a rua, com presença de ectoparasitas como a pulga e com sinais de brigas como abscessos) e conseqüentemente à outras doenças infecciosas como as retrovíroses, doenças imunossupressoras. Nestes animais foi observada a ocorrência da infecção por hemoplasmas em 33%, superior ao mencionado por Gary et al. (2006), nos Estados Unidos, que observaram a infecção por hemoplasmas em 19,7 a 22,7% dos felinos domésticos, com acesso a rua ou expostos à ectoparasitas, como a pulga; e similar ao demonstrado na Europa onde a infecção variou de 28 a 30% (Criado Fornélio et al , 2003).

Os gatos machos com acesso a rua apresentam geralmente, uma maior porcentagem de infecção por hemoplasmas (Willi et al., 2005). No presente estudo, apesar de numericamente superior o número de gatos machos positivos, não houve diferença estatística, provavelmente pelo número pequeno de animais por grupo estudado.

Analisando os hemogramas do total de animais estudados (Tabela 8), sem discriminá-los em positivos e negativos, foi visualizada uma diferença entre os animais do Grupo 1 e Grupo 2, onde podemos levar em consideração o fato de que dentro do número amostral de animais do Grupo 1, encontravam-se aqueles com esfregaço sanguíneo positivo, com sintomatologia para hemoplasrose como anemia hemolítica intensa, apatia, perda de peso, icterícia, anorexia (Souza, 2003; Willi et al., 2007), infectados por FIV e FeLV, e, principalmente, outras doenças debilitantes, motivo de procurarem auxílio veterinário, que os predispõem a manifestação da hemoplasrose (Harvey, 2006). Os animais do Grupo 2, possuidores de hábitos errantes e de região de baixa condição sócio-econômica, apresentaram uma média mais elevada de eosinófilos ( $p < 0,05$ ), em relação aos animais do Grupo 1, fato este que pode ser explicado devido aos animais do Grupo 2 poderem apresentar endoparasitas, ocasionando alterações gastrintestinais, e ectoparasitas, causando irritações de pele e alergias, que aumentam significativamente a resposta eosinofílica (Jain, 1993<sup>o</sup>) ou mesmo, o fato dos animais do Grupo 1, apresentarem doença marcadamente imunossupressora como a FeLV (Souza, 2003).

Analisando a hematologia dos animais em relação à comparação entre os sexos, os valores de monócitos considerados estatisticamente relevantes pela análise se apresentam dentro dos limites de referência, e que os resultados podem ser atribuídos a variação individual e número amostral.

Ao analisarmos os resultados hematológicos de todos os animais de ambos os grupos, levando em consideração apenas a presença ou não de infecção, não foi observada diferença estatística nos resultados, excetuando o valor de CHCM, que não extrapolaram os limites de referência e podem estar associados a diferenças individuais dos animais nos grupos.

O estudo demonstrou uma alta porcentagem de animais infectados por hemoplasmas em ambos os grupos (33%) quando comparado ao número encontrado com o uso de diagnósticos convencionais. Os resultados permitiram também, a demonstração da presença de diferentes espécies de hemoplasmas, *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, nos fornecendo ferramentas para diferenciá-los por meio da PCR e digestão enzimática, levando em consideração o fato de que o diagnóstico por visualização e diferenciação em lâmina ser de difícil realização (Harvey, 2006), prova esta, a baixa frequência da infecção diagnosticada em citologia de esfregaço sangüíneo no atual estudo. Foi observada, neste estudo, uma alta frequência de animais infectados por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (48% no Grupo 1 e 17% no Grupo 2), o oposto do encontrado em felinos domésticos na Grã-Bretanha, onde, 66% dos animais positivos eram infectados por *Mycoplasma haemofelis* e 33% apenas por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* o que pode ser justificado, segundo Criado-Fornélio (2003), pelas diferenças climáticas ou mesmo por diferentes vetores para a transmissão. Se considerarmos a espécie infectante, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e ainda a ocorrência de co-infecção, dados especificados na Tabela 8, foi demonstrado que os animais infectados pelo *Mycoplasma haemofelis* apresentam, em geral, sintomatologia, como a anemia, mais severa para hemoplasma, conforme descrito por Sykes (2007).

Os animais positivos para hemoplasmoses do Grupo 2, não apresentaram em média anemia, como o esperado para animais infectados com hemoplasmas (Willi et al., 2007, Tasker et al., 2003). Este fato pode ser explicado devido aos animais do Grupo 2, não apresentarem sintomatologia para hemoplasmoses e devem ser considerados, portanto como portadores assintomáticos, denotando uma relação de equilíbrio parasita-hospedeiro. Merece destaque que a colheita de sangue destes animais (Grupo 2) foi realizada em suas residências, sem que houvesse queixa precedente do proprietário. Por outro lado, os animais do Grupo 1 apresentaram um maior número de animais infectados por *Mycoplasma haemofelis*, conhecidamente mais patogênico (Criado-Fornélio et al., 2003), o que levou os animais a apresentarem, em média, anemia. A infecção por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* no Grupo 1 foi bastante elevada sem tampouco, demonstrar anemia, fato este justificado por ser característica deste agente não causar o aparecimento de sintomas nos animais segundo Willi et al., (2006). Outros estudos demonstraram resultado semelhante ao observado nos animais positivos do Grupo 2, onde não foi encontrada a anemia predominante em animais infectados (Macieira, 2008). No presente estudo, a anemia parece estar atribuída à espécie infectante, *Mycoplasma haemofelis*, conforme apresentado na Tabela 8 e não relacionada ao número amostral ou metodologia utilizada.



