

**UFRRJ  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Alterações hematológicas e investigação molecular de micoplasmas hemotróficos e piroplasmas em felinos domésticos (*Felis catus*) na região metropolitana do rio de janeiro**

**Juliana Macedo Raimundo**

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIA CLÍNICAS)**

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E INVESTIGAÇÃO  
MOLECULAR DE MICOPLASMAS HEMOTRÓFICOS E  
PIROPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NA REGIÃO  
METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

**JULIANA MACEDO RAIMUNDO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Cristiane Divan Baldani**

*e Coorientação do Professor*  
**Huarrisson Azevedo Santos**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ  
Abril de 2014

636.8089615

R153a

T

Raimundo, Juliana Macedo, 1988-

Alterações hematológicas e investigação molecular de micoplasmas hemotróficos e piroplasmas em felinos domésticos (*Felis catus*) na região metropolitana do Rio de Janeiro / Juliana Macedo Raimundo. - 2014.

84 f.: il.

Orientador: Cristiane Divan Baldani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2014.

Bibliografia: f. 56-70.

1. Gato - Doenças - Teses. 2. Gato - Doenças - Rio de Janeiro (RJ) - Teses. 3. Micoplasma - Teses. 4. Hematologia veterinária - Teses. I. Baldani, Cristiane Divan, 1978-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

## DEDICATÓRIA

### **Dedico este trabalho,**

Primeiramente a Deus, àquele que nos governa e nos guia sempre;  
Aos meus pais, Albertina e Julio por todo amor, conselhos, força e incentivo na vida;  
Ao Felipe por todos os momentos juntos, pelo amor e companheirismo nesta caminhada;  
A todos os meus familiares e amigos pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.  
A vocês dedico toda e qualquer conquista!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar  
seria menor se lhe faltasse uma gota”

(Madre Teresa de Calcutá)

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que sobretudo me proporcionou a vida, direcionamento pelos bons caminhos e por me reerguer nos momentos mais difíceis;

Aos meus amados pais, Albertina Macedo Raimundo e Julio João Raimundo, por todo amor, essência da vida, educação, sonhos compartilhados e pela presença incondicional em cada etapa da minha vida pessoal e profissional. A vocês, devo tudo que sou hoje;

À minha família, pela união nos momentos de felicidade e tristeza que me faz entender a cada dia o que é a vida, agradeço pelos incentivos, ensinamentos e aprendizados constantes. Amo todos vocês;

Ao Felipe Ribeiro, pelo amor, companheirismo, paciência e por estar presente nos melhores momentos da minha vida;

Aos amados bebês, Icaro e Nicholas, por me fazer lembrar a inocência de uma criança e pelos inúmeros momentos de diversão e aprendizado;

À professora Cristiane Divan Baldani, minha orientadora, pelos ensinamentos, contribuição na vida acadêmica. Pelas palavras de incentivo, pelo exemplo de dedicação profissional e acima de tudo por acreditar no meu potencial;

Ao professor Huarrisson Azevedo Santos, meu coorientador, pela sabedoria compartilhada, sobretudo na área de biologia molecular e pela boa convivência;

Aos professores Rosangela Zacarias Machado, Marcos Rogério André e toda equipe do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária/UNESP Jaboticabal pelo treinamento e ensinamentos de biologia molecular, bem como por ceder os controles positivos utilizados nos ensaios moleculares;

Ao professor Carlos Luiz Massard por disponibilizar o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores/UFRRJ para execução de todos os ensaios moleculares e pelo exemplo de dedicação à docência;

Aos médicos veterinários e amigos, Camila Flávia Botelho, Maria Lopes e Caio Rodrigues pela ajuda fundamental nos momentos de coleta;

Aos amigos da UFRRJ, Jôsie Albuquerque, Larissa Moraes e Fernanda Kohn pela amizade e pelos bons momentos ao meu lado. Em especial a Caio Rodrigues e Jéssica Ferreira pelos inúmeros momentos de conselhos, diversão e confidências;

Às amigas, Patrícia Ferreira e Thais Serpa, pela verdadeira amizade, carinho e apoio que a distância não separa. Obrigada pelos anos compartilhados;

Às médicas veterinárias, Maristela Peixoto e Renata Ferreira pela disponibilização das amostras utilizadas nesse trabalho;

As meninas do laboratório de patologia clínica da UFRRJ, Andresa Guimarães, Raisia Braul Rodrigues e Aline Tonussi da Silva, pelo apoio e pela ajuda em absolutamente todas as etapas de execução deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, Claudia Bezerra, Joice Vilela, Renata Lins, Marcus Pires, Maristela Peixoto, Gabriela Vitari, Larissa Amorim, pela ajuda e pelos momentos de risadas proporcionados;

Ao “Grande Oráculo”, Marcus Sandes Pires, por toda ajuda nos ensaios moleculares e em especial, na execução da análise estatística;

Aos meus queridos animais (*In memoriam*), daqueles que todos os dias me faltam o singelo olhar e os mais simples gestos de gratidão, aqueles que viveram a reciprocidade de um sentimento puro e que mesmo em momentos difíceis me proporcionaram conhecimento de vida;

À professora Evelize Folly das Chagas por me inserir na pesquisa e aos amigos, Gúínever Império, George Kluck e Roberto Laureano pelo incentivo a seguir na carreira científica;

Ao professor Carlos Henrique Machado por estar sempre disposto a nos ajudar e pelos ensinamentos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária/UFRRJ e aos colegas do mestrado pelo aprendizado e bons momentos de convivência;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

Aos professores doutores Marcos Rogério André, Carlos Luiz Massard, Carlos Henrique Machado e Aline Moreira de Souza, componentes da banca examinadora, agradeço pela correção e adequação do presente trabalho;

Por fim, muitíssimo obrigada a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização e conclusão deste trabalho.

## BIOGRAFIA

**Juliana Macedo Raimundo**, filha de Albertina Macedo Raimundo e Julio João Raimundo, natural de Duque de Caxias, RJ, nascida em 27 de Janeiro de 1988. Iniciou sua trajetória educacional no Colégio Educandário da Misericórdia, onde cursou o ensino infantil e parte do ensino fundamental, com conclusão desta etapa na Escola Ana Laura. Iniciou o ensino médio no Colégio Flama, em Duque de Caxias, dando continuidade no Collingham School em Londres e concluindo o ensino médio no Colégio Flama.

Em 2007 ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-o no segundo semestre de 2011. Durante a graduação, realizou estágios em clínicas veterinárias e laboratórios de análises clínicas particulares, assim como estágios oficiais da instituição no setor de equinocultura, laboratório de bioquímica geral e no laboratório de patologia clínica.

Em 2008 foi monitora da disciplina de Bioquímica Geral sob orientação da Professora Evelize Folly das Chagas.

Em 2009 foi bolsista de Iniciação Científica PROIC sob orientação do Professor Fábio Fagundes da Rocha, em projeto intitulado “Avaliação da influência do enriquecimento ambiental na resposta ao estresse social agudo em camundongos”. Nesta etapa, recebeu os prêmios: XII Prêmio de Pesquisa Prof. Carlos Maria Antonio Hübinger Tokarnia (3º lugar) e XIII Prêmio de Iniciação Científica UFRRJ, em decorrência da última premiação, o trabalho foi selecionado para ser apresentado na Jornada Nacional de Iniciação Científica em 2011.

Em 2010 realizou estágio em Imunodiagnóstico de Hemoparasitoses sob orientação da professora Cristiane Divan Baldani e exerceu monitoria da disciplina de Doenças Parasitárias sob orientação do professor Argemiro Sanavria.

Em 2011 foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) sob orientação da professora Cristiane Divan Baldani, com o projeto intitulado “Estudo hematológico, epidemiológico e sorológico de *Theileria equi* em equinos do município de Seropédica”.

Em março de 2012 ingressou no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ em nível de mestrado, sendo contemplada com bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Período no qual participou de cursos e eventos relacionados à área, ministrou aulas na disciplina de patologia clínica e publicou os resultados parciais da dissertação em congressos e eventos da área.

## RESUMO

RAIMUNDO, Juliana Macedo. **Alterações hematológicas e investigação molecular de micoplasmas hemotróficos e piroplasmas em felinos domésticos (*Felis catus*) na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ.** 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Os hemoparasitos *Mycoplasma* spp. e *Cytauxzoon felis* são micro-organismos com potencial para causar anemia e demais condições debilitantes em felinos domésticos. O objetivo do presente estudo foi detectar molecularmente a infecção por hemoplasmas e *Cytauxzoon felis* em gatos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, associando-a aos dados hematológicos. Dos 197 gatos amostrados, 45 (22,8%) foram positivos pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para *Mycoplasma* spp. e 22 (11,2%) apresentaram estruturas epieritrocíticas sugestivas na pesquisa direta em esfregaço sanguíneo. A frequência de infecção das espécies de hemoplasma pela PCR, utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos, foi 4,6%, 4,6% e 11,7% para *M. haemofelis* (Mhf), '*Candidatus M. turicensis* (CMt) e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (CMhm), respectivamente. '*Candidatus M. haemominutum*' constitui, portanto, a espécie de maior ocorrência na população de gatos estudada. Foram identificadas coinfeções entre Mhf e CMhm (1,0%), Mhf e CMt (0,5%) e CMhm e CMt (0,5%), assim como coinfeção tripla em um animal (0,5%). Não foi observada diferença na distribuição de *Mycoplasma* spp. entre os animais provenientes dos municípios da Baixada Fluminense (23,9%) e Rio de Janeiro (21,3%). No entanto, constatou-se maior distribuição de gatos positivos para '*Candidatus M. haemominutum*' e '*Candidatus M. turicensis*' no município do Rio de Janeiro. Já a infecção por *M. haemofelis* foi maior na Baixada Fluminense, cujos gatos apresentaram cinco vezes mais chance de se infectarem por este agente ( $p > 0,05$ ). Os picos de infecção por *Mycoplasma* spp., *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' foram maiores no verão, por outro lado, '*Candidatus M. turicensis* demonstrou pico de infecção no inverno, tais achados não foram significativos estatisticamente ( $p > 0,05$ ). No tocante às alterações hematológicas associadas à infecção por *M. haemofelis*, constatou-se anemia predominantemente do tipo macrocítica hipocrômica ( $p < 0,01$ ), linfocitose ( $p < 0,03$ ), trombocitopenia ( $p < 0,04$ ) e presença de monócitos ativados ( $p < 0,04$ ). Por outro lado, nenhum parâmetro hematológico relevante à micoplasmose felina foi associado à infecção pelos hemoplasmas '*Candidatus M. haemominutum* e '*Candidatus M. turicensis*'. Tais achados confirmam a distinta patogenicidade das espécies de hemoplasmas. Quanto aos fatores associados à ocorrência de micoplasmose em felinos do Rio de Janeiro, gatos machos são mais propensos à infecção por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' ( $p < 0,01$ ), tal relação, no entanto, não foi observada na infecção por '*Candidatus M. turicensis*' ( $p > 0,05$ ). Embora sem associação estatística, gatos adultos apresentaram mais chances de se infectarem por hemoplasmas ( $p > 0,05$ ). Todos os animais foram negativos para *Cytauxzoon felis* pela PCR, embora tenham sido evidenciadas formas de piroplasma em hemácias de dois animais. Os resultados demonstram a ocorrência das três espécies de micoplasmas hemotróficos e de piroplasmas na região metropolitana do Rio de Janeiro e denotam seu potencial como causador de anemia. Consequentemente, o conhecimento da doença bem como dos fatores relacionados à sua ocorrência são necessários para a adoção de medidas preventivas visando à saúde animal.

**Palavras-chave:** Felinos domésticos; Hemoplasmas; Piroplasmas



## ABSTRACT

RAIMUNDO, Juliana Macedo. **Hematological disorders and molecular investigation of haemotropic mycoplasmas and piroplasmas in domestic felines (*Felis catus*) from Metropolitan Area of Rio de Janeiro, RJ.** 2014. Dissertação (Master Degree in Veterinary Medicine, Pathology). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

*Mycoplasma* spp. and *Cytauxzoon felis* are hemoparasites with potential to cause anemia and other debilitating conditions in domestic cats. The aim of this study was to detect by molecular technique hemoplasma and *Cytauxzoon felis* infection in cats from Metropolitan Area of Rio de Janeiro, as well as linking it to the hematological data. From a total of 197 cats sampled, 45 (22.8%) were positive by Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) to *Mycoplasma* spp. and 22 (11.2%) have shown structures compatible with haemoplasma organisms on blood smear. The infection frequency of hemoplasma species by PCR, using primers specific to hemoplasma species, was 4.6%, 4.6% and 11.7% for *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), 'Candidatus M. turicensis' (CMt) and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' (CMhm), respectively. Therefore 'Candidatus M. haemominutum' was the specie with the highest incidence in the cats studied. Co-infection between Mhf and CMhm (1.0%), Mhf and CMt (0.5%) and CMt and CMhm (0.5%) have been observed, as well as triple co-infection in one animal (0.5%). No difference of *Mycoplasma* spp. distribution was observed between animals from Baixada Fluminense districts (23.9%) and Rio de Janeiro (21.3%). However, there was a higher distribution of positive cats for 'Candidatus M. haemominutum' and 'Candidatus M. turicensis' in the district of Rio de Janeiro. *Mycoplasma haemofelis* infection was higher in Baixada Fluminense, whose cats had five times more chance to be infected by this agent ( $p > 0.05$ ). *Mycoplasma* spp., *M. haemofelis* and 'Candidatus M. haemominutum' infections were higher in the summer, on the other hand, 'Candidatus M. turicensis' showed a peak of infection in the winter, these findings were not statistic different ( $p > 0.05$ ). Regarding hematological changes associated with *M. haemofelis* infection, macrocytic hypochromic anemia ( $p < 0.01$ ), lymphocytosis ( $p < 0.03$ ), thrombocytopenia ( $p < 0.04$ ) and the presence of activated monocytes ( $p < 0.04$ ) were observed. On the other hand, no hematologic parameter relevant to feline mycoplasma infection was associated with 'Candidatus M. haemominutum' and 'Candidatus M. turicensis'. These findings confirm the different pathogenicity of hemoplasmas species. Regarding associated factors to the occurrence of mycoplasmosis in felines of Rio de Janeiro, male cats were more prone to be infected by *M. haemofelis* and 'Candidatus M. haemominutum' ( $p < 0.01$ ). However, this relationship was not observed in infection by 'Candidatus M. turicensis' ( $p > 0.05$ ). Although no statistical association was found, adult cats were more likely to be infected by hemoplasma ( $p > 0.05$ ). All animals were negative for *Cytauxzoon felis* by PCR, although piroplasma forms were seen in erythrocytes of two animals. The results demonstrate the occurrence of three species of haemotropic mycoplasmas and piroplasmas at Metropolitan Area of Rio de Janeiro and denote their potential to cause anemia. Consequently, the knowledge about the disease and the factors related to its occurrence are required for the adoption of preventive action aiming at animal and man health.