Os resultados do estudo demonstraram a eficácia do método molecular para a detecção de hemoplasmas na rotina laboratorial, quando comparado a pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sangüíneo, denotando que a PCR é comprovadamente, um método mais sensível de detecção da infecção (Watanabe et al, 2003, Watanabe et al, 2008), principalmente nos animais assintomáticos conforme observado nos animais do Grupo 2, onde em 100% dos casos os animais não demonstravam sinais da infecção por hemoplasmosose como anemia, icterícia, anorexia e apatia, tampouco visualização em lâmina, mas apresentavam a infecção identificada pela PCR. Cabe salientar que apenas 5% de todos os animais estudados foram positivos na citologia e também na PCR, todos pertenciam ao Grupo 1 e apresentavam sintomatologia para hemoplasmosose.

Embora não tenha havido diferença estatística no presente trabalho, provavelmente devido ao número das amostras, observou-se que existe uma tendência de ocorrência de infecção por *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* nos animais do Grupo 1. Este grupo apresentava 100% dos animais com sintomatologia para hemoplasmosose, como anemia, icterícia e apatia e os animais com visualização do parasita em lâmina. Por outro lado, os animais do Grupo 2 possuíam, numericamente, um número maior de indivíduos com co-infecção (*Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma haemofelis*), mas eram assintomáticos, lembrando sempre que a infecção por hemoplasma, detectada por PCR ou mesmo por citologia, não indica necessariamente doença clínica, independente da espécie do hemoplasma (Macieira, 2008). Não foi encontrada a associação co-infecção e anemia sugerida por Willi et al. (2006) como o esperado nos animais do Grupo 2. Tais resultados podem mostrar que apesar de um maior contato com os parasitas, os animais do Grupo 2, parecem apresentar uma maior resistência e sendo assim, importante fontes de distribuição dos hemoplasmas estudados.

## CONCLUSÃO

A distribuição da espécie infectante no Distrito Federal foi um importante achado para o nosso estudo. A frequência de infecção por hemoplasmas nos dois grupos (Grupo 1: 33%; Grupo 2: 32,6%) foram bem próximas em detrimento das diferenças regionais e sócio-econômicas. A real diferença está no padrão de distribuição das espécies infectantes onde, *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* estão mais presentes nos animais do Grupo 1 (35,3 e 47,06%, respectivamente) e a co-infecção foi predominante nos animais do Grupo 2 (68,75%). A conhecida relação dos animais imunossuprimidos por retrovíroses e outras doenças debilitantes parece estar bem marcada na infecção do Grupo 1 e conseqüentemente a maior suscetibilidade ao desenvolvimento da

doença, ao passo que os animais do Grupo 2 aparecem nos estudos entrando em contato com ambas as espécies estando, aparentemente, resistentes ao desenvolvimento da doença.

O perfil hematológico dos animais do Grupo 1 reforçou a conhecida tendência dos hemoplasmas estarem associados a um grupo de risco de animais com hábitos errantes, com contato com ectoparasitas, doenças debilitantes, retrovíroses e brigas com outros animais. Mostrou-nos também que a infecção pode estar presente em um grande número de animais sem, no entanto levar a sinais clínicos hematológicos específicos, como a anemia, mesmo em animais sem acesso a cuidados veterinários e em região sócio-econômica desfavorável.

Os resultados deste estudo demonstram a utilização da PCR, técnica que se mostrou mais sensível para a detecção da infecção em animais sintomáticos ou não, podendo assim, ser utilizada como ferramenta para detecção dos portadores e perpetuadores da doença em diferentes populações.

Foi confirmada, por meio de PCR e outros métodos moleculares, a existência de outra espécie de hemoplasma, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, mundialmente conhecida, mas ainda não explorada no Distrito Federal, possibilitando mais estudos futuros como o uso de outros oligonucleotídeos para a detecção da terceira espécie de hemoplasma mundialmente estudada, o *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

## REFERENCIAS

BERENT L.M., MESSICK J.B. Physical map and genome survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infection and Immunity**, p. 3657 – 3662, 2003.

BERENT L.M., MESSICK J.B., COOPER S.K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal Veterinary Research**, v. 59, n. 10, p. 1215 – 1220, 1998.

BROOKS J.E. Properties and uses of restriction endonucleases. In: **Methods in Enzymology – Guide to Molecular Cloning Techniques**, v.152, p.113 – 129, 1987.

CRIADO - FORNELIO A., MARTINEZ - MARCOS A., BULING - SARAÑA A., BARBA - CARRETERO J.C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 307 – 317, 2003.

GARY A.T., RICHMOND H.L., TASKER S., HACKETT T.B., LAPPIN M.R. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in blood of cats used for transfusions. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n. 8, p. 321 – 326, 2006.

HARVEY J.W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) in: **GREENE C.E. Infectious Diseases of dog and cat**, Cap. 31, p.252 – 260, Terceira edição, Elsevier, p.252 – 260, Canadá, 2006.

INOKUMA H., TAROURA S., OKUDA M., HISASUE M., ITAMOTO K., UNE S., NAKAICHI M., TAURA Y. Molecular Survey of *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* Infection in Cats in Yamaguchi na Surrounding Áreas. **Journal Veterinary Medicine Science : Parasitology**, v. 66, n. 8, p. 1017 – 1020, 2004.

ISHAK A.M., RADECKI S., LAPPIN M.R. Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, Bartonella species, Ehrlichia species, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.9, p. 1 – 7, 2007.

JAIN C.N.. Hemolytic Anemias Associated with Some Infectious Agents. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. Cap. 10, pg. 177 – 192, Philadeophia, 1993.<sup>a</sup>

JAIN C.N.. Comparative Hematology of Common Domestic Animals. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. Cap. 2, pg. 19– 53, Philadeophia, 1993.<sup>b</sup>

JAIN C.N.. The Eosinophils. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. Cap. 14, pg. 247 - 257, Philadeophia, 1993.<sup>c</sup>

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

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

MACIEIRA D.B., Hemoplasmas em Gatos Domésticos: Prevalência e sua Associação à Infecção Natural pelos Vírus das Imunodeficiência e/ou Leucemia Felina. **Tese**. Instituto de Veterinária. Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MESSICK J. B., BERENT L. M., COOPER S.K. Development and Evaluation of PCR - Based Assay for detection of *Haemobartonella felis* in Cats and Differentiation of *H. felis* from Related Bacteria by Restriction

Fragment Length Polymorphism Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 462 – 466, 1998.

PETERS I.R., HELPS C.R., WILLI B., HOFMANN-LEHMANN R., TASKER S. 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**, n.126, p. 142 – 150, 2008.

SOUZA H.J.M. Anemia. In: **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina.** Cap. 2, pg. -. L.F. Livros. Rio de Janeiro. 2003.

SYKES J.E., DRAZENOVICH N.L., KYLES A.E., BALL L.M., LEUTENEGGER C.M. Detection of mixed infection with “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal Veterinary Diagnosis Investigate**, n.19, p. 250 – 255, 2007.

TASKER, S., HELPS, C.R., DAY, M.J., GRUF-FYDD-JONES, T.J. Use a Real-Time PCR to detect and quantify Mycoplasma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, N.1, p. 439-441, 2003.

WATANABE M., HISASUE M., HASHIZAKI K., FURUICHI M., OGATA M., HISAMATSU S., OGI E., HASEGAWA M., TSUCHIYA R., YAMADA T. Molecular Detection and Characterization of *Haemobartonella felis* in Domestic Cats in Japan Employing Sequence-Specific Polymerase Chain Reaction (SS-PCR). **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 65, n.10, p. 1111 – 1114, 2003.

WATANABE M., HISASUE M., SOUMA T., OHSHIRO S., YAMADA T., TSUCHIYA R. Molecular Detection of *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* Infection in Cats by Direct PCR Using Whole Blood without DNA Extraction. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 70, n. 10, p. 1095–1099, 2008.

WILLI B., BORETTI F.S., CATTORI V., TASKER S., MELI M.L., REUSCH C., LUTZ H., HOFMANN - LEHMANN R. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2581 – 2585, 2005.

WILLI B., TASKER S., BORETTI F.S., DOHERR M.G., CATTORI V., MELI M.L., LOBETTI R.G., MALIK R., REUSCH C.E., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. Phylogenetic Analysis of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” Isolates from Pets Cats in The United Kingdom, Australia, and South Africa, with Analysis of Risk Factor for Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.12, p. 4430 – 4435, 2006.

WILLI B., BORETTI F.S., TASKER S., MELI M.L., WENGI N., REUSCH C.E., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, n.125, p. 197 – 209, 2007.

### CAPITULO III

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a presença de diferentes espécies de hemoplasmas no Distrito Federal (*Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus haemominutum*) por meio de métodos usuais como visualização em esfregaço sanguíneo e técnicas modernas e mais sensíveis como a PCR e digestão enzimática, mostrando a eficácia e sensibilidade dos testes moleculares. Analisamos também, o padrão de distribuição das espécies e o impacto causado pela sua infecção em dois grupos de diferentes regiões com realidades sócio-econômicas distintas.

As técnicas moleculares padronizadas para a identificação de hemoplasmas servirão para uso da população de felinos atendida no Hospital Veterinário da UnB, bem como para mais pesquisas sobre distribuição e prevalência destes agentes e outras espécies já conhecidas de hemoplasmas como *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### **Anexol.1. Trabalho de Iniciação Científica – PIBIC.**

**Maia A. Abraham (Aluna de IC); Mayana P. A. Sodré, Laís G. Silva, Fernanda P. Firmino (colaboradores); GIANE REGINA PALUDO (orientadora)**, Estudo da hemoplasmosse nos pequenos e médios felídeos do Parque Zoológico de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, XIV Congresso de Inicia o Científica da Universidade de Brasília e 5  Congresso de Inicia o Científica do DF, Brasília, 2008.

#### **Anexo I.2. Trabalho de Inicia o Científica – PIBIC.**

**Mayana P. A. Sodré (Aluna de IC), Fernanda P. Firmino, Marta F. Vasconcelos, Maia A. Abraham, Mariana F.G. Cesar (Colaboradores); GIANE REGINA PALUDO (orientadora)**, Estudo da hemoplasmosse dos felinos domésticos do Distrito Federal atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, XIV Congresso de Inicia o Científica da Universidade de Brasília e 5  Congresso de Inicia o Científica do DF, Brasília, 2008.