**Key words:** Domestic cats; hemoplasmas; piroplasma

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número e percentual de gatos positivos para hemoplasmas nos ensaios moleculares (qPCR e PCR).....	27
Tabela 2: Ocorrência geral de hemoplasmas e das espécies <i>Mycoplasma haemofelis</i> , ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' e ' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ' nos municípios da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	28
Tabela 3: Comparação entre as técnicas qPCR e citologia de esfregaço sanguíneo para o diagnóstico de <i>Mycoplasma</i> spp. em gatos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	29
Tabela 4: Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR em Tempo Real para <i>Mycoplasma</i> spp., pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	30
Tabela 5: Análise descritiva do leucograma dos gatos positivos e negativos na PCR em Tempo Real para <i>Mycoplasma</i> spp., pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	31
Tabela 6: Alterações hematológicas associadas à infecção natural por <i>Mycoplasma</i> spp. em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	32
Tabela 7: Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR para <i>Mycoplasma haemofelis</i> , pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	33
Tabela 8: Análise descritiva do leucograma dos gatos positivos e negativos na PCR para <i>Mycoplasma haemofelis</i> , pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	34
Tabela 9: Alterações hematológicas associadas à infecção natural por <i>Mycoplasma haemofelis</i> em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	35
Tabela 10: Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR para ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ', pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	36
Tabela 11: Análise descritiva do leucograma dos gatos, positivos e negativos na PCR para ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ', pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	37
Tabela 12: Alterações hematológicas associadas à infecção natural por ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	38
Tabela 13: Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR para ' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ', pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	39

Tabela 14: Análise descritiva do leucograma dos gatos positivos e negativos na PCR ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’, pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	40
Tabela 15: Alterações hematológicas associadas à infecção natural por ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’ em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.	41
Tabela 16: Fatores associados à infecção natural por <i>Mycoplasma</i> spp. em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro .....	42
Tabela 17: Fatores associados à infecção natural por <i>Mycoplasma haemofelis</i> em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	43
Tabela 18: Fatores associados à infecção natural por ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro .....	43
Tabela 19: Fatores associados à infecção natural por ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’ em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....	44

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Municípios da Região Metropolitana do Rio de Janeiro dos quais foram obtidas as amostras de sangue de felinos domésticos. ....20
- Figura 2. Esfregaço de sangue apresentando estruturas epieritrocíticas sugestivas de hemoplasmas em cocos únicos (setas vermelhas), em pares (seta preta contínua) e em cadeia (setas amarelas). Notar, adicionalmente, forma de piroplasma no interior de hemácias (seta preta pontilhada). (Corante Panótipo Rápido, 1000x).....24
- Figura 3. Curva de amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. obtidos pela PCR em tempo real (Sistema SYBRGreen). As linhas em cor de rosa indicam o controle positivo e as demais linhas, as amostras positivas. ....25
- Figura 4. Curva de dissociação do fragmento do gene 16S rRNA do controle positivo e das amostras positivas demonstrando a especificidade de amplificação de *Mycoplasma* spp. na PCR em tempo real.....25
- Figura 5. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 393 pares de base do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemofelis*, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1-11: Gatos negativos; Canaleta 13: Gato positivo.....26
- Figura 6. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 488 pares de base do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1-4,6-7,9-15: Gatos negativos; Canaletas 5, 8: Gatos positivos. ....26
- Figura 7. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 192 pares de base do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1,4-5,7,9,12-13: Gatos negativos; Canaletas 2-3,6,8,9,10-11,14: Gatos positivos. ....26
- Figura 8: Ocorrência de hemoplasmas e suas respectivas espécies durante as estações do ano na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. ....29
- Figura 9. Esfregaço de sangue com formas de piroplasma no interior de hemácias (seta branca). Notar, adicionalmente, estruturas epieritrocíticas (setas pretas) (Corante Panótipo Rápido, 1000x). ....45
- Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O amplímero de 284 pares de base do gene 18S rRNA de *Cytauxzoon felis* demonstrado na figura é referente ao controle positivo da reação. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1-16: Gatos negativos. ....45

## LISTA DE ABREVIACÕES

ACVIM	Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária
AHIM	Anemia hemolítica imunomediada
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CMhm	' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '
CMt	' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> '
CT	<i>Threshold Cycle</i>
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DNNE	Desvio nuclear de neutrófilos à esquerda
DP	Desvio Padrão
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EP	Erro Padrão
EUA	Estados Unidos da América
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
GGT	$\gamma$ -Glutamilttransferase
He	Hemácias
Hg	Hemoglobina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ht	Hematócrito
IC	Intervalo de Confiança
MAM	Monócitos ativados a macrófagos
Máx.	Limite máximo
Mhf	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
Mín.	Limite mínimo
N	Número de gatos
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PM	Peso molecular
PPT	Proteína Plasmática Total
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
rnpB	Gene RNase P
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de dissociação ( <i>Melting Temperature</i> )
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VGM	Volume globular médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
2.1 Micoplasmas Hemotróficos (Hemoplasmas) .....	2
2.1.1 Agente etiológico: Morfologia e histórico .....	2
2.1.2 Epidemiologia.....	3
2.1.2.1 Prevalência.....	3
2.1.2.2 Fatores de risco.....	5
2.1.2.3 Transmissão .....	5
2.1.3 Patogenia da hemoplasrose.....	6
2.1.3.1 Indução da anemia .....	6
2.1.3.2 <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	7
2.1.3.3 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ .....	7
2.1.3.4 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’ .....	8
2.1.3.5 Portadores assintomáticos .....	8
2.1.4 Sinais clínicos e achados laboratoriais .....	8
2.1.5 Diagnóstico.....	9
2.1.5.1 Citologia de esfregaços sanguíneos.....	9
2.1.5.2 Cultivo microbiológico e testes sorológicos.....	10
2.1.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	10
2.1.6 Tratamento.....	10
2.1.7 Prevenção .....	11
2.1.8 Importância Saúde Pública .....	11
2.2 <i>Cytauxzoon felis</i> .....	13
2.2.1 Agente etiológico: Morfologia e histórico .....	13
2.2.2 Epidemiologia.....	14
2.2.2.1 Prevalência.....	14
2.2.2.2 Fatores de risco.....	15
2.2.2.3 Transmissão .....	15
2.2.3 Ciclo biológico e patogenia .....	16
2.2.4 Sinais clínicos e achados laboratoriais .....	17
2.2.5 Achados de necropsia e microscopia.....	17
2.2.6 Diagnóstico.....	18
2.2.6.1 Citologia e histopatologia.....	18
2.2.6.2 Testes sorológicos .....	18
2.2.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	19
2.2.7 Tratamento.....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1 Animais.....	20
3.2 Análises Hematológicas .....	20
3.3 Extração de DNA de sangue total.....	21
3.4 Detecção Molecular de hemoplasmas .....	21
3.4.1 PCR em Tempo Real para <i>Mycoplasma</i> spp. ....	21
3.4.2 Reação de amplificação específica para <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	21
3.4.3 Reação de amplificação específica para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ ....	22
3.4.4 Reação de amplificação específica para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’ .....	22
3.4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose .....	22

3.5 Detecção Molecular de <i>Cytauxzoon felis</i> .....	22
3.6 Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares .....	23
3.7 Análise Estatística .....	23
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Pesquisa direta de hemoplasma em esfregaço sanguíneo.....	24
4.2 Diagnóstico molecular de hemoplasmas baseadas no gene 16S rRNA .....	24
4.3 Distribuição de hemoplasmas na baixada fluminense e município do Rio de Janeiro .....	27
4.4 Estudo comparativo entre as técnicas de diagnóstico.....	29
4.5 Distribuição da frequência de infecção por hemoplasmas nas estações do ano .....	29
4.6 Associação entre os parâmetros hematológicos e infecção por hemoplasmas.....	30
4.6.1 <i>Mycoplasma</i> spp. ....	30
4.6.2 <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	33
4.6.3 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ .....	36
4.6.4 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’ .....	39
4.7 Fatores associados à infecção por hemoplasmas.....	42
4.7.1 <i>Mycoplasma</i> spp. ....	42
4.7.2 <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	42
4.7.3 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ .....	43
4.7.4 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’ .....	44
4.8 Pesquisa direta de piroplasmas em esfregaço sanguíneo.....	45
4.9 Diagnóstico molecular de <i>Cytauxzoon felis</i> baseado no gene 18S rRNA .....	45
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 Micoplasmas hemotróficos.....	46
5.2 <i>Cytauxzoon felis</i> .....	53
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>8 ANEXO.....</b>	<b>71</b>
Anexo A - Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo dos agentes infecciosos e parasitários em animais de companhia tem sido intensificado não somente em decorrência das doenças que promovem nos animais, mas também pelo possível potencial zoonótico em meio ao estreito convívio com o homem. Podem igualmente serem carregados silenciosamente e transmitidos a outros animais por transfusão sanguínea, brigas e artrópodes vetores, tais como pulgas e carrapatos, disseminando os agentes. Neste contexto, o real papel dos felinos domésticos ainda não está totalmente esclarecido, uma vez que há poucos estudos a cerca das hemoparasitoses que acometem estes animais. No Brasil, a população de gatos tem apresentando crescimento anual acelerado, sendo superior ao crescimento da população de cães (ABINPET, 2013). Em face à verticalização urbana das grandes cidades, tem-se optado por criação de gatos em função das facilidades de manejo, baixo custo e reduzido espaço requerido, podendo esses animais ser reservatórios de agentes patogênicos transmitidos por artrópode ao homem.

Agentes eritrocíticos, tais quais micoplasmas hemotróficos e *Cytauxzoon felis* são micro-organismos com potencial para causar anemia e demais condições debilitantes em felinos domésticos. Desta forma, o conhecimento destas enfermidades bem como os fatores que interagem para o surgimento destas é necessário para a formulação de estratégias de profilaxia e controle, visando à sanidade do animal e do homem. Vale ressaltar a importância de estudos baseados na epidemiologia e alterações hematológicas relacionadas à ocorrência destas doenças, objetivando auxiliar no diagnóstico destas em clínicas e hospitais veterinários. Hemoplasmas são reconhecidos como importante causa de doença em gatos, podendo os animais manifestar anemia severa a infecções crônicas sem manifestação clínica. Estudos recentes utilizando técnicas moleculares para a detecção de micoplasmas hemotróficos em felídeos têm sido conduzidos no Brasil, com relatos de *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' em todas as regiões do Brasil (BIONDO et al., 2009). No entanto, é reportada variação de patogenicidade e virulência de acordo com a espécie infectante, denotando a importância da caracterização molecular deste agente. Acrescenta-se a isso, a detecção molecular de *Mycoplasma haemofelis* em um paciente brasileiro HIV- positivo (SANTOS et al., 2008), o que ressalta a importância de estudos futuros para melhor entender o impacto dos hemoplasmas em gatos domésticos e, adicionalmente, determinar o valor destes como agentes zoonóticos, particularmente em pacientes imunocomprometidos.

*Cytauxzoon felis* é um agente eritrocítico, natural de felídeos selvagens, transmitido aos felinos domésticos por intermédio de carrapato vetor. Na fase eritrocítica causa infecção assintomática, entretanto, na fase tissular determina doença aguda e frequentemente fatal em gatos domésticos. Estudos revelam que gatos sobreviventes à infecção clínica da doença tornam-se persistentemente infectados mesmo após serem submetidos a protocolo terapêutico e que, deste modo, funcionariam como fonte de infecção a outros felinos domésticos. Logo, técnicas moleculares e hematológicas ganham relevância no que diz respeito à determinação do nível de agentes circulantes na população felina, visto que, há relatos na literatura de que a maioria dos felinos domésticos diagnosticados positivos é assintomática.

O presente estudo teve como objetivo diagnosticar a presença de infecção por micoplasmas hemotróficos e *Cytauxzoon felis* em felinos domésticos do estado do Rio de Janeiro, por meio de métodos hematológicos e moleculares e, adicionalmente, caracterizar as alterações hematológicas e fatores associados à infecção natural pelos agentes estudados a fim de orientar médicos veterinários no diagnóstico destas enfermidades.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Hemoparasitoses vetoradas por artrópodes ocorrem comumente na população felina do Brasil (ALMOSNY, 2002). *Mycoplasma* spp. são usualmente diagnosticados em gatos do Rio de Janeiro (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007; MACIEIRA et al., 2009), podendo provocar anemia hemolítica e outras manifestações clínicas inespecíficas (TASKER, 2010). *Cytauxzoon felis*, parasito natural de felinos selvagens, transmitido por carrapatos, pode causar doença grave e fatal em gatos domésticos (MEINKOTH; KOCAN et al., 2005; GREENE et al., 2006). Um grande número de agentes infecciosos, hospedeiros e vetores estão envolvidos com estas enfermidades e sua epidemiologia (HARRUS; BANETH, 2005).

### 2.1 Micoplasmas Hemotróficos (Hemoplasmas)

#### 2.1.1 Agente etiológico: Morfologia e histórico

Micoplasmas hemotróficos são bactérias Gram-negativas, de tamanho reduzido (0,3 a 0,8µM), cuja morfologia varia de cocos únicos, em pares e ocasionalmente, cadeias cocóides. Parasitam obrigatoriamente a superfície marginal de eritrócitos (epieritrocitário) (ALMOSNY, 2002; URQUHART et al., 2003; TASKER, 2010), levando a deformação na membrana dos eritrócitos parasitados (NEIMARK et al., 2001). Caracteristicamente apresentam genoma reduzido, ausência de parede celular e flagelo, são susceptíveis à tetraciclina e resistentes à penicilina ou qualquer outro antibiótico cujo alvo é a parede celular (NEIMARK, 2001). Estes agentes não são cultiváveis *in vitro* (RIKIHISA et al., 1997; SYKES et al., 2003).

A infecção por micoplasma hemotrófico (hemoplasma) em gato foi descrito primeiramente por Clark em 1942 na África do Sul, no qual foram observados, por meio da análise de esfregaços sanguíneos e de 'imprints' de baço, parasitos anelares localizados na superfície de hemácias e no interior de células esplênicas, sendo classificado em decorrência de sua localização no gênero *Eperythrozoon*, espécie *Eperythrozoon felis*. Em 1953, nos Estados Unidos (EUA), Flint e Moss, descreveram parasitos na superfície de hemácias de gatos anêmicos. Estes autores, através da inoculação intraperitoneal de sangue infectado em gatos saudáveis, reproduziram experimentalmente a condição clínica e comprovaram serem estes parasitos os responsáveis pela anemia observada no felino infectado naturalmente, nomeando a doença em Anemia Infecciosa Felina.

Em 1955, Flint e McKelvie sugeriram o nome *Haemobartonella felis* ao organismo causador da Anemia Infecciosa Felina, pois embora semelhantes à *Eperythrozoon felis*, este raramente era visualizado livre no plasma e pouco comumente observava-se a forma anelar. A doença foi sendo progressivamente diagnosticada em outros estados dos EUA (BALAZS et al., 1961), bem como em outros países, tais quais Inglaterra e Brasil (SEAMER; DOUGLAS, 1959; MASSARD et al., 1978).

Inicialmente, *Eperythrozoon felis* e *Haemobartonella felis* foram considerados organismos diferentes embora pertencessem à mesma classificação taxonômica - família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. Esta classificação foi sugerida em decorrência das características morfológicas e biológicas, tais quais, ausência de membrana externa, por serem organismos não cultiváveis *in vitro* e por parasitarem eritrócitos, assim como *Anaplasma* spp. (RISTIC; KREIER, 1984). Entretanto, diferentemente de *Anaplasma* spp., tanto *E. felis* quanto *H. felis* se desenvolvem na superfície dos eritrócitos (DUARTE et al., 1992).

Na década de 90, com o advento dos ensaios moleculares, tornou-se possível a análise genética de ambos os organismos. Rikihisa et al. (1997), através da análise do gene 16S rRNA de *Haemobartonella felis* e *Eperythrozoon felis*, evidenciaram tratar-se do mesmo parasito, sendo estes mais próximos filogeneticamente do gênero *Mycoplasma* do que *Anaplasma*.

Adicionalmente demonstraram a existência de duas cepas distintas de *Haemobartonella* – Ohio-Flórida e Califórnia, uma vez que apresentam similaridade de somente 85% entre si. Desta forma sugeriram que *Haemobartonella* spp. e *Eperythrozoon* spp. fossem reclassificados no gênero *Mycoplasma*, família Mycoplasmataceae e classe Mollicutes.

Com a reclassificação de *Haemobartonella felis* e *Eperythrozoon felis* no gênero *Mycoplasma*, a cepa Ohio-Flórida (forma maior) passou a ser denominada *Mycoplasma haemofelis* e a cepa Califórnia (forma menor), ‘*Candidatus* Mycoplasma haemominutum’ (FOLEY; PEDERSEN, 2001; NEIMARK et al., 2001). O termo ‘*Candidatus*’ utilizado na identificação de novas espécies de hemoplasmas simboliza sua classificação provisória, que será mantida até que informações que suportem esta classificação estejam disponíveis (SYKES, 2003).

Willi et al. (2005) descreveram uma nova espécie de micoplasma infectando um gato com anemia hemolítica grave na Suíça, denominada ‘*Candidatus* Mycoplasma turicensis’. O mesmo grupo evidenciou a transmissão experimental do agente a gatos saudáveis por meio da inoculação de sangue infectado, com consequente reprodução clínica da doença. ‘*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum’ e ‘*Candidatus* Mycoplasma haemocanis’ já foram detectados em felinos domésticos (HORA, 2008; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013).

Micoplasmose hemotrófica felina foi o nome sugerido por Sykes (2003) para designar a condição clínica determinada por estes agentes agora denominados hemoplasmas ou micoplasmas hemotróficos (NEIMARK et al., 2001).

*Mycoplasma haemofelis* foi a primeira espécie de hemoplasma a ter seu genoma completamente sequenciado; desta forma, as características biológicas deste organismo não cultivável *in vitro* poderão ser investigadas e melhor compreendidas (BARKER et al., 2011a, 2011b). Barker et al. (2011b) identificaram proteínas imunogênicas deste agente e potencial mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro. Messick e Santos (2011), por meio de expressão de proteínas recombinantes de *M. haemofelis*, identificaram antígenos com potencial imunogênico a serem futuramente empregados em testes sorológicos e vacinas. Logo, novos avanços têm sido observados no campo de estudo da hemoplasmose em felinos, cujos objetivos principais são ampliar conhecimento sobre a biologia destes microrganismos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de prevenção da doença.

## 2.1.2 Epidemiologia

### 2.1.2.1 Prevalência

Os micoplasmas hemotróficos - *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus* Mycoplasma haemominutum’ e ‘*Candidatus* Mycoplasma turicensis’- são bactérias responsáveis pela indução de anemia em uma variedade de mamíferos, incluindo felinos domésticos e silvestres (BARKER; TASKER, 2013). Estudos têm reportado a provável infecção por este grupo de bactérias no homem (HU et al., 2009; SANTOS et al., 2008; YUAN et al., 2009; MAGGI et al., 2013).

Infecções por micoplasmas hemotróficos em gatos diagnosticadas com base em ensaios moleculares já foram reportadas em todos os continentes. A frequência de hemoplasmas é bastante variada, sendo de 12% a 43,4% na Europa (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; PETERS et al., 2008; GETILLINI et al., 2009; JUVET et al., 2010; MAHER et al., 2010; ROURA et al., 2010; BENETT et al., 2011; MARTÍNEZ-DÍAZ., 2013), 6,5% a 56,7% nas Américas (KEWISH et al., 2004; NIBBLETT et al., 2004; BAUMANN et al., 2006; LAPPIN et al., 2006; ISHAK et al., 2007; STOJANOVIC; FOLEY, 2011), 27,9% a 31% na Oceania (TASKER et al., 2004; JENKINS et al., 2013;), 23% na Ásia (ASSARASAKON et al., 2012) e 25,5% a 44,8% na África (LOBETTI; TASKER, 2004; LOBETTI; LAPPIN,

2012). A espécie de hemoplasma com maior prevalência difere entre os estudos em decorrência da categoria das amostras estudadas – anêmicos ou não, gatos errantes, domiciliados ou de abrigo.

A prevalência de hemoplasmas no Brasil, utilizando ensaios moleculares como método diagnóstico, varia de 6,5% a 56,7% (BAUMANN et al., 2006; HORA, 2008; MACIEIRA et al., 2008; MAIA et al., 2008; BORTOLI et al., 2012; BRAGA et al., 2012; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013; MICELI et al., 2013). Na maioria dos estudos, a espécie de hemoplasma encontrada com maior frequência é ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (MACIEIRA et al., 2008; MAIA, 2008; BRAGA et al., 2012; BORTOLI et al., 2012; MICELI et al., 2013). Contraditoriamente, foi observada maior infecção por *Mycoplasma haemofelis* (8,5%) e ‘*Candidatus M. turicensis*’ (12,5%) em estudos realizados em São Paulo e Pará, respectivamente (HORA, 2008; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013). Estes resultados divergentes podem estar relacionados aos diferentes métodos estatísticos, critérios de seleção do grupo amostral (anêmico ou não anêmico, gatos domiciliados ou errantes), técnicas de diagnóstico ou meramente por ser esta a distribuição natural das espécies de hemoplasmas em determinada área (GENTILINI et al., 2009).

O primeiro caso de infecção no Brasil por *Haemobartonella felis* (atual *Mycoplasma haemofelis*) foi identificado por Massard et al. (1978). Desde então, pouco se pesquisou sobre a frequência de hemoplasmas em gatos domésticos (MACIEIRA, 2008). No Brasil, quatro espécies de hemoplasmas foram detectadas em felinos domésticos e silvestres até o presente momento. Sendo estes, os hemoplasmas de felinos *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ‘*Candidatus M. turicensis*’ (MORAIS et al., 2007; WILLI et al., 2007; SANTOS, 2008) e adicionalmente, um hemoplasma de cães *Mycoplasma haemocanis*, evidenciando que felinos podem ser portadores do hemoparasito conferindo provável fonte de infecção à população canina (HORA, 2008).

Mendes-de-Almeida et al. (2007), no Rio de Janeiro, por meio da análise de esfregaços sanguíneos, detectaram a frequência de infecção de *Mycoplasma spp.* em 15,8%, 36,2% e 75,8% da população felina testada, nos anos 2002, 2003 e 2004, respectivamente. Este aumento na frequência dos hemoplasmas na população felina estudada foi concomitante à elevação da prevalência de pulgas *Ctenocephalides felis*, sugerindo a importância deste ectoparasita na ocorrência da doença.

Em estudo desenvolvido em Hospital Veterinário de Curitiba com gatos anêmicos, a frequência de hemoplasmas foi de 56,7% por meio da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), destes 38% e 11% mostraram-se positivos para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, respectivamente (BAUMANN et al., 2006). Em Porto Alegre, a prevalência molecular de hemoplasmas observada foi de 21,3% em gatos domiciliados atendidos em Hospital Veterinário do Rio Grande do Sul (SANTOS, 2008). No Rio de Janeiro, Macieira et al. (2008), analisando 149 gatos domiciliados pela PCR, demonstraram que 10% mostraram-se positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’, 4% para *M. haemofelis* e 2% apresentavam coinfeção. Neste mesmo estado, Maia (2008) evidenciou infecção por hemoplasmas em 14% dos gatos domiciliados amostrados, destes 3,4% estavam infectados por *Mycoplasma haemofelis* e 10,6% por ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Braga et al. (2012) detectaram a frequência de hemoplasmas na população de gatos com acesso à rua de São Luis, com predomínio de infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (10%) seguidos de *Mycoplasma haemofelis* (2,5%) e ‘*Candidatus M. turicensis*’ (2%). Bortoli et al. (2012) detectaram, em uma campanha de castração de gatos em Jaboticabal, a frequência de 6,5% de infecção por hemoplasmas hemotróficos e a associação desta com retrovírus. Infecções por ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *Mycoplasma haemofelis* foram reportadas em felídeos selvagens pertencentes a zoológicos de

Curitiba, São Paulo e Brasília com frequência de infecção variando de 9,2% a 13,2% (GUIMARÃES et al., 2007; ANDRÉ, et al., 2011; FILONI et al., 2012).

### 2.1.2.2 Fatores de risco

Raça, idade, gênero, área de atividade (acesso à rua ou não), infecção concomitante por FIV/FeLV, condição clínica, presença de ectoparasitas e presença de anemia são os fatores de risco geralmente pesquisados nos mais diversos estudos no mundo. No Brasil, os grupos de risco à infecção por hemoplasmas são compostos por gatos machos (HORA, 2008; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013), sem raça definida (MACIEIRA et al., 2008), errantes (ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013), coinfectados por FIV/FeLV (HORA, 2008; MACIEIRA et al., 2008) e anemia para *M. haemofelis* (HORA, 2008). No mundo, os fatores associados à infecção por estes patógenos são gatos machos (WILLI et al., 2006; ROURA et al., 2010; STOJANOVIC; FOLEY, 2011; JENKINS et al., 2013), sem raça definida (TASKER et al., 2004; JENKINS et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013;), mais velhos (TASKER et al., 2004; WILLI et al., 2006; MAHER et al., 2010; GEORGES et al., 2012), coinfectados por FIV/FeLV (GENTILINI et al., 2009; ROURA et al., 2010; GEORGES et al., 2012; JENKINS et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013), com acesso à rua (WILLI et al., 2006; ROURA et al., 2010) e anemia (TASKER et al., 2004). A frequência de hemoplasmas em gatos, assim como os fatores de risco envolvidos na infecção variam em função da localização geográfica, características das amostras coletadas e adicionalmente, testes diagnósticos empregados.

### 2.1.2.3 Transmissão

As formas de transmissão de hemoplasmas na população felina ainda não foram totalmente elucidadas. A transmissão pode ocorrer através de artrópodes hematófagos, feridas causadas por mordeduras, transfusão sanguínea e transplacentária (ALMOSNY, 2002). DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ‘*Candidatus M. turicensis*’ e *M. haemofelis* já foram detectados em saliva, glândulas salivares e fezes de gatos (DEAN et al., 2008; MUSEUX et al., 2009; TASKER, 2010), entretanto, estudo sugere que a transmissão ocorra por meio de interações agressivas com inoculação de sangue e não somente saliva infectada durante mordidas, visto que a inoculação de saliva oralmente ou por via subcutânea de ‘*Candidatus M. turicensis*’ não resultou em transmissão do agente em estudo realizado por Museux et al. (2009). Baumann et al. (2013) demonstraram que a inoculação subcutânea de sangue infectado por *M. haemofelis* resultou em bacteremia nos gatos experimentalmente infectados, sugerindo que o contato social com interações agressivas possa constituir via de transmissão de hemoplasmas.

Micoplasmas hemotróficos, por parasitarem uma ampla variedade de hospedeiros mundialmente, tem sua transmissão associada também aos artrópodes vetores. A pulga *Ctenocephalides felis* é o principal ectoparasita encontrado em populações de felinos domésticos infectados ou não, e, por tal, incriminada na transmissão de hemoplasmas entre a população felina (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007; TASKER, 2010; MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2011). DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’, *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. turicensis*’ foram detectados em pulgas *C. felis* coletadas de gatos e em fezes destas pulgas (SHAW et al., 2004; WOODS et al., 2005; HORNOK et al., 2010; ASSARASAKORN et al., 2012), entretanto, somente *M. haemofelis* foi transmitido ao gato através do hábito de hematofagismo deste ectoparasito (WOODS et al., 2005). Mendes-de-Almeida et al. (2007) observaram associação estatística ( $p=0,001$ ) entre presença de pulga e infecção por *Mycoplasma* spp., no entanto, outros estudos não corroboram com este achado (NIBBLETT et al., 2010; ASSARASAKORN et al., 2012; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013).

Adicionalmente, DNA de micoplasmas hemotróficos foram detectados em ‘pools’ de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* coletados de leões da área de conservação Ngorongoro na Tanzânia, com nível de detecção de 19,7% e 12,9% para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, respectivamente. Entretanto, DNA de ‘*Candidatus M. turicensis*’ não foi detectado nestes mesmos carrapatos (FYUMAGWA et al., 2008). Embora a presença de carrapatos parasitando gatos domésticos seja um achado pouco comum quando comparado à infestação por pulgas (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007; 2011), seu papel na transmissão de hemoplasmas aos felinos ainda é especulado. Desta forma, estes estudos sugerem que os ectoparasitos *C. felis* e *R. sanguineus* sejam prováveis vetores de hemoplasmosse felina. Barker et al. (2011b) sugere a transmissão vetorial mecânica como forma consistente de transmissão do agente através da mínima habilidade do hemoparasito em sobreviver fora do hospedeiro.

Infecção por hemoplasmas já foi observada na ausência de vetores, o que sugere a existência de outras formas de infecção (TASKER, 2010). A transfusão sanguínea configura uma possível forma de transmissão iatrogênica de hemoplasmas entre felinos. Assim sendo, o Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) recomenda que amostras de sangue de gatos e cães doadores sejam rastreadas para alguns agentes infecciosos transmitidos ou não por artrópodes vetores, dentre os quais estão os hemoplasmas, *Cytauxzoon* spp. e *Bartonella* spp. (WARDROP et al., 2005). O risco de transmissão de hemoplasma utilizando sangue estocado em processos de transfusão sanguínea depende da viabilidade dos hemoparasitos neste material biológico (TASKER, 2010). *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foram transmitidos a gatos não parasitados por meio de transfusão sanguínea utilizando bolsas de sangue com sangue fresco (1h) e com 1 semana estocado, respectivamente (GARY et al., 2006), comprovando a importância da triagem prévia de agentes infecciosos no sangue de gatos doadores. WILLI et al. (2006) reportaram a infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em gato após transfusão com sangue de gato doador não submetido à triagem.

Há outras formas possíveis de transmissão, tais quais transmissão vertical da mãe aos filhotes através da placenta, durante o nascimento e a lactação e pelo uso de equipamentos e material cirúrgico contaminado sem correta esterilização entre diferentes gatos (TASKER, 2010).