#### **Anexol.3. Publica o em congresso regional – CONBRAVET 2008.**

**Mayana P. A. Sodré, Marta F. Vasconcelos, Maia A. Abraham, Mariana F.G. Cesar, Giane R. Paludo**, Estudo da hemoplasmosse dos felinos domésticos do Distrito Federal atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, CONBRAVET, Gramado, 2008.

#### **Anexo I.4. Publica o em congresso internacional – ESVCP & ISACP Congress 2008.**

**Giane Regina Paludo, Fernanda de P. Firmno, Naiara B. Marodin, Marta F. Vasconcelos, Marina B.O. Angarten, Rafaela A. Chiareli, Mayana P. A. Sodré**, Molecular Diagnosis and laboratorial findings of hemoplasmosis in cats from University of Brasília Veterinary Hospital, Brazil, ESVCP & ISACP, Barcelona, 2008.

ANEXO II

**Tabela II.1.** Resultado do seqüenciamento analisados no BLAST para o hemoplasma *Candidatus Mycoplasma haemominutum* amplificados com os oligonucleotídeos de Criado – Fornélio et al, 2003 para amplificação de *Mycoplasma* spp.

---

**Resultado de seqüenciamento analisados no BLAST – *Candidatus Mycoplasma haemominutum***

---

**Seqüência amplificada pelo oligonucleotídeo - F:**

GCNNNNNGNNNNNCGNGANAGTGNGCGGNAANCACAANGGNGATATCTGACNNNGCAATANCAT  
 GTNNGCGCGGAGNTCNNGCNGCGCCTAGANCNAATANCTANTACCCATCGCTTNCNNNGTGATGN  
 ACNGGCCTANCTTGTCCCATATGNNNCCCNNNCANCCAANTATCTGCCACCAGCANNTGCNAAAANAT  
 ACGNCACNAGCNCNTCCGGCCTCATTGTANNTANANGNANCNCGCTGNACANATTGNTCTATTGT  
 CNCCGNCNNTNGCNCANNAGNNGNTANNNATNAATATCGTCTGTCTAGAATTAGNCAGGAGATACT  
 GGAATNCAATGTGTAGCGGTGGAANGCGTAGATCTATTGAGTGCACACCGTNCTCGAAGGCGAGTAT  
 CTAGCNCATAATNGACGCTNNGCTTGNAAGCNTGNGNAGCAAATGNGATTANATACCCAGTNGTNC  
 ACGCCGNAGACGATGGGNATTAGGTATTTGGTCTAGGACTNAGTGCNGNAGCNTNNGCGTTANATAC  
 CCCGCCT

**Resultado no BLAST**

**Oligonucleotídeo – F**

<b>Accession</b>	<b>Description</b>	<b><u>Max</u> <u>score</u></b>	<b><u>Total</u> <u>score</u></b>	<b><u>Query</u> <u>coverage</u></b>	<b><u>E</u> <u>value</u></b>	<b><u>Max</u> <u>ident</u></b>
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>					
<a href="#">AY150980.1</a>	isolate UK no. 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>318</u>	318	48%	2e-83	83%
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>					
<a href="#">AY150978.1</a>	isolate Australian no. 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>318</u>	318	48%	2e-83	83%

---

	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>						
<u>U88564.1</u>	strain California 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>318</u>	318	48%	2e-83	83%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> from						
<u>EU128752.1</u>	Hungary 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>313</u>	313	48%	7e-82	82%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>						
<u>AY150981.1</u>	isolate UK no. 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>313</u>	313	48%	7e-82	82%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>						
<u>AY150979.1</u>	isolate South African no. 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>313</u>	313	48%	7e-82	82%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> 16S						
<u>AF271154.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>313</u>	313	48%	7e-82	82%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>						
<u>AM745338.1</u>	partial 16S rRNA gene, isolate 16	<u>309</u>	309	48%	1e-80	82%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>						
<u>DQ825446.1</u>	isolate 209 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>307</u>	307	48%	3e-80	82%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>						
<u>DQ825440.1</u>	isolate 111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>307</u>	307	48%	3e-80	82%	
	<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>						
<u>AY150066.1</u>	isolate Spain-2 from cat 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>291</u>	291	48%	3e-75	81%	

**Tabela II.2.** Resultado de seqüenciamento analisados no BLAST, de produto amplificado por oligonucleotídeos de Berent et al, 1998, para detecção do hemoplasma *Mycoplasma haemofelis*.