### **2.1.3 Patogenia da hemoplasmosse**

#### **2.1.3.1 Indução da anemia**

O mecanismo de patogenia dos hemoplasmas ainda não está totalmente elucidado. Entretanto, sabe-se que a anemia resultante é secundária ao sequestro e hemólise das hemácias (CARNEY; ENGLAND, 1993). A adesão destes hemoparasitos aos eritrócitos resulta em dano direto à membrana celular e conseqüentemente na redução de sua vida útil (TASKER, 2004).

Há dois mecanismos envolvidos na ocorrência da anemia – hemólise intra e extravascular. Os hemoplasmas induzem alteração estrutural ao se ligarem na superfície dos eritrócitos resultando em modificação antigênica ou exposição de antígenos localizados internamente na membrana celular com conseqüente produção de anticorpos anti-eritrócitos pelo hospedeiro. Na hemólise extravascular há sequestro e fagocitose das hemácias por macrófagos do baço, fígado, pulmão e medula óssea (TASKER, 2010), além de determinar a ocorrência de anemia hemolítica imunomediada (AHIM) secundária (VILLIERS, 2005). Quando ocorre a fixação do complemento pelas imunoglobulinas, há aumento da fragilidade osmótica levando à hemólise intravascular (TASKER, 2010).

Anticorpos antieritrócitos podem ser detectados pelo teste de Coombs, como observado em gatos anêmicos infectados com *Mycoplasma haemofelis* (TASKER et al., 2009b). Os macrófagos esplênicos podem adicionalmente remover os parasitos da superfície das hemácias, retornando-as à circulação sanguínea, o que explica o rápido aumento do hematócrito subsequente à remoção dos microrganismos da circulação (TASKER; LAPPIN, 2006).

Na hemoplasmose ocorre parasitemia cíclica em período inicial da infecção, conforme demonstrado em gatos experimentalmente infectados. Dentre as causas sugeridas estão sequestro de hemácias parasitadas com subsequente remoção do parasito ou sincronia entre remoção e multiplicação dos hemoplasmas remanescentes no sangue (TASKER, 2010). No entanto, o proposto mecanismo de sequestro tecidual ainda não foi comprovado (TASKER et al., 2009a; WOLF-JACKEL et al., 2012). A população de *M. haemofelis* apresenta acentuada flutuação na corrente sanguínea, em contraste com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’, que flutuam pouco (TASKER, 2010).

### **2.1.3.2 *Mycoplasma haemofelis***

A infecção experimental por *M. haemofelis* frequentemente resulta em anemia hemolítica durante fase aguda de infecção (TASKER, 2010). Dados da literatura são divergentes, uma vez que alguns trabalhos associam a infecção por *M. haemofelis* em gatos à anemia (KEWISH et al., 2004; TASKER et al., 2004; HORA, 2008), enquanto outros não comprovam esta associação (ISHAK et al., 2007; MAHER et al., 2010).

Braddock et al. (2004) detectaram *M. haemofelis*, por meio de qPCR, em um gato naturalmente infectado com anemia severa e febre. Sugere-se que gatos, em fase aguda de infecção por *M. haemofelis*, desenvolvam anemia hemolítica na presença de intensa parasitemia e que gatos infectados cronicamente não apresentam sinais clínicos mesmo com alta parasitemia (WILLI et al., 2006). Entretanto, características gerais da doença não devem ser afirmadas baseadas em casos individuais de infecção natural (TASKER, 2010).

Aragão-de-Sousa et al. (2013) não detectaram esta espécie de hemoplasma em gatos domiciliados clinicamente saudáveis. Em contrapartida, Juvet et al. (2010) não observaram diferença na prevalência deste entre animais domiciliados e errantes. Não foi verificada associação entre infecção por *M. haemofelis* e a infecção por retrovírus em gatos (MACIEIRA et al., 2008).

Estes achados distintos podem estar relacionados à população de gatos estudada, diferentes isolados de *M. haemofelis* ou fase de evolução da doença (aguda ou crônica) (WILLI et al., 2006; TASKER, 2010). Entretanto, sabe-se que *M. haemofelis* é a espécie mais patogênica e geralmente associada à doença clínica (WILLI et al., 2007; SOLANO-GALLEGO, 2008; TASKER et al., 2009a).

### **2.1.3.3 ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’**

Infecção experimental por ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ raramente resulta em sinais clínicos significativos, embora por vezes, haja redução nos parâmetros do eritrograma (TASKER, 2010). Anemia não foi associada à infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em gatos naturalmente infectados (KEWISH et al., 2004; MAHER et al., 2010; WOLF-JÄCKEL et al., 2012). Sinais clínicos podem ser observados em infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ quando há doenças concomitantes (MAIA et al., 2013; WILLI et al., 2006). Gatos infectados por FIV e FeLV tiveram maior chance de se infectar por ‘*Candidatus M. haemominutum*’, entretanto, esta relação não foi observada para gatos infectados somente com FeLV (MACIEIRA et al., 2008). Tasker et al. (2004) associou anemia à infecção natural por ‘*Candidatus M. haemominutum*’, no entanto, não foi avaliada coinfeção por retrovírus, inviabilizando relacionar a anemia observada única e

exclusivamente à infecção pelo hemoplasma. Juvet et al. (2010) observou anemia em gato infectado por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e portador de neoplasia. A infecção por este hemoplasma tem sido relatada em gatos machos (TASKER et al., 2004; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013), mais velhos (TASKER et al., 2004; JUVET et al., 2010; JENKINS et al., 2013) e errantes (ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013).

#### **2.1.3.4 ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’**

A infecção por ‘*Candidatus M. turicensis*’ frequentemente cursa com ausência de sinais clínicos ou discreta redução dos parâmetros do eritrograma sem associação estatística (WILLI et al., 2006; TASKER et al., 2010).

A inoculação experimental de sangue heparinizado de gato infectado por ‘*Candidatus M. turicensis*’ a gatos não infectados resultou na indução de anemia nos receptores (WILLI et al., 2005). Gatos naturalmente infectados por ‘*Candidatus M. turicensis*’ geralmente apresentam doenças concomitantes, tais quais neoplasias, doença do trato urinário inferior, retrovíroses, AHIM. A existência de coinfeção deste hemoplasma com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em cerca de 50% dos casos sugere a existência de via de transmissão similar entre estes dois hemoplasmas (WILLI et al., 2006).

Anemia pode ser observada em decorrência de enfermidades concomitantes (TASKER et al., 2010) ou em coinfeção por outros hemoplasmas (WILLI et al., 2007), de modo que o potencial patogênico deste hemoplasma parece depender destes cofatores (WILLI et al., 2006). ‘*Candidatus M. turicensis*’ foi a espécie de maior ocorrência em gatos naturalmente infectados no Pará, com associação da infecção a doenças concomitantes (ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013).

‘*Candidatus M. turicensis*’ é a única espécie de micoplasma felino ainda não visualizado em esfregaços sanguíneos à microscopia óptica (WILLI et al., 2006; 2011). Tal fato pode estar relacionado à baixa parasitemia apresentada por esta espécie quando comparada com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* (WILLI et al., 2006).

#### **2.1.3.5 Portadores assintomáticos**

Visto que não há cura microbiológica por nenhum dos protocolos terapêuticos já instituídos para tratamento da hemoplasmoses para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, gatos recuperados clinicamente da infecção tornam-se cronicamente infectados (TASKER; LAPPIN, 2006; BAUMANN et al., 2013), conferindo fonte de infecção aos demais animais, assim como aos supostos artrópodes vetores. Nestes gatos parece haver equilíbrio entre a multiplicação dos hemoplasmas e a remoção destes do organismo (FOLEY et al., 1998).

A existência de portadores crônicos é particularmente importante na transfusão de sangue em felinos, na qual a triagem de agentes infecciosos no sangue de doadores é imperativa (BARKER; TASKER, 2013).

Em estudos epidemiológicos, observa-se com frequência animais positivos para hemoplasmas sem qualquer manifestação clínica, sugerindo que estes animais sejam prováveis fontes de infecção e reservatórios destes hemoparasitos na natureza. Este achado favorece a manutenção dos agentes na natureza. Willi et al. (2006), no entanto, observaram cura microbiológica espontânea em gatos positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’.

#### **2.1.4 Sinais clínicos e achados laboratoriais**

O espectro clínico da infecção por hemoplasmas em felinos pode variar desde assintomático com discreta anemia a crises hemolíticas graves que levam ao óbito (FOLEY et al., 1998).

Os sinais clínicos e achados laboratoriais da hemoplasmosose variam com a espécie do parasito, estágio da doença, susceptibilidade do hospedeiro e presença de doença concomitante (MESSICK, 2003; TASKER; LAPPIN, 2006; TASKER, 2010). Há maior prevalência de hemoplasmas em gatos FIV e/ou FeLV positivos do que em gatos negativos, com taxa elevando-se de 11,5% para até 50% (MACIEIRA et al., 2008). Os sinais clínicos frequentemente observados são palidez de mucosas, letargia, desidratação, fraqueza, taquicardia, taquipnéia, esplenomegalia, linfadenopatia e ocasionalmente febre e icterícia (MESSICK, 2003; BRADDOCK et al., 2004; TASKER, 2010).

As anormalidades laboratoriais secundárias à hemoplasmosose mais comuns são anemia regenerativa com anisocitose, policromasia, reticulocitose e corpúsculos de Howell-Jolly (SYKES, 2010). Ocorre, geralmente, hemólise extravascular com anemia macrocítica hipocrômica. Braddock et al. (2004) observaram grave anemia regenerativa com reticulocitose, moderada policromasia e anisocitose eritrocitárias em gato naturalmente infectado por *M. haemofelis*. Kewish et al. (2004) observaram maior prevalência de hemoplasmas, predominantemente *M. haemofelis* (66,7%), no grupo de gatos com anemia regenerativa quando comparado aos grupos com anemia arregenerativa e de animais não anêmicos. Alguns gatos mostram nenhum ou discreto grau de regeneração devido à fase inicial da anemia ou infecção retroviral concomitante (MESSICK, 2003; HORA, 2008; SYKES, 2010; TASKER, 2010). Contagem de plaquetas encontra-se geralmente dentro do valor de referência para a espécie (BRADDOCK et al., 2004; TASKER, 2004; HARVEY, 2006). Leucograma geralmente encontra-se normal, entretanto, as contagens global e diferencial podem ser variáveis e de baixo valor diagnóstico, pois refletem a condição orgânica num momento específico (FOLEY et al., 1998; SYKES, 2010).

O perfil bioquímico sérico pode revelar aumento na enzima hepática alanina aminotransferase (ALT), hiperbilirrubinemia e azotemia pré-renal (SYKES, 2010). O aumento de ALT reflete hipóxia hepática secundária à anemia enquanto que hiperbilirrubinemia é achado consistente com hemólise. Pode haver hiperproteinemia secundária à desidratação (TASKER, 2010).

### **2.1.5 Diagnóstico**

Há diversas técnicas disponíveis para diagnóstico de agentes infecciosos na medicina felina (VEIR; LAPPIN, 2010). O método mais comumente utilizado para diagnóstico da hemoplasmosose é a demonstração de organismos na superfície dos eritrócitos por meio da microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, bem como associação com sinais clínicos, histórico e hábitos de vida do animal (TOLEDO-PINTO et al., 2005).

#### **2.1.5.1 Citologia de esfregaços sanguíneos**

A técnica de citologia requer que o micro-organismo esteja em quantidade e seja grande o suficiente para ser visualizado microscopicamente. A sensibilidade da técnica reduz à medida que a doença progride em decorrência da tendência natural do sistema imune do hospedeiro em reduzir a quantidade do agente no organismo (VEIR; LAPPIN, 2010). Os hemoplasmas são tipicamente encontrados na periferia das hemácias, podendo estar na forma única, em pares, ou em cadeias em severas infestações. Ocasionalmente, podem ser vistos livre dos eritrócitos (TASKER; LAPPIN, 2002; MESSICK, 2003; TASKER, 2010). No entanto, a detecção citológica por meio de esfregaços sanguíneos apresenta baixa sensibilidade. *Mycoplasma haemofelis* é visualizado em menos de 50% das vezes em gatos em fase aguda da doença devido à ocorrência de parasitemia cíclica (TASKER, 2010).

A escolha por esfregaços sanguíneos frescos é imperativa, uma vez que os parasitas se destacam das hemácias em poucas horas quando na presença de EDTA (ALLEMAN et al., 1999), característica que adicionada ao caráter flutuante da parasitemia dos hemoplasmas



conferem comumente resultados falso-negativos (SYKES, 2003; TASKER, 2010). Resultados falso-positivos ocorrem comumente quando os hemoplasmas são confundidos com precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly, artefatos secundários à secagem lenta do esfregaço sanguíneo ou ponteados basofílicos (SYKES, 2003; BARKER; TASKER, 2013)

#### **2.1.5.2 Cultivo microbiológico e testes sorológicos**

Os hemoplasmas ainda não foram cultivados *in vitro* em decorrência da ausência de conhecimento específico sobre suas características de crescimento e requerimento energético. Com o sequenciamento completo do genoma de *M. haemofelis*, observou-se a capacidade metabólica limitada deste agente. O conhecimento desta característica auxilia em tentativas futuras para o estabelecimento de cultura *in vitro* e justifica a falha no crescimento de hemoplasmas em meios de cultura convencionais (BARKER et al., 2011b).

Para desenvolvimento de técnicas sorológicas, uma vez que os hemoplasmas não são cultivados *in vitro*, os antígenos devem ser obtidos por meio de infecção experimental. Logo, testes sorológicos, baseados em proteínas do parasito, ainda não estão disponíveis comercialmente, muito embora estudos estejam sendo desenvolvidos nesse propósito. Estudos têm sido direcionados na identificação e expressão de proteínas recombinantes com potencial imunogênico (WOLF-JÄCKEL et al., 2010; BARKER et al., 2011b; MESSICK; SANTOS, 2011). Wolf-Jäckel et al. (2010) identificaram, caracterizaram e produziram antígeno recombinante da proteína DNak a partir de felinos natural e experimentalmente infectados por *M. haemofelis*. O antígeno foi reconhecido com sucesso por anticorpos de gatos infectados com *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ por meio dos testes sorológicos ‘*Western blotting*’ e Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). Baumann et al. (2013) observaram soroconversão satisfatória em gatos infectados por *M. haemofelis* utilizando a mesma técnica.

#### **2.1.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A PCR amplifica exponencialmente fragmentos específicos de DNA até níveis detectáveis (TASKER; LAPPIN, 2002; TASKER, 2010). É o método de escolha para o diagnóstico de infecções por hemoplasmas devido à elevada sensibilidade e especificidade (TASKER, 2006), por possibilitar a diferenciação entre as espécies (MACIEIRA et al., 2008) e, adicionalmente, por permitir a detecção de hemoplasmas em gatos portadores assintomáticos (SYKES, 2003). PCR tem maior sensibilidade na detecção de hemoplasmas quando comparada a citologia em diversos estudos. A frequência de hemoplasmas determinada pela técnica de citologia varia entre 0,48% a 6,7% enquanto que por PCR os níveis de detecção variam entre 6,5% a 56,7% (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; BAUMANN et al., 2006; MAIA, 2008; BORTOLI et al., 2012; JENKINS et al., 2013).