**Resultado de seqüenciamento analisadas no BLAST – *Mycoplasma haemofelis***

**Gene amplificado pelos Oligonucleotídeos R e F**

TGA TTT AGC TTT ATA AAG CCT TCG GGG CTG AGG GAT TGG GAT ATG CTC TAT TAT  
GCG CTA GTT GGC GGG ATA AAA GCC CAC CAA GGC AAT GAT AGA TAG CTG GTC TTA  
GAG GAT GAA CAG CCA CAA TGG GAT TGA GAT ACG GCC CAT ATT CCT ACG GGA AGC  
AGC AGT AGG GAA TCT TCC ACA ATG GAC GAA AGT CTG ATG GAG CAA TAC CAT GTG



AAC GAT GAA GGC CTT TTT GGT TGT AAA GTT CTT TTA CGA GGG ATA ATT ATG ATA  
 GTA CTT CGA AGT ACC TAT CAT AAT TAT CCC TCC TTG GCC AAA AAC AAA GGT AAA  
 CGT NNG TTG TGN TNN NNT TTT CGN GGG NNN NAN CTT AGA TTC CTG CGG GGG AAC  
 NCG NNN GNC CNC NNC GNN NCN NNN NNN TCG GCC CCC TNN CGC TGG GCC GTC ACT  
 GGG GTN CGG GGT CGG CCC NCC CNN CCN NTC GNG CCC CCC CCG CNG GGA GCA GCC  
 CGG CCG TCG GCG CCG NGC CGC GTA GNT TTN NNG CCC CNC CAA CCN CCA CTN CGT  
 GAA CCT TCC CCG NCC TCC GTC CTA GGT CCN CTN CCC NTG CTG NGC CTN NNN CAN  
 GCG CNG AGC AGC

### Resultado no BLAST

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>	<u>Links</u>
<a href="#">EU839978.1</a>	Mycoplasma haemofelis strain IT140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e- 133	98%	
<a href="#">EU930823.1</a>	Mycoplasma haemofelis isolate Porto Alegre 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e- 133	98%	
<a href="#">EU888930.1</a>	Uncultured Mycoplasma sp. clone Mh.1-BR 16S ribosomal RNA, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e- 133	98%	
<a href="#">EU442639.1</a>	Mycoplasma haemofelis strain USP-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e- 133	98%	
<a href="#">EF416568.1</a>	Mycoplasma haemocanis isolate 1725.6k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e- 133	98%	
<a href="#">EF416567.1</a>	Mycoplasma haemocanis isolate 1769.6k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e- 133	98%	
<a href="#">EF416566.1</a>	Mycoplasma haemocanis isolate 201.6k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e- 133	98%	

	Mycoplasma haemofelis 16S						
<a href="#">EU145745.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis gene for						
<a href="#">AB294164.1</a>	16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: f1.34	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">DQ825458.1</a>	574 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">DQ825453.1</a>	94-122 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">DQ825451.1</a>	94-74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">DQ825447.1</a>	0 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">DQ825441.1</a>	14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemocanis 16S						
<a href="#">AY529641.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis 16S						
<a href="#">AY529632.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis 16S						
<a href="#">AY529629.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">AY150986.1</a>	UK no. 7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">AY150984.1</a>	UK no. 5 16S ribosomal RNA	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	

---

	gene, partial sequence						
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<u>AY150977.1</u>	Australian no. 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<u>AY150976.1</u>	Australian no. 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<u>AY150975.1</u>	Israel no. 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<u>AY150972.1</u>	French no. 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis clone						
<u>DQ157160.1</u>	379939.4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis clone						
<u>DQ157159.1</u>	404526.4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis clone						
<u>DQ157158.1</u>	404526.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis clone						
<u>DQ157157.1</u>	379939.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis from cat						
<u>DQ157156.1</u>	1089 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis from cat						
<u>DQ157155.1</u>	1015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	
	Haemobartonella canis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence						
<u>AF407208.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>483</u>	483	45%	5e-133	98%	

---

	Haemobartonella canis 16S						
<a href="#">AF197337.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Haemobartonella felis 16S						
<a href="#">AF178677.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">483</a>	483	45%	5e-133	98%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">DQ825438.1</a>	111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">479</a>	479	45%	7e-132	97%	
	Mycoplasma haemocanis isolate						
<a href="#">AY150973.1</a>	German no. 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">479</a>	479	45%	7e-132	97%	
	Haemobartonella felis 16S						
<a href="#">AY069948.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">479</a>	479	45%	7e-132	97%	
	Haemobartonella felis 16S						
<a href="#">U95297.1</a>	ribosomal RNA gene, complete sequence	<a href="#">479</a>	479	45%	7e-132	98%	
	Mycoplasma haemofelis gene for						
<a href="#">AB294163.1</a>	16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: f1.31	<a href="#">477</a>	477	45%	3e-131	97%	
	Mycoplasma haemofelis 16S						
<a href="#">AF548631.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">477</a>	477	45%	3e-131	97%	
	Mycoplasma haemofelis strain						
<a href="#">U88563.2</a>	Ohio-Florida 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">477</a>	477	45%	3e-131	97%	
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<a href="#">AY150985.1</a>	UK no. 6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">472</a>	472	45%	1e-129	97%	
	Candidatus Mycoplasma haemobovis clone 311 16S						
<a href="#">EF616468.1</a>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="#">392</a>	392	43%	9e-106	93%	
	Mycoplasma sp. China-1 16S						
<a href="#">EF424082.1</a>		<a href="#">392</a>	392	43%	9e-	93%	