As reações atualmente existentes amplificam, principalmente, fragmentos dos genes 16S rRNA e RNase P gene (rnpB) (MESSICK, 2003; TASKER, 2010). PCR em tempo real é um ensaio molecular mais sensível que PCR convencional (TASKER, 2010), adicionalmente, permite quantificar o DNA do parasito presente na amostra e conseqüentemente monitorar a resposta ao tratamento (BRADDOCK et al., 2004; TASKER, 2010). O teste qPCR tem sido amplamente utilizado, em virtude da maior sensibilidade, na triagem de gatos clinicamente saudáveis para serem doadores de sangue, bem como para inserção de gatos em colônias livres de patógenos (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013).

#### **2.1.6 Tratamento**

O tratamento é indicado para gatos com sinais clínicos e anormalidades laboratoriais consistentes com a hemoplasmose. O tratamento inclui terapia de suporte, antibioticoterapia e transfusão sanguínea em gatos com grave anemia (TASKER, 2010).

Os hemoplasmas são sensíveis às tetraciclinas, pois estas inibem especificamente a síntese proteica em procariontos (TASKER; LAPPIN, 2002). O derivado de tetraciclina de eleição em gatos é a doxiciclina devido a menor ocorrência de efeitos colaterais nesta espécie. A dose recomendada é de 10mg/kg uma vez ao dia administrado por via oral junto à alimentação (TASKER; LAPPIN, 2006) ou com fornecimento subsequente de água devido ao risco de esofagite associada à terapia com tetraciclinas em gatos (McGROTTY; KNOTTENBELT, 2002; GERMAN et al., 2005). Tasker & Lappin (2006) recomendam a antibioticoterapia por 28 dias dependendo da resposta ao tratamento, a qual deve ser acompanhada clinicamente e por PCR.

Antibióticos da classe quinolonas também têm sido eficazes no tratamento de micoplasmose felina - enrofloxacina (5mg/Kg/24h), marbofloxacina (2,75mg/Kg/24h) e pradofloxacina (5-10mg/Kg/24h). Enrofloxacina tem sido associada à degeneração da retina e cegueira aguda em raros casos, e, por tal, recomenda-se cautela no uso desta droga como alternativa terapêutica (TASKER, 2010).

A inserção da corticoterapia no protocolo terapêutico da micoplasmose felina é controversa. Tasker (2010) recomenda o uso desta somente nos casos em que AHIM seja a maior causa provável da condição clínica e em casos em que não haja evidência de que os hemoplasmas sejam a causa da doença.

Estudos revelam que animais infectados podem permanecer como carreadores crônicos por meses a anos, mesmo depois de tratados com antibióticos (SOLANO-GALLEGO, 2008). Logo, tratamento de animais clinicamente saudáveis positivos nos ensaios moleculares (PCR) não é recomendado, visto que nenhum protocolo terapêutico demonstrou total eficiência na eliminação dos micro-organismos (MESSICK, 2003; SYKES, 2010; BARKER; TASKER, 2013), assim como observado por Willi et al.(2006) em gatos infectados por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*'.

Entretanto, é recomendado o tratamento de gatos infectados por '*Candidatus M. turicensis*' com doxiciclina mesmo na ausência de anemia, pois aparente cura microbiológica foi observada após o tratamento e assim permaneceu mesmo após corticoterapia. E, adicionalmente, devido à possibilidade de grave hemólise aguda secundária à imunossupressão ou estresse (WILLI et al., 2006).

A terapia de suporte inclui fluidoterapia intravenosa em casos de desidratação, suporte nutricional, transfusão sanguínea quando o hematócrito for inferior a 12% e, caso necessário, oxigenioterapia (TASKER, 2010).

### **2.1.7 Prevenção**

Como a epidemiologia da hemoplasmose felina é pouco compreendida, sua prevenção torna-se difícil. Considerando as diversas possibilidades de transmissão associadas aos fatores de risco, recomenda-se eliminar os artrópodes vetores, especialmente as pulgas, evitar acesso à rua e conseqüentemente, evitar a interação agressiva entre os animais (TASKER; LAPPIN, 2006). É notável a importância da triagem do sangue de gatos doadores para as três espécies de hemoplasma, uma vez que os gatos receptores, geralmente estão debilitados e, portanto, a aquisição de quaisquer espécies de hemoplasmas pode levar a doença grave (WILLI et al., 2006).

### **2.1.8 Importância em Saúde Pública**

Historicamente, infecções por organismos semelhantes aos hemoplasmas foram relatadas em humanos por meio de diagnóstico citológico, especialmente naqueles portadores de alguma alteração sistêmica, tais quais, neoplasia, lúpus eritematoso sistêmico e portadores do vírus HIV (CLARK, 1975; PUNTARIC et al., 1986; DUARTE et al., 1992; YANG et al., 2000; BOSNIC et al., 2010). TASKER et al. (2010), não conseguiram confirmar as infecções

reportadas previamente por Clark et al. (1975) e Yang et al. (2000) a partir de DNA obtido dos respectivos esfregaços sanguíneos dos humanos, indicando que possivelmente tratavam-se de infecções por outros agentes.

No Brasil, *Mycoplasma haemofelis* foi detectado no sangue de um paciente humano HIV positivo hospitalizado com sintomas clínicos, coinfectado por *Bartonella henselae* e com histórico de mordida e arranhaduras por gatos. Os gatos do paciente também foram positivos para *M. haemofelis* e para *Bartonella* spp. (SANTOS et al., 2008). Tasker et al. (2010) encontraram DNA de hemoplasma em paciente sul africana portadora do vírus HIV, entretanto, a espécie não pode ser caracterizada devido à baixa parasitemia. Assim, deve-se considerar que hemoplasmas podem, possivelmente, atuar como um agravante em pacientes imunocomprometidos.

Como previamente reportado, bactérias do gênero *Mycoplasma* atuam como possíveis cofatores na indução da propagação do vírus HIV (NIR-PAZ et al., 1995). Em decorrência da similaridade genética entre *Mycoplasma* spp., os micoplasmas hemotróficos provavelmente atuam de maneira similar, contribuindo assim com a aceleração do curso desta doença viral em humanos (SANTOS et al., 2008).

Médicos veterinários também representam um grupo de risco a estas infecções. Maggi et al. (2013) reportaram coinfeção por *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ em uma médica veterinária que estava frequentemente em contato com animais domésticos e silvestres e seus vetores e apresentava histórico de mordidas e arranhaduras. Hu et al. (2009) evidenciou infecção pelo micoplasma hemotrófico, *Mycoplasmas suis*, em médicos veterinários e fazendeiros na China.

Poucas informações estão disponíveis a respeito da ocorrência de micoplasmas felinos em humanos, bem como sobre seu potencial zoonótico. Desta forma, médicos veterinários que representam grupo de risco devem manipular o sangue de animais infectados com cautela (SYKES, 2010) e utilizar equipamentos de proteção e hábitos de higiene em qualquer procedimento com animais (MAGGI et al., 2013).

## 2.2 *Cytauxzoon felis*

### 2.2.1 Agente etiológico: Morfologia e histórico

Cytauxzoonose felina é uma doença causada por *Cytauxzoon felis*, um protozoário pertencente à família Theileriidae que parasita eritrócitos e macrófagos ou fagócitos mononucleares de felinos (MEINKOTH; KOCAN, 2005). Os parasitas intraeritrocíticos são pleomórficos e em função disto, seu tamanho pode variar de 0,3 a 2,4  $\mu\text{M}$ . Os formatos observados são oval, bipolar, anaplasmoide, em anel, em haste e adicionalmente, em cadeias ou em formato em cruz de malta quando há intensa parasitemia (KIER et al., 1987), sendo a forma em anel mais comumente observada (MEINKOTH; KOCAN, 2005). Macrófagos contendo formas de *C. felis* em tecidos apresentam tamanho inicial de 15 a 20  $\mu\text{M}$  e se tornam progressivamente maiores atingindo 80 a 250  $\mu\text{M}$  (KIER et al., 1987).

Em 1948, Neitz & Tomas descreveram o gênero *Cytauxzoon* no intuito de alocar o micro-organismo responsável por doença fatal em Duiker (*Sylvicapra grimmia*), sendo este agente nomeado *Cytauxzoon sylvicaprae* e inserido na família Theileriidae. *Cytauxzoon* spp. foram posteriormente descritos infectando outros ruminantes africanos, tais quais kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), elande (*Taotragus oryx*), girafa (*Giraffe camelopardalis*), palanca-negra (*Hippotragus niger*), palanca vermelha (*Hippotragus equinus*) e cabra-de-leque (*Antidorcas marsupialis*) (NEITZ, 1957; MARTIN; BROCKLESBY, 1960; MCCULLY et al., 1970; WILSON et al., 1974).

Os primeiros relatos de cytauxzoonose felina foram inicialmente diagnosticados como anemia infecciosa felina (atual micoplasmose felina) devido a suspeita natural desta doença no aparecimento de inclusões intraeritrocíticas. Wagner et al. (1976) evidenciaram o parasita responsável por causar doença fatal em felinos domésticos de Missouri, EUA e concluíram tratar-se de *Cytauxzoon* spp., devido à presença de esquizontes em macrófagos intravasculares e inclusões no interior de hemácias, assemelhando-se assim aos parasitos observados previamente em ruminantes africanos. O agente foi posteriormente denominado *Cytauxzoon felis*. O protozoário *C. felis* pertence à família Theileriidae e, portanto, apresenta nos hospedeiros vertebrados fase de esquizogonia tecidual na forma de esquizonte e fase intraeritrocítica na forma de piroplasma. O gênero *Cytauxzoon* é designado aos agentes cuja fase tecidual ocorre no interior de macrófagos ou fagócitos mononucleares e *Theileria*, aos agentes que invadem os linfócitos para a fase de esquizogonia (KIER et al., 1987).

Nos EUA, Glenn et al. (1982) observaram organismos morfologicamente semelhantes a *Cytauxzoon felis* em sangue periférico de lincês (*Lynx rufus*) de vida livre aparentemente saudáveis. No entanto, a inoculação experimental do sangue destes lincês em gatos saudáveis não resultou em doença fatal, sendo constatada somente parasitemia persistente. Em decorrência de inúmeros hemoparasitos terem sua transmissão associada aos carrapatos, como *Babesia* spp. e *Theileria* spp., foi investigada a possibilidade de transmissão de *C. felis* por estes ectoparasitos. Carrapatos *Dermacentor variabilis* foram alimentados em lincês infectados por *C. felis* e posteriormente em gatos saudáveis, o que resultou em doença fatal nos mesmos. Deste modo, sugeriu-se que os parasitas intraeritrocíticos observados nos lincês eram *C. felis* e que a passagem destes parasitos pelos carrapatos era necessária para que os mesmos se tornassem patogênicos (BLOUIN et al., 1984).

Cytauxzoonose foi reportada, adicionalmente, em outros felídeos selvagens nos EUA. Zinkl e McDonald (1981) observaram parasitemia em guepardos (*Acinonyx jubatus*) assintomáticos mantidos em cativeiro da Califórnia, no entanto, houve falha no desenvolvimento experimental de parasitemia ou doença em gatos a partir do sangue dos felinos selvagens. Cowell et al. (1988) observaram formas de *C. felis* em sangue de linco de vida livre em Oklahoma. Neste mesmo estudo, gatos esplenectomizados e experimentalmente infectados, com o isolado obtido do sangue de linco, apresentaram simultaneamente

parasitemia acentuada e persistente com redução do hematócrito. Garner et al. (1996) relataram um caso de citauxzoonose fatal em tigre branco nascido em cativeiro na Flórida. Nenhum caso de citauxzoonose felina havia sido relatado fora do território norte americano até que num zoológico na Alemanha um tigre de bengala (*Panthera tigris*) desenvolveu a doença fatal e, por meio de diagnóstico histopatológico, foram observadas formas de *C. felis* no interior de macrófagos em diversos tecidos. Para este zoológico, haviam sido importados lincos dos EUA, sendo, portanto, os possíveis responsáveis pela introdução do agente (JAKOB; WESEMEIER, 1996). Infecção natural por *C. felis* também foi observada em panteras da Flórida (*Puma concolor coroyi*) e pumas do Texas (*Puma concolor coroyi stanleyana*) de vida livre e saudáveis, com evidência de parasitemia em aproximadamente 36% destes felídeos (ROTSTEIN et al., 1999). Na Mongólia, piroplasmas intraeritrocíticos foram evidenciados em gatos de Pallas (*Otocolobus manul*) de vida livre, no entanto, análise filogenética evidenciou se tratar de uma nova espécie de *Cytauxzoon*, denominada *C. manul* (KETZ-RILEY et al., 2003; REICHARD et al., 2005). Na Espanha, *C. felis* foi identificado em lincos ibéricos (*Lynx pardinus*) (LUACES et al., 2005).

Desde a década de 90, infecções naturais por *Cytauxzoon* spp. têm sido reportadas no Brasil em onças pintadas (*Panthera onca*), leões (*Panthera Leo*), gatos-do-mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), suçuaranas (*Puma concolor*), tigre (*Panthera tigris*) e gatos mouriscos (*Puma yagouaroundi*) mantidos em cativeiro, por meio de diagnóstico citológico em esfregaços sanguíneos, histopatológico e molecular (PEIXOTO et al., 1999; SOARES, 1999a; SOARES, 1999b; SOARES et al., 2004; PEIXOTO et al., 2007; ANDRÉ et al., 2009; FILONI et al., 2012). Estudos de análise filogenética comprovaram ser *Cytauxzoon felis* o agente responsável por citauxzoonose felina em parte dos felinos selvagens acima citados (SCOFIELD, 2006; ANDRÉ, 2012). Piroplasmas semelhantes à *Cytauxzoon* spp. já foram reportadas em gatos errantes assintomáticos do zoológico do Rio de Janeiro por meio de citologia de esfregaço sanguíneo (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007). Neste mesmo estudo, no entanto, não foi realizada diferenciação da infecção pelos demais piroplasmas tão pouco confirmação molecular da infecção por *C. felis*. No Rio de Janeiro, Maia et al. (2013) realizou a primeira detecção molecular de *C. felis* em gatos no Brasil. O gato acometido veio a óbito dias após o início dos sinais clínicos e apresentava coinfeção por ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, sendo tal coinfeção também observada em felinos selvagens por André (2012).

## 2.2.2 Epidemiologia

### 2.2.2.1 Prevalência

A prevalência de *Cytauxzoon felis* varia mundialmente em decorrência de características climáticas diversas e da distribuição do carrapato vetor, sendo usualmente observada em gatos errantes ou pertencentes a fazendas, nos quais há elevada infestação por carrapatos (FERRIS, 1979). Nos EUA, onde *C. felis* é endêmico, a prevalência em gatos, obtida por ensaios moleculares, varia de 0,3% a 93,4% dependendo da população estudada (gatos errantes, assintomáticos e positivos na microscopia) (HABER et al., 2007; REICHARD et al., 2008; BROWN et al., 2009; BROWN et al., 2010). Nos felídeos selvagens considerados reservatórios naturais, a prevalência varia de 7% a 30% em lincos (BIRKENHEUER et al., 2008; BROWN et al., 2010); já a prevalência observada em panteras da Flórida de vida livre foi de 39% (ROTSTEIN et al., 1999).