	ribosomal RNA gene, partial sequence					106	
	Candidatus Mycoplasma						
<u>EU367965.1</u>	haemobos isolate cattle no. 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>387</u>	387	43%	4e- 104		93%
	Candidatus Mycoplasma						
<u>EF460765.1</u>	haemobos 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>387</u>	387	43%	4e- 104		93%
	Candidatus Mycoplasma						
<u>EF616467.1</u>	haemobovis clone 307 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>364</u>	364	43%	2e-97		91%
	Mycoplasma coccoides 16S						
<u>AY171918.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>351</u>	351	40%	2e-93		93%
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<u>EF198142.1</u>	H14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>346</u>	346	35%	7e-92		96%
	Mycoplasma haemofelis isolate						
<u>EF198143.1</u>	H23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>331</u>	331	35%	2e-87		94%
	Candidatus Mycoplasma						
<u>EU580599.1</u>	turicensis isolate Porto Alegre 2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>327</u>	327	40%	3e-86		91%
	Candidatus Mycoplasma						
<u>DQ464425.1</u>	turicensis isolate D9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>327</u>	327	40%	3e-86		91%
	Candidatus Mycoplasma						
<u>DQ464424.1</u>	turicensis isolate D7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>327</u>	327	40%	3e-86		91%
	Candidatus Mycoplasma						
<u>DQ464423.1</u>	Candidatus Mycoplasma	<u>327</u>	327	40%	3e-86		91%

---

	turicensis isolate B3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence						
<u>EU532066.1</u>	Candidatus mycoplasma turicensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>326</u>	326	40%	1e-85	91%	
<u>EU789559.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis strain BK-366 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>322</u>	322	40%	1e-84	90%	
<u>U82963.1</u>	Haemobartonella muris 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	<u>315</u>	315	39%	2e-82	90%	
<u>FJ429283.1</u>	Uncultured Mycoplasma sp. clone Porto Alegre dog421 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
<u>EU839977.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis strain IT226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
<u>EU861063.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate Porto Alegre 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
<u>EU580598.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate Porto Alegre 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
<u>AB294157.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: t2.31	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
<u>DQ825450.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate 10 16S	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	

---

---

	ribosomal RNA gene, partial sequence						
	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate 4 16S						
<u>DQ825449.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate 22 16S						
<u>DQ825448.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate 108N 16S						
<u>DQ464421.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate 57A 16S						
<u>DQ464420.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate D1 16S						
<u>DQ464417.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
	Candidatus Mycoplasma turicensis clone 365102.5 16S						
<u>DQ157152.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
	Candidatus Mycoplasma turicensis clone 946.3 16S						
<u>DQ157151.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
	Candidatus Mycoplasma turicensis clone 2.24 16S						
<u>DQ157150.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	
<u>AY831867.1</u>	Mycoplasma sp. 'feline	<u>311</u>	311	39%	3e-81	90%	

---

---

	hemotropic Switzerland' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence						
<u>DQ825454.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate 94-100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>305</u>	305	39%	1e-79	89%	
<u>DQ464422.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate G5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>305</u>	305	39%	1e-79	89%	
<u>DQ464419.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate C12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>305</u>	305	39%	1e-79	89%	
<u>DQ464418.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis isolate A11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>305</u>	305	39%	1e-79	89%	
<u>DQ157154.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis clone 408606.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>305</u>	305	39%	1e-79	89%	
<u>DQ157153.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis clone 76660.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>305</u>	305	39%	1e-79	89%	
<u>EU789558.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis strain BK-273 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>303</u>	303	40%	5e-79	89%	
<u>AB294158.1</u>	Candidatus Mycoplasma turicensis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: t2.34	<u>294</u>	294	32%	3e-76	93%	

---



---

	Mycoplasma haemofelis isolate							
<u>EF198144.1</u>	H83-Mhf 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>285</u>	285	28%	2e-73	97%		
	Mycoplasma haemofelis isolate							
<u>AY150065.1</u>	Spain-1 from cat 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>263</u>	263	23%	8e-67	100%		
	Uncultured Mycoplasma sp.							
<u>AY837724.1</u>	clone B2.5.31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>261</u>	261	34%	3e-66	89%		
	Eperythrozoon wenyonii 16S							
<u>AF016546.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>257</u>	257	34%	4e-65	88%		
	Mycoplasma ovis strain RC 16S							
<u>FJ209730.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	34%	1e-64	88%		
	Mycoplasma ovis isolate Mo-Hu-							
<u>EU165511.1</u>	1-05.2007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	35%	1e-64	88%		
	Mycoplasma ovis isolate Mo-Hu-							
<u>EU165510.1</u>	3-05.2007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	35%	1e-64	88%		
	Mycoplasma ovis isolate Mo-Hu-							
<u>EU165509.1</u>	2-05.2007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	35%	1e-64	88%		
	Mycoplasma ovis strain Shihezi1							
<u>EU916726.1</u>	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	35%	1e-64	88%		
	Mycoplasma wenyonii isolate							
<u>EU367964.1</u>	cattle no. 43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	34%	1e-64	88%		
	Mycoplasma wenyonii strain							
<u>EF221880.1</u>	CGXD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	34%	1e-64	88%		
	Mycoplasma wenyonii strain							
<u>DQ641256.1</u>	Langford 16S ribosomal RNA	<u>255</u>	255	34%	1e-64	88%		

---

---

	gene, partial sequence						
	Mycoplasma wenyonii 16S						
<u>AY769937.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	34%	1e-64	88%	
<u>AF338268.1</u>	Mycoplasma ovis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>255</u>	255	35%	1e-64	88%	
<u>FJ375309.1</u>	Mycoplasma wenyonii isolate Fengdu 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>250</u>	250	34%	6e-63	88%	
<u>EU646899.1</u>	Mycoplasma wenyonii from China 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>250</u>	250	34%	6e-63	88%	
<u>EU646898.1</u>	Mycoplasma wenyonii from China 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>250</u>	250	34%	6e-63	88%	
<u>EU367963.1</u>	Mycoplasma wenyonii isolate cattle no. 48 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>250</u>	250	34%	6e-63	88%	
<u>DQ318957.1</u>	Mycoplasmataceae bacterium T2110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>250</u>	250	36%	6e-63	87%	
<u>AY946266.1</u>	Mycoplasma wenyonii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>250</u>	250	34%	6e-63	88%	
<u>EU165513.1</u>	Candidatus Mycoplasma haemovis isolate CMho-Hu-2-05.2007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>237</u>	237	33%	5e-59	87%	
<u>EU646897.1</u>	Mycoplasma wenyonii from China 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>237</u>	237	34%	5e-59	87%	

---

**Tabela II.3.** Perfil hematológico dos animais do Hospital Veterinário da UnB utilizados no estudo.

<b>Ident</b>	<b>VG</b>	<b>Hem.</b>	<b>Hb</b>	<b>Leuc.</b>	<b>PPT</b>	<b>Plaquetas</b>
104.416	14%	3,42	4,8	15,3	6,2	626.000
107.620	12%	1,97	3,9	10,9	8,4	250.000
108.963	9%	1,90	3	11,7	7,8	320.000
109.090	7%	1,54	2,2	10,6	5,2	17.500
109.149	8%	2,01	2,8	5,9	8	157.000
110.464	25%	6,18	9	5,2	6,2	120.000
Siri	8%	1,37	2,3	15,0	7,2	320.000
111.207	29%	6,67	10,1	7	6,2	275.000
111.737	12%	3,07	3,9	32,7	8,2	620.000
111.784	18%	4,06	5,8	12,2	6,2	400.000
Pepeto	13%	3,21	4,3	3,56	7	210.000
106.561	18%	3,16	5,9	5,2	9	100.000
109.950	9%	2,32	3	27,3	9	500.000
110.636	10%	1,40	3,2	7,9	7,8	20.000
110.851	20%	5,01	7,2	14,9	7	0
111.208	34%	8,49	11,8	4,6	6,4	360.000
111.209	34%	8,90	12	4,9	6,4	280.000
111.458	18%	6,51	5,4	12,6	6	20.000
111.830	19%	3,92	5,9	21,6	5,6	452.000
108.962	20%	5,79	7,2	11,2	6	365.000
112.311	10%	2,77	3,1	5,4	5,2	15.000
108.524	31%	7,36	10	7,7	8,6	0
112.092	38%	9,68	12,5	4,4	8	0
112.315	33%	8,88	11,8	9,4	6,8	296.000
112.277	23%	5,97	7,9	1,6	7,8	25.000
112.282	30%	7,51	10,3	10,4	5,8	400.000
112.281	29%	8	10	16,7	6,4	270.000
112.234	33%	7,9	10,2	5,1	5,8	610.000
112.071	31%	7,6	10,9	7	7,2	255.000
112.125	32%	8,25	11,5	8,5	5,6	360.000
112.247	29%	7,02	10	9,5	6,6	740.000

104.953	27%	6,85	9,2	5,6	6,8	285.000
112.317	8%	1,21	2,6	8,6	5,4	20.000
112.313	16%	2,23	5,5	9,2	7	20.000
109.374	36%	8,53	12,4	5,7	7	325.000
Gordo	40%	9,68	13,6	6,6	7	415.000
112.198	12%	2,91	4,1	12	5,4	315.000
109.323	33%	7,29	11,3	15,8	6,6	330.000
108.122	39%	8,55	12,8	7	7	805.000
112.170	37%	5,95	12,3	8,05	6,8	400.000
Dori	32%	7,65	11,5	4,6	6,4	350.000
112.246	31%	7,73	11	16,2	6	355.000
112.248	32%	8,53	11,5	9,8	6,2	255.000
110.331	39%	10	14	5,5	6,6	455.000
Tobias	33%	7,29	11,3	15,8	6,6	500000
111.206	37%	9,90	13,0	5,5	6,6	455000
101.205	34%	6,50	12,1	4,8	6,4	270000
109.374	31%	9,19	10,7	4,9	7,2	400000
109.096	20%	6,7	6,6	7,1	5	95000
Teka	22%	5,80	7,2	7,0	7,0	805000
100.149	36%	7,93	12,6	3,8	6,4	160000

Onde: Volume Globular (VG), Hemácias (Hem), hemoglobina (Hb), Leucócitos (Lc), Proteína Plasmática Total (PPT).