A ocorrência deste parasito já foi relatada em outros continentes. No Iraque, a prevalência de *Cytauxzoon* spp. encontrada por microscopia óptica foi 22% (11/50) em gatos domésticos com sintomas inespecíficos (SULIMAN, 2009). Na Itália, a frequência de *C. felis* em gatos domiciliados foi de 9,6%, por meio de PCR. Já em gatos errantes, foi de 23,8% e

30,2% pelas técnicas de microscopia direta e PCR, respectivamente. Neste estudo houve associação positiva entre gatos errantes e de hábito livre e infecção por *C. felis* (CARLI et al., 2012).

A literatura sobre *Cytauxzoon* spp. no Brasil é escassa. No Rio de Janeiro, observou-se prevalência crescente de *Cytauxzoon* spp. ao longo dos anos 2002, 2003 e 2004, respectivamente, 15,8%, 34,0% e 48,5% em felinos assintomáticos por meio da detecção direta em esfregaço sanguíneo, sugerindo competência vetorial para *Rhipicephalus sanguineus*, única espécie de carrapato encontrada nos gatos estudados (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007). No entanto, sendo esta técnica inadequada para confirmação de infecção por *C. felis*, acredita-se que o grau de infecção observado neste estudo esteja superestimado. Por meio da análise molecular, Maia (2008) detectou DNA de *C. felis* em 0,48% dos gatos amostrados. *C. felis* já foi detectado em felinos selvagens, cuja frequência varia de 0,9% a 13% (ANDRÉ et al., 2009; FILONI et al., 2012).

#### **2.2.2.2. Fatores de risco**

Infecção por *Cytauxzoon felis* é observada com maior frequência em áreas de baixa densidade residencial ou áreas rurais próximas a ambientes naturais e arborizados, ambientes estes que coincidem provavelmente com o habitat natural dos felídeos selvagens reservatórios (FERRIS, 1979; REICHARD et al., 2008). Outros fatores associados à infecção em gatos foram contato prévio com gatos doentes ou sobreviventes à infecção e exposição aos carrapatos vetores (REICHARD et al., 2008; BROWN et al., 2010). Gatos errantes ou domiciliados com acesso à rua são considerados mais propensos à infecção devido a maior exposição aos carrapatos vetores bem como aos reservatórios naturais (CARLI et al., 2012). No Brasil, em decorrência da escassez de estudos abordando a epidemiologia da doença bem como ao desconhecimento dos carrapatos vetores, os fatores de risco à infecção ainda não são conhecidos.

#### **2.2.2.3. Transmissão**

A transmissão natural de *C. felis* pode ocorrer através de picadas de carrapatos, transfusão sanguínea ou transplacentária (SIMPSON et al., 1985; MEINKOTH, 2001; ALMOSNY et al., 2002). Experimentalmente, *Cytauxzoon felis* já foi transmitido com sucesso a animais sadios através de injeção subcutânea, intraperitoneal e intravenosa de sangue e solução de baço, fígado, pulmão e linfonodos de animais infectados (FERRIS, 1979; WAGNER et al., 1980). Uilenberg et al. (1987) não observaram manifestação clínica da doença quando houve inoculação de sangue fresco infectado por formas de piroplasma de *C. felis* em gatos sadios, no entanto, sugere-se que a presença de macrófagos parasitados circulantes possibilite o desenvolvimento da doença (KIER et al., 1987; MEINKOTH; KOCAN, 2005). Não há transmissão direta de *C. felis* por contato com animais infectados ou por via oral (WAGNER et al., 1980). Blouin et al. (1984) e Reichard et al. (2010) demonstraram a competência vetorial dos carrapatos *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum* na transmissão de *C. felis* para gatos.

O felino selvagem lince (*Lynx rufus*) é considerado o hospedeiro natural do parasito e a principal fonte de infecção deste agente para os felinos domésticos nos EUA (GLENN et al., 1983). A prevalência de *C. felis* nesta espécie é elevada, principalmente em áreas onde há ocorrência da doença em gatos domésticos (BIRKENHEUER et al., 2008; ANDRÉ et al., 2009). No entanto, outros felídeos selvagens são considerados possíveis hospedeiros para o agente (ROTSTEIN et al., 1999). No Brasil, *Cytauxzoon felis* já foi detectado em diversas espécies de felídeos selvagens, no entanto, os carrapatos vetores responsáveis pela transmissão do agente em outros continentes, *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum*, aqui são inexistentes (SOARES, 2001). Deste modo, maiores estudos ainda são

necessários para detecção do vetor local e elucidar o mecanismo de transmissão do agente ao hospedeiro. Mendes-de-Almeida et al. (2007) reportaram infecção crescente por piroplasmas em gatos assintomáticos por meio da detecção direta em esfregaço sanguíneo, sugerindo a existência de um vetor competente, possivelmente *Rhipicephalus sanguineus*, a única espécie de carrapato encontrada nos gatos estudados. André et al. (2009) não detectaram DNA de *C. felis* em pulgas coletadas de felídeos selvagens.

Durante muito tempo, felinos domésticos foram considerados hospedeiros terminais de *C. felis*, devido à ocorrência esporádica, curso rápido e histórico de elevada letalidade de citauxzoonose nestes animais. Em contraste, lince infectados apresentam parasitemia persistente e esquizogonia transitória ou auto-limitante, sendo, portanto, incriminados como reservatórios naturais de *C. felis* (WAGNER et al., 1980; HOOVER et al., 1994; GREENE et al., 2006). No entanto, estudos têm reportado gatos sobreviventes à infecção com desenvolvimento de parasitemia persistente após cura clínica (MEINKOTH et al., 2000; BROWN et al., 2008). A observação de parasitemia em felinos assintomáticos e naqueles recuperados de infecção sugere que estes sejam carreadores de uma forma subclínica da enfermidade ou reservatórios adicionais do parasita, alterando o paradigma de que lince sejam as principais fontes de infecção para gatos domésticos (MEINKOTH et al., 2000; HABER et al., 2007; BROWN et al., 2008).

O Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) recomenda que amostras de sangue de gatos e cães doadores devam ser rastreadas para alguns agentes infecciosos transmitidos ou não por artrópodes vetores, dentre estas, hemoplasmas, *Cytauxzoon* spp. e *Bartonella* spp. (WARDROP et al., 2005). Logo, a transfusão sanguínea configura uma possível rota de transmissão de *C. felis*.

### 2.2.3 Ciclo biológico e patogenia

Citaxzoonose felina é uma doença causada por *Cytauxzoon felis*, um piroplasma pertencente à família Theileriidae, que afeta felídeos selvagens e domésticos (MEINKOTH; KOCAN, 2005). Em vertebrados, o ciclo compreende uma fase eritrocítica e uma fase epiteliotrófica, na qual um único esquizonte se desenvolve no interior de macrófagos (GREENE et al., 2006).

Os carrapatos vetores, responsáveis pela transmissão de *C. felis* aos felinos, ao realizarem o repasto sanguíneo inoculam esporozoítas no hospedeiro e estes por sua vez penetram em fagócitos mononucleares associados ao endotélio vascular (KOCAN et al., 1992). No interior dos fagócitos, se multiplicam formando esquizonte único com consequente aumento do volume celular e oclusão dos vasos sanguíneos. O esquizonte maduro se rompe liberando formas merozoítas e estes, por sua vez, penetram nos eritrócitos sem que haja ruptura de membrana celular e se replicam (FERRIS, 1979; KIER et al., 1987; HOLMAN; SNOWDEN, 2009). O aparecimento de merozoítas nos tecidos corresponde simultaneamente ao aumento da parasitemia nos eritrócitos (KIER et al., 1979). Os carrapatos durante o repasto sanguíneo captam as formas do piroplasma circulantes.

Uilenberg et al. (1987) demonstraram que a inoculação de sangue fresco de gato infectado em gatos sadios determinou a ocorrência de parasitemia, no entanto, nenhum sintoma além de anemia foi observado. Contraditoriamente, estes mesmos gatos quando inoculados com homogenato de baço contendo esquizontes de *C. felis* desenvolveram a doença clínica com óbito após duas semanas. Tal observação demonstra que a fase de piroplasma, por si só, é relativamente inócua e não causa sinais clínicos severos em felinos, resultando em parasitemia assintomática ou manifestação apenas de anemia. A fase de esquizogonia, ou seja, fase na qual há oclusão de vasos sanguíneos em pulmões, baço, linfonodos e fígado por macrófagos repletos de parasitos, é responsável pelos sinais clínicos

graves da doença (GLENN et al., 1983; UILENBERG et al., 1987; NIETFELD; POLLOCK, 2002; MEINKOTH; KOCAN, 2005)

Infecção por *Cytauxzoon felis* em gatos resulta frequentemente em doença aguda e fatal (WAGNER et al., 1980), com desenvolvimento de eritroparasitemia e esquizontes em macrófagos em diversos tecidos. Em linceas, no entanto, a infecção é usualmente assintomática com eritroparasitemia persistente e ausência de esquizontes em tecidos. No entanto, infecções fatais em linceas já foram reportadas (NIETFELD; POLLOCK, 2002; MEINKOTH; KOCAN, 2005).

#### **2.2.4 Sinais clínicos e achados laboratoriais**

Citauzoonose felina evolui de forma aguda, com duração de 1 a 2 semanas após o aparecimento dos sinais clínicos (FERRIS, 1979; MEINKOTH; KOCAN, 2005). A manifestação clínica é secundária ao desenvolvimento de esquizontes nos tecidos (MEINKOTH; KOCAN, 2005) e se manifesta de maneira semelhante em gatos natural ou experimentalmente infectados (FERRIS, 1979; WAGNER et al., 1980). Os sinais clínicos são inespecíficos e aparecem a partir do quinto ao décimo quarto dia após a exposição ao agente, sendo os sintomas iniciais anorexia progressiva, fraqueza, desidratação e depressão (FERRIS, 1979; KIER et al., 1987; MEINKOTH; KOCAN, 2005). Eventualmente podem ser observados outros sinais, como vômito, diarreia e hepatoesplenomegalia (BIRKENHEUER et al., 2006). Posteriormente, verifica-se hipertermia gradual que varia de 40,6°C a 41,8°C e se mantém por três a quatro dias, depois retornando a normalidade ou, em alguns casos, evolui para hipotermia. Próximo à morte, sinais como anemia, icterícia, vocalização gerada provavelmente por dor e dispnéia tornam-se aparentes (FERRIS, 1979; WAGNER et al., 1980; KIER et al., 1987; GREENE et al., 2006).

Na literatura, os resultados obtidos nas determinações laboratoriais de citauzoonose são diversos. Na análise hematológica, observam-se combinações variáveis de citopenias como anemia, leucopenia com granulações tóxicas, linfopenia e trombocitopenia (KIER et al., 1987; HOLMAN; SNOWDEN, 2009). Anemia é um achado comumente observado no curso final da doença, sendo frequentemente arregenerativa. Esta alteração resulta provavelmente da remoção de hemácias parasitadas por *C. felis* da circulação por macrófagos, uma vez que eritrofagocitose é um achado comum em felinos acometidos (FERRIS, 1979; COWELL et al., 1988). Os parâmetros bioquímicos frequentemente acima do valor de referência são bilirrubina total, Alanina aminotransferase (ALT),  $\gamma$ -Glutamilttransferase (GGT) e, eventualmente, uréia e creatinina (HOOVER et al., 1994; MAIA, 2008; CARLI et al., 2012)

#### **2.2.5 Achados de necropsia e microscopia**

Em animais natural ou experimentalmente infectados, observa-se com frequência esplenomegalia, hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia, pulmões congestos, edematosos e com hemorragias superficiais. Hemorragias petequiais e equimóticas são observadas em pulmões, epicárdio e linfonodos, principalmente nos linfonodos cervicais quando o animal está em estado moribundo. Hipertrofia renal e saco pericárdico com conteúdo gelatinoso e icterico podem eventualmente ser observados. Além de vasos sanguíneos de quase todos os órgãos distendidos e ocluídos por aglomerado de massas de parasitos (FERRIS, 1979; KIER et al., 1987).

Na microscopia, observam-se macrófagos parasitados por *Cytauxzoon felis* aderidos à parede dos vasos sanguíneos, com conseqüente oclusão total ou parcial do lúmen vascular de diversos órgãos. Os órgãos mais acometidos são baço, pulmões e linfonodos, sendo também observados em fígado e medula óssea. No baço, adicionalmente, pode ser observada eritrofagocitose. Não há distinção destes achados entre gatos natural ou experimentalmente infectados (FERRIS, 1979). Wagner et al. (1980) observaram múltiplos trombos



intravasculares em diversos órgãos, provavelmente secundários à ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID), resultando no óbito dos gatos acometidos por embolia vascular cerebral ou trombose cardíaca.

## **2.2.6 Diagnóstico**

### **2.2.6.1. Citologia e histopatologia**

O diagnóstico é frequentemente baseado na detecção direta do protozoário no interior de eritrócitos em esfregaços sanguíneos. A microscopia direta representa um método de diagnóstico fácil, rápido e de baixo custo, entretanto, pouco sensível, dificultando o diagnóstico de infecções subclínicas e inaparentes (RELFORF; DIMARCO, 2006).

Na fase clínica, a parasitemia por *C. felis* é baixa, apresentando geralmente 1% dos eritrócitos infectados, o que associado à baixa sensibilidade da técnica dificulta o diagnóstico (FERRIS, 1979). Esfregaços sanguíneos sequenciais podem aumentar a sensibilidade da técnica, uma vez que a parasitemia aumenta à medida que a doença progride (MEINKOTH; KOCAN, 2005; HOLMAN; SNOWDEN, 2009). A baixa parasitemia dificulta, inclusive, a distinção entre *C. felis* e os parasitas dos gêneros *Babesia* spp. e *Theileria* spp. (HOOVER et al., 1994; MEINKOTH ; KOCAN, 2005). Neste caso, a diferenciação é feita por citologia de punção aspirativa de baço, linfonodos e medula óssea (CRYSTAL, 2006) ou por técnicas de diagnóstico molecular que são altamente sensíveis e específicas, como a PCR para *C. felis* (BIRKENHEUER et al., 2006).

Arelada à baixa sensibilidade e à subjetividade da técnica há a possibilidade de resultados falso-positivos, uma vez que, os parasitos podem ser facilmente confundidos com corpúsculos de Howell-Jolly e de Heinz, bem como com a forma em anel dos hemoplasmas. Por estas razões, Giemsa é o corante de escolha na identificação de *C. felis* em esfregaços sanguíneos (FERRIS, 1979). Macrófagos contendo esquizonte de *C. felis* podem ser observados em esfregaços de sangue periférico em estágio avançado da doença (FERRIS, 1979; MEINKOTH; KOCAN, 2005).

O diagnóstico histopatológico baseia-se na identificação de macrófagos parasitados por esquizonte de *C. felis* em pulmão, baço, linfonodos e fígado (FERRIS, 1979), constituindo uma alternativa de diagnóstico principalmente nos casos de óbito sem definição do agente causal.