**Tabela I. 4.** Perfil hematológico dos animais da Fercal utilizados no estudo.

Ident	VG	Hem.	Hb	Leuc.	PPT	Plaquetas
Gato 6 23	35%	9,15	12,6	15	8	185.000
Gato 9 24	26%	7,22	8,9	21,6	7,8	475.000
Gato 1	26%	6,80	9,3	21,0	6,6	375.000
Gato 2	28%	6,99	10	8,8	7,2	285.000
Gato 3	27%	7,89	9,6	26,8	8,0	100.000
Gato 5	40%	9,95	12,8	17,0	8,2	225.000
Gato 6	35%	9,15	12,6	15,0	8,0	185.000
Gato 7	28%	8,02	10	26,7	8,0	255.000
Gato 8	29%	7,78	10,3	13,8	7,0	275.000

---

Gato 9	26%	7,22	8,9	21,6	7,8	475.000
Gato 10	34%	9,13	12	17,4	6,8	285.000
Gato 2	38%	9,95	13,5	12,0	6,6	230.000
Gato 4	26%	6,46	9	6,6	6,8	445.000
Gato5	22%	5,59	7,7	19,1	6,4	155.000
Gato 7	27%	6,42	9,3	7,9	6,0	420.000
Gato 8	26%	7,10	8,6	10,0	7,2	0
Gato 11	22%	6,20	7,3	10,2	7,0	335.000
Gato 12	37%	11,26	13	15,6	7,0	0
Gato 13	26%	7,12	9,2	11,0	5,8	410.000
Gato 2	30%	9,43	10,8	15,4	7,2	415000
Gato 3	33%	9,07	11,8	26,7	8	155000
Gato 1	31%	8,13	11	11,6	7,6	115000
Gato 5	37%	9,62	13	8,7	7,0	305000
Gato 6	31%	8,35	11,1	7,5	7	130000
Gato 7	15%	4,49	5	6,4	6,0	397000
Gato 8	30%	7,64	10,8	7,2	6,0	370000
Gato 10	38%	9,95	13	15,8	7	800000
Gato 6	32%	7,65	11,5	4,6	6,4	350.000
Gato 10	29%	7,63	10	6,5	6,2	240000
Gato 14	26%	7,12	9,2	11,0	5,8	410.000
Gato 1 25	27%	7,16	8,8	11,6	7,6	300.000
Gato 12	38%	9,25	13,5	16,6	6,8	160000
Gato 2	37%	11,71	13,2	17,5	7	485.000
Gato 3	30%	8,43	10,3	14,2	7,6	0
Gato 1	33%	8,42	11,8	14,5	7	365.000
Gato 2	37%	9,13	13	14,4	5,8	475.000
Gato 3	34%	8,44	12	14,7	7,2	395.000
Gato 4	23%	7,42	8,6	20	5,8	500.000
Gato 5	24%	6,18	8	24,1	7,2	0
Gato 6	37%	9,65	13	17,4	6,8	425.000
Gato 7	30%	8,24	10,2	10,3	7	555.000
Gato 8	21%	6,79	7,5	9,5	6,4	460.000
Gato 9	39%	10,57	13,4	13,2	7,8	590.000
Gato 10	29%	8,11	10,3	14,2	6,8	305.000
Gato 11	27%	6,29	9,4	7,7	7	360.000
Gato 12	27%	7,33	9,6	9,5	7,4	470.000

---

---

Gato 13	26%	6,74	9,2	12,7	6	295.000
Gato 14	30%	8,08	10,8	5,8	7,8	370.000
Gato 15	38%	9,2	13,6	8,3	6,8	560.000

---

Agradeço a Deus minha vida e este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais e minha família, pelo apoio e confiança na minha capacidade.

À minha orientadora, Professora Dra. Giane Regina Paludo, pelo apoio, pela amizade e estar do meu lado nos momentos em que as coisas realmente ficaram difíceis.

À minha mentora e amiga, Professora Christine Martins Souza, que me faz a cada dia gostar mais e saber um pouco mais sobre gatos.

Às meninas do laboratório (Patologia Clínica e Patologia Veterinária), pelo apoio, amizade, corridas de gel, idas à Fercal e palavras de consolo quando tudo parecia dar errado. Com vocês os dias no laboratório foram bem menos penosos.

Ao Diego, amigo de faculdade, amigo de PIBIC, amigo de pós-graduação, amigo para a vida toda, que me ensinou e apoiou no mundo da Biologia Molecular.

À Mariana e Ana Paula, obrigada pela ajuda e pelas conversas enquanto o termociclador rodava.

À Professora Angéla Patrícia pela ajuda com seu otimismo e conhecimento.

À Professora Concepta MacMannus, pela, como sempre, imprescindível ajuda com a estatística.

Ao laboratório de Biologia Molecular da UnB pelo suporte no experimento.

Ao laboratório de Biologia Molecular da Pós-Graduação da Universidade Católica de Brasília pelos resultados de seqüenciamentos.

À amiga Camila, companheira de mestrado e clonagens mal sucedidas.

Aos amigos do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB, minha segunda casa. Agradeço os sangues de gatos e toda a torcida.

Aos agentes comunitários da Fercal e toda a população que colaborou com o estudo nos abrindo a porta sempre com boa vontade. Este trabalho não teria sido realizado sem vocês.

Aos amigos do Hospital Veterinário da FTB por agüentarem na reta final.

Às minhas amigas, orientadas de PIBIC, Maia e Maiana, pela ajuda prestada.

À Universidade de Brasília e Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e todos os professores e funcionários que fizeram parte da minha vida ao longo desses 9 anos.

À Capes e FINATEC pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria realizado.

À Professora Dra. Nádia R.P. Almosny pela presença em minha avaliação.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho, os sinceros meus agradecimentos.

Ao meu noivo, Richard, que com muito amor e paciência me aturou e ajudou nesses dois anos.