### **2.2.6.2 Testes sorológicos**

Testes sorológicos para o diagnóstico de *C. felis* em felinos domésticos e selvagens foram descritos experimentalmente (SHINDEL et al., 1978; UILENBERG et al., 1987; COWELL, et al., 1988), no entanto, estes não estão disponíveis comercialmente. Vale ressaltar que citauxzoonose em gatos apresenta geralmente evolução rápida, com óbito de uma a duas semanas após o início dos sinais clínicos (FERRIS, 1979), portanto, o uso de testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos anti - *C. felis* com fim diagnóstico provavelmente não seria eficaz devido à produção ínfima ou ausente de anticorpos previamente ao óbito. Outro fator a ser considerado é a possibilidade de reação cruzada entre os piroplasmas filogeneticamente relacionados, *Cytauxzoon* spp. e *Babesia* spp., conforme observado por André (2012) Deste modo, até o presente momento não há testes sorológicos disponíveis comercialmente para detecção de anticorpos anti - *Cytauxzoon felis* (FERRIS, 1979; HOLMAN; SNOWDEN, 2009).

Felinos selvagens e domésticos sobreviventes à fase clínica da doença (esquizogonia tecidual) desenvolvem imunidade protetora (MEINKOTH; KOCAN, 2005). Deste modo, com enfoque em estudos epidemiológicos, o desenvolvimento de testes sorológicos seria de grande valia na obtenção de dados referentes à distribuição geográfica e prevalência de *C. felis* em

felinos domésticos e selvagens, principalmente no que concerne aos felinos assintomáticos ou sobreviventes à doença (COWELL et al., 1988). Uilenberg et al. (1987) desenvolveram teste sorológico, por meio de RIFI, a partir de formas de piroplasma de *C. felis* para a detecção de anticorpos anti- *C. felis* em gatos recuperados da doença e nos hospedeiros naturais.

### **2.2.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Os ensaios moleculares (PCR e qPCR) tem sido amplamente utilizados para o diagnóstico de *C. felis* em felinos domésticos e selvagens em laboratórios comerciais e de pesquisa por serem altamente sensíveis e específicos (BIRKENHEUER et al., 2006; HOLMAN; SNOWDEN, 2009). A sensibilidade e especificidade da PCR permite a detecção de pequenas quantidades do parasita na amostra biológica (menos de uma cópia por microlitro), bem como a detecção de diferenças gênicas entre organismos morfologicamente indistinguíveis (BIRKENHEUER et al., 2006). Portanto, constitui importante alternativa de diagnóstico de citauxzoonose clínica, período em que a parasitemia é baixa.

### **2.2.7 Tratamento:**

Elevada taxa de mortalidade é observada na citauxzoonose felina, mesmo naqueles animais submetidos a tratamento (COHN et al., 2011). Protocolos terapêuticos que variam desde associação de antibióticos a drogas antiprotozoários e terapia de suporte com fluidoterapia já foram utilizados, no entanto, em nenhum foram obtidos resultados satisfatórios (FERRIS, 1979; BROWN et al., 2008; COHN et al., 2011). Independente dos medicamentos utilizados, terapia de suporte com fluidoterapia e administração de heparina deve ser instituída, a fim de prevenir a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (HOLMAN; SNOWDEN, 2009).

Uilenberg et al. (1987) observaram recuperação clínica através de tratamento com parvaquone após início de febre em um gato experimentalmente infectado, no entanto, não associaram a recuperação do animal ao uso da droga especificamente. Resolução clínica também foi observada por Brown et al. (2008) no uso de terapia inicial com atropina e dipropionato de imidocarb e antibioterapia com enrofloxacina em gatos naturalmente infectados e com sintomas inespecíficos. No entanto, foi evidenciada parasitemia persistente após resolução clínica (MEINKOTH et al., 2000; BROWN et al., 2008). O prognóstico da doença em gatos é ruim, com a maioria dos relatos fatais (FERRIS, 1979; KIER et al., 1987; BIRKENHEUER et al., 2006).

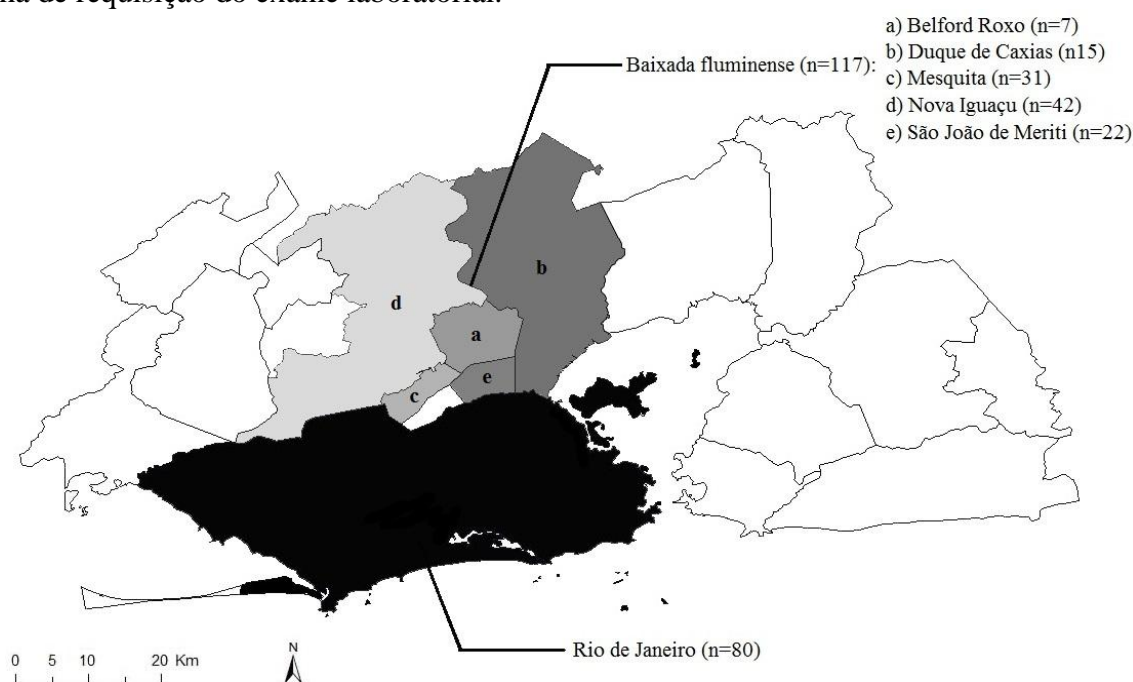
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram obtidas 197 amostras de sangue de gatos, em tubos contendo anticoagulante etilenodiamino tetra-acético (EDTA), provenientes de laboratório comercial prestador de serviço a clínicas veterinárias particulares da Região Metropolitana do estado do Rio de Janeiro (Belford Roxo, Duque de Caxias, Mesquita, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, São João de Meriti) (Figura 1).

Todas as amostras foram colhidas em clínicas veterinárias e no prazo máximo de 24h encaminhadas, em isopor com gelo, ao laboratório comercial para as análises hematológicas. Sendo, posteriormente, transferidas para microtubos estéreis e armazenadas à  $-80^{\circ}\text{C}$  para utilização nas análises de biologia molecular.

Dados relacionados aos animais, como idade, gênero e raça foram obtidos através da ficha de requisição do exame laboratorial.



**Figura 1.** Municípios da Região Metropolitana do Rio de Janeiro dos quais foram obtidas as amostras de sangue de felinos domésticos.

#### 3.2 Análises Hematológicas

As análises hematológicas foram realizadas por meio do contador hematológico automático de células (Poch 100iV/Roche), segundo recomendações do fabricante e com auxílio de microscópio óptico comum (Modelo Primo Star/ Carl Zeiss). Os parâmetros hematológicos determinados foram: contagem global de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ), leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ) e plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ ), determinação de hemoglobina (g/dL), volume globular (%), CHCM (%), VCM (fL). Morfologia eritrocitária e leucometria específica (percentual de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) foram avaliadas em esfregaços sanguíneos corados pelo método Panótico Rápido com auxílio de microscópio óptico, objetiva de imersão 1000x (JAIN, 1993). A pesquisa dos agentes eritrocíticos consistiu na detecção de formas evolutivas dos parasitas por leitura de aproximadamente 100 campos do esfregaço sanguíneo com auxílio de microscópio óptico (1000x).

A concentração de proteínas totais foi determinada pela técnica de refratometria. Entretanto, este parâmetro não pode ser obtido para algumas amostras devido à metodologia adotada pelo laboratório comercial.

### **3.3 Extração de DNA de sangue total**

Uma amostra de 200 µL de sangue total foi submetida ao processo de extração de DNA total utilizando o Kit Relia Prep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para monitoramento de DNA contaminante durante o processo de extração de DNA total foi utilizado como controle negativo 200µL de água ultra-pura esterilizada (Invitrogen®) em cada bateria de amostras processadas. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

### **3.4 Detecção Molecular de hemoplasmas**

#### **3.4.1 PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp.**

As amostras de DNA dos gatos foram submetidas inicialmente à PCR em tempo real baseada no gene que codifica o 16S RNA ribossomal (16S rRNA), cujos fragmentos de 170pb e 190pb amplificados correspondem as espécies *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, respectivamente. Para esta análise, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores Forward 5’-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3’ e Reverse 5’-ACGCCAATAAATCCGRATAAT-3’, descritos por Kewish et al. (2004).

As reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes especificações: volume final de 12µL, contendo uma mistura de 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix, 0,625µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3µL (±30ng/µL) de DNA teste ou controle. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por com 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, uma curva de dissociação foi obtida para verificar a especificidade da amplificação. Foram consideradas positivas amostras com limiar de detecção (CT) de até 40 ciclos, cujo produto amplificado apresentou a mesma temperatura de dissociação dos controles positivos.

Posteriormente, as amostras positivas foram submetidas à reação com par de oligonucleotídeos iniciadores mais específicos para cada espécie baseados no gene 16S rRNA, conforme descrito abaixo nos itens 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.4.

#### **3.4.2 Reação de amplificação específica para *Mycoplasma haemofelis***

As amostras foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmento de 393pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores Hfelis-fl 5’-GACT TTGGTTTCGGCCAAGG-3’ e Hfelis-r3 5’-CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC-3’, descritos por Berent et al. (1998).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Mastercycler® pro (Eppendorf) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos com 40 ciclos compostos por

desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final de 72°C por 7 minutos.

### 3.4.3 Reação de amplificação específica para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'

As amostras foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmento de 192pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores Cali-F1 5'- GCATAATGTGTCGCAATC -3' e Cali-R1 5'- GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC -3', descritos por Andrea Santos (Referência pessoal).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Mastercycler® pro (Eppendorf) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos com 38 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por extensão final de 72°C por 7 minutos.

### 3.4.4 Reação de amplificação específica para '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'

As amostras foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmento de 488pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores Mt-Fw 5'- GTATCCTCCATCAGACAGAA -3' e Mt2-Rv 5'- CGCTCCATATTTAATTCCAA -3', descritos por Santos et al. (2009).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Mastercycler® pro (Eppendorf) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos com 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por extensão final de 72°C por 5 minutos.

### 3.4.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, a 80V durante 90 minutos e corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 15 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de acordo com o tamanho do produto esperado (100pb/1Kb DNA Ladder, Invitrogen®). Os resultados foram visualizados e analisados através do transiluminador de luz ultravioleta L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia), no qual as bandas observadas nas amostras foram comparadas ao peso molecular para confirmação da amplificação do fragmento esperado.

### 3.5 Detecção Molecular de *Cytauxzoon felis*

As amostras de DNA total foram submetidas às reações da PCR para a detecção de *Cytauxzoon felis* baseada na sequência parcial do gene 18S do RNA ribossomal, com amplificação de fragmento de 284pb. Para esta análise, utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores CyF 5'-GCGAATCGCATTGCTTTATGCT-3' e CyR 5'- CCAATTGATACTCCGGAAAGAG-3', descritos por Birkenheuer et al. (2006).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Mastercycler® pro (Eppendorf) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP),

0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25U de Taq polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos com 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% conforme descrito no item 3.4.5.

### **3.6 Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares**

Os controles positivos utilizados em todos os ensaios moleculares (*Cytauxzoon felis* e micoplasmas hemotróficos) foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Rosângela Zacarias Machado (UNESP/Jaboticabal). Água ultrapura livre de DNase e RNase (UltraPure™, Invitrogen) foi utilizada como controle negativo das reações.

### **3.7 Análise Estatística**

A infecção por *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e *Cytauxzoon felis* foram associados com as variáveis gênero, raça, idade e sazonalidade por meio do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância.

Os diferentes métodos diagnósticos foram avaliados estatisticamente, quanto ao grau de concordância, através do teste Kappa.

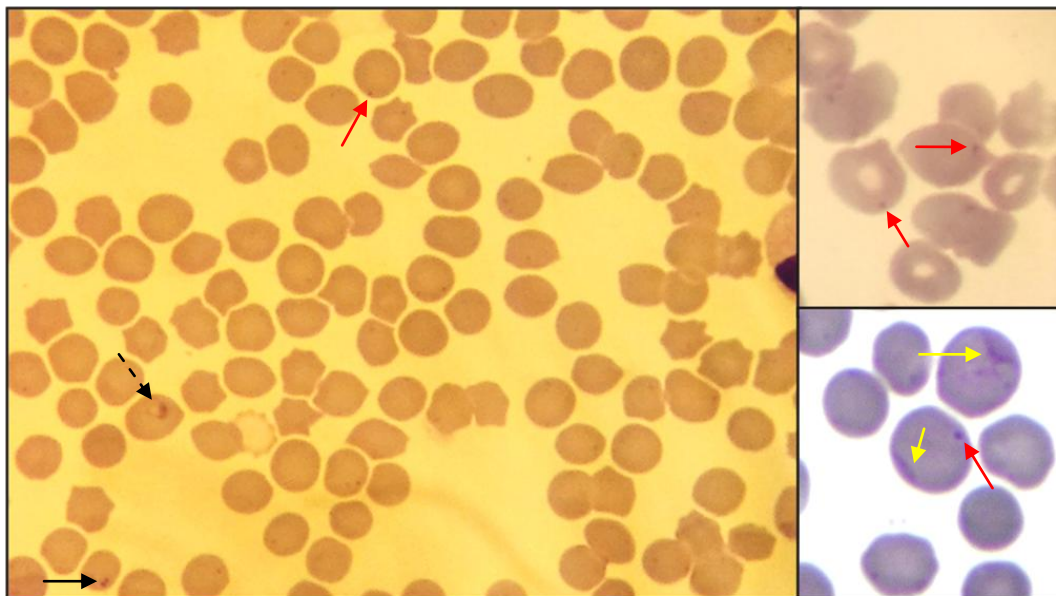
Os parâmetros hematológicos foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors. Quando os dados apresentaram distribuição normal, foram avaliados por análise de variância (ANOVA) em nível de significância de 5%. Em contrapartida, quando a distribuição dos dados não foi normal, foi aplicado o teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5%. A frequência das alterações hematológicas no grupo de gatos infectados e não infectados foi comparada através do teste exato de Fisher ou Qui-quadrado em nível de 5% de significância.

Para a realização de todos os testes estatísticos acima mencionados foi utilizado o programa de análise estatística Bioestat 4.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Pesquisa direta de hemoplasma em esfregaço sanguíneo

Na pesquisa direta de hemoparasitos, foi analisado um total de 197 esfregaços sanguíneos, dos quais 11,2% (22/197) apresentaram estruturas epieritrocíticas sugestivas de infecção por hemoplasmas (Figura 2).

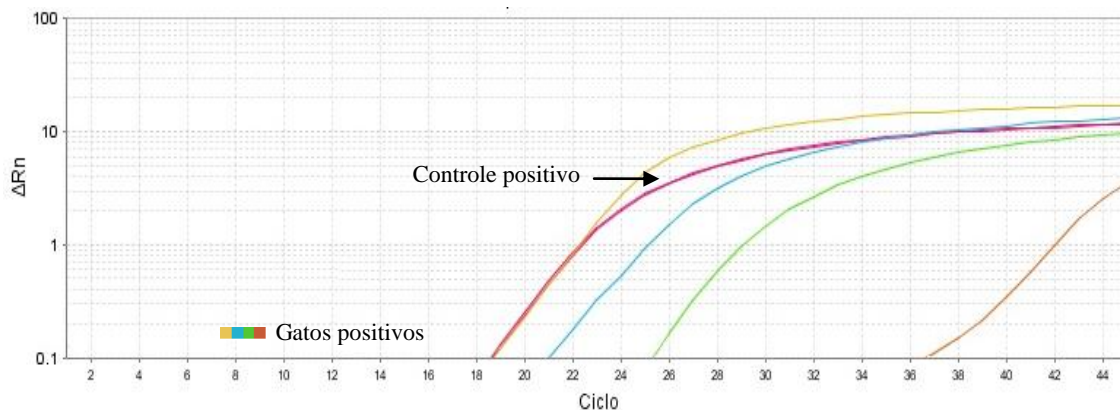


**Figura 2.** Esfregaço de sangue apresentando estruturas epieritrocíticas sugestivas de hemoplasmas em cocos únicos (setas vermelhas), em pares (seta preta contínua) e em cadeia (setas amarelas). Notar, adicionalmente, forma de piroplasma no interior de hemácias (seta preta pontilhada). (Corante Panótipo Rápido, 1000x).

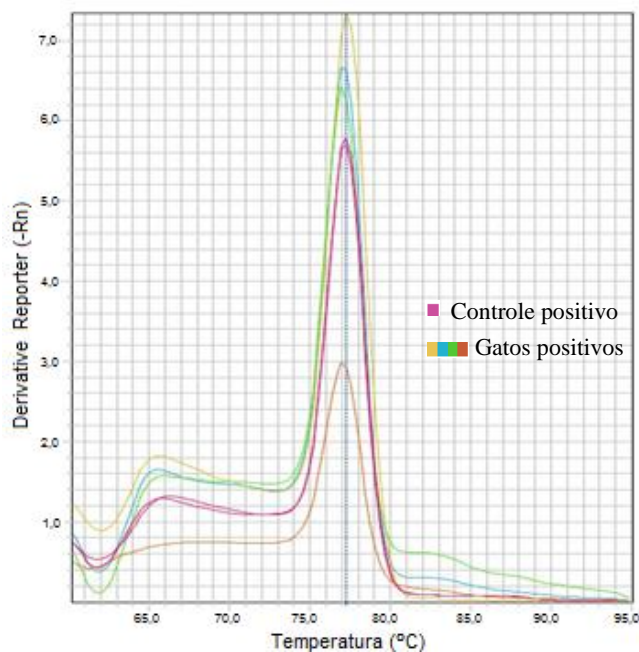
### 4.2 Diagnóstico molecular de hemoplasmas baseado no gene 16S rRNA

A ocorrência total de hemoplasmas foi obtida por meio da PCR em tempo real para o gênero *Mycoplasma*. Na análise dos resultados obtidos, 22,8% (45/197) dos gatos amostrados apresentaram amplificação do fragmento do gene 16S rRNA (Figura 3), sendo, portanto, considerados positivos. O valor médio de CT observado nas amostras positivas foi de 30,6 ciclos com variação entre 12 e 39 ciclos. A temperatura de dissociação ( $T_m$ ) dos produtos amplificados foi semelhante a do controle positivo, indicando a especificidade da reação (Figura 4).





**Figura 3.** Curva de amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. obtidos pela PCR em tempo real (Sistema SYBRGreen). As linhas em cor de rosa indicam o controle positivo e as demais linhas, as amostras positivas.



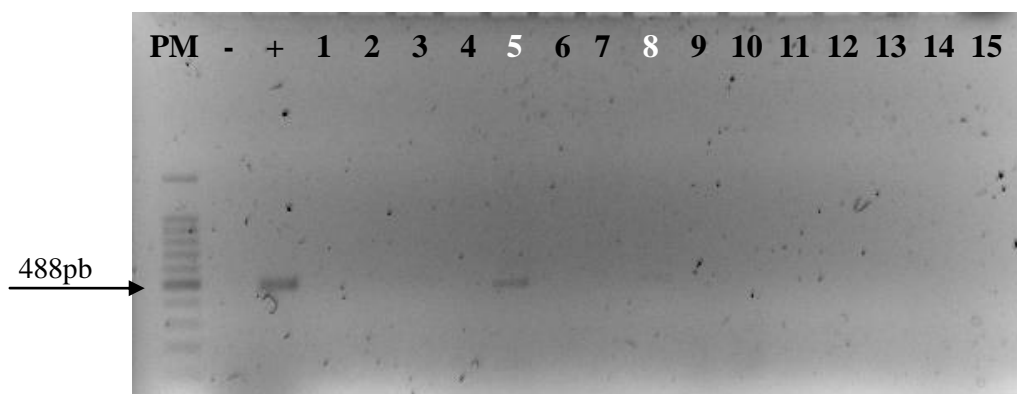
**Figura 4.** Curva de dissociação do fragmento do gene 16S rRNA do controle positivo e das amostras positivas demonstrando a especificidade de amplificação de *Mycoplasma* spp. na PCR em tempo real.

As amostras positivas para *Mycoplasma* spp. na PCR em tempo real foram submetidas à PCR convencional para determinação das espécies infectantes. A frequência de positividade observada foi de 4,6% (9/197) para *Mycoplasma haemofelis* (Figura 5), 4,6% (9/197) para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (Figura 6) e 11,7% (23/197) para ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (Figura 7), sendo esta última, portanto, a espécie de maior ocorrência dentro da população estudada. Foram observadas, adicionalmente, coinfeções entre ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. turicensis*’ e *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’, assim como coinfeção pelas três espécies em um animal, conforme representado na Tabela 1.

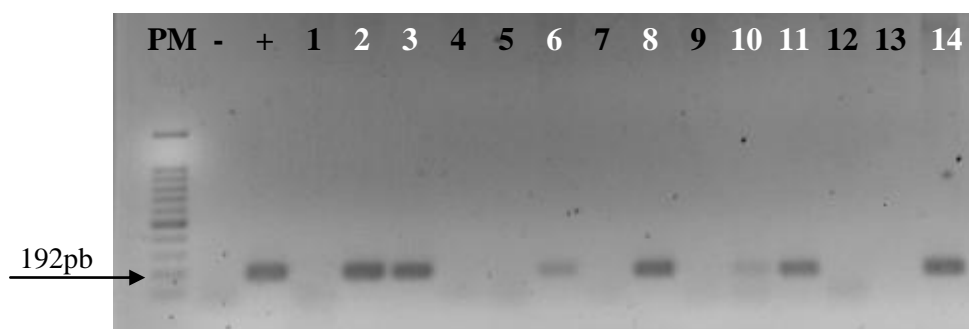




**Figura 5.** Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 393 pares de base do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemofelis*, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1-11: Gatos negativos; Canaleta 13: Gato positivo.



**Figura 6.** Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 488 pares de base do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1-4,6-7,9-15: Gatos negativos; Canaletas 5, 8: Gatos positivos.



**Figura 7.** Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 192 pares de base do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1,4-5,7,9,12-13: Gatos negativos; Canaletas 2-3,6,8,9,10-11,14: Gatos positivos.

**Tabela 1:** Número e percentual de gatos positivos para hemoplasmas nos ensaios moleculares (qPCR e PCR)

<b>Resultado PCR/qPCR (n=197)</b>	<b>Gatos positivos</b>	<b>%</b>
<i>Mycoplasma</i> spp.	45	22,8
<i>Mycoplasma haemofelis</i> (Mhf)	9	4,6
' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' (CMhm)	23	11,7
' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ' (CMt)	9	4,6
Mhf + CMhm	2	1,0
Mhf + CMt	1	0,5
CMhm + CMt	1	0,5
Mhf + CMhm + CMt	1	0,5

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; qPCR: PCR em Tempo Real

#### **4.3 Distribuição de hemoplasmas na Baixada Fluminense e município do Rio de Janeiro**

Foram incluídas no estudo, 197 amostras de gatos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, sendo 80 destas provenientes da cidade do Rio de Janeiro e as outras 117 distribuídas entre municípios da Baixada Fluminense, a seguir: Belford Roxo: 7, Duque de Caxias: 15; Mesquita: 31; Nova Iguaçu: 42 e São João de Meriti: 22.

A frequência de infecção por bactérias do gênero *Mycoplasma* na população felina estudada, não diferiu estatisticamente entre os animais provenientes dos municípios da Baixada Fluminense (23,9%) e Rio de Janeiro (21,3%). A distribuição dos gatos positivos foi de 40% (6/15) para o município de Duque de Caxias, seguido por 27,3% (6/22) em São João de Meriti, 22,6% (7/31) em Mesquita, 21,3% (17/80) no Rio de Janeiro, 19,1% (8/42) em Nova Iguaçu e 14,3% (1/7) em Belford Roxo.

Na análise da distribuição das espécies infectantes por região, apesar de não haver diferença estatística, constatou-se maior distribuição de gatos positivos para as espécies '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' no município do Rio de Janeiro quando comparada à Baixada Fluminense. Por outro lado, a frequência de infecção para *Mycoplasma haemofelis* foi maior na Baixada Fluminense (6,8%), cujos gatos tiveram cinco vezes mais chance de se infectar por esta espécie de hemoplasma quando comparados aos gatos do Rio de Janeiro (1,3%), conforme discriminado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Ocorrência geral de hemoplasmas e das espécies *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' nos municípios da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Região Metropolitana/ Município	Positivo	Negativo	N	%	p-valor
<b><i>Mycoplasma</i> spp.</b>					
Rio de Janeiro	17	63	80	21,3 <sup>a</sup>	0,789
Baixada Fluminense	28	89	117	23,9 <sup>a</sup>	
Belford Roxo	1	6	7	14,3	
Duque de Caxias	6	9	15	40,0	
Mesquita	7	24	31	22,6	
Nova Iguaçu	8	34	42	19,1	
São João de Meriti	6	16	22	27,3	
<b><i>M. haemofelis</i></b>					
Rio de Janeiro	1	79	80	1,3 <sup>a</sup>	0,08
Baixada Fluminense	8	109	117	6,8 <sup>a</sup>	
Belford Roxo	1	6	7	14,3	
Duque de Caxias	3	12	15	20,0	
Mesquita	0	31	31	0,0	
Nova Iguaçu	3	39	42	7,1	
São João de Meriti	1	21	22	4,6	
<b>'<i>Candidatus M. haemominutum</i>'</b>					
Rio de Janeiro	12	68	80	15,0 <sup>a</sup>	0,329
Baixada Fluminense	11	106	117	9,4 <sup>a</sup>	
Belford Roxo	0	7	7	0,0	
Duque de Caxias	2	13	15	13,3	
Mesquita	3	28	31	9,7	
Nova Iguaçu	3	39	42	7,1	
São João de Meriti	3	19	22	13,6	
<b>'<i>Candidatus M. turicensis</i>'</b>					
Rio de Janeiro	4	76	80	5,0 <sup>a</sup>	0,999
Baixada Fluminense	5	112	117	4,3 <sup>a</sup>	
Belford Roxo	0	7	7	0,0	
Duque de Caxias	1	14	15	6,7	
Mesquita	1	30	31	3,2	
Nova Iguaçu	1	41	42	2,4	
São João de Meriti	1	21	22	4,5	

<sup>a</sup>Valores seguidos por letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; N: Número total de gatos.

#### 4.4 Estudo comparativo entre as técnicas de diagnóstico

Na comparação entre as técnicas de diagnóstico de hemoplasmas, apenas sete animais mostraram-se positivos simultaneamente por qPCR e citologia de esfregaço sanguíneo, o que corresponde à 15,6% do total de animais positivos pelo ensaio molecular. O grau de concordância obtido pelo teste estatístico Kappa foi de 0,07, o que corresponde à pobre concordância entre as técnicas de diagnóstico molecular (qPCR) e citologia de esfregaço sanguíneo (Tabela 3).

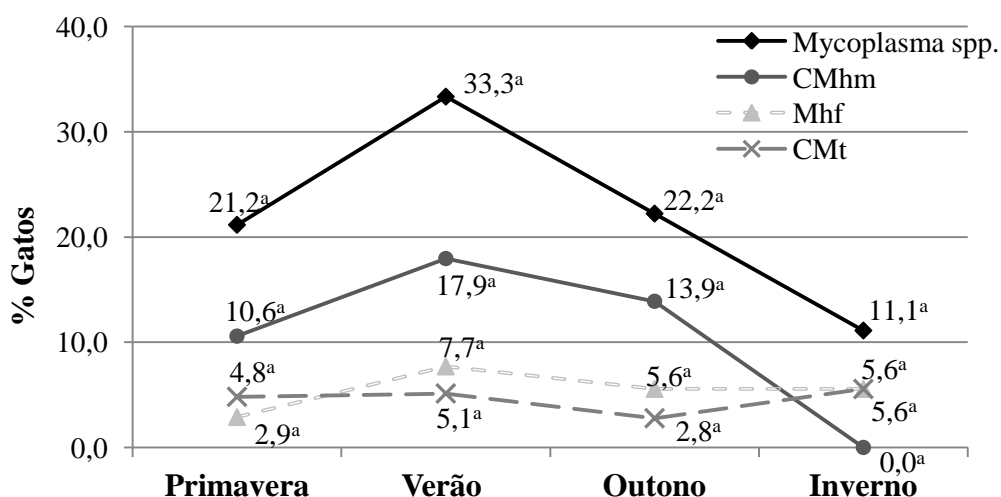
**Tabela 3:** Comparação entre as técnicas qPCR e citologia de esfregaço sanguíneo para o diagnóstico de *Mycoplasma* spp. em gatos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Diagnóstico <i>Mycoplasma</i> spp.	Citologia +	Citologia -	Total
	n (%)	n (%)	
qPCR +	7 (15,6)	38 (84,4)	45
qPCR -	15 (9,9)	137 (90,1)	152
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>175</b>	<b>197</b>

qPCR: PCR em tempo real; n: Número de gatos; +: Positivo; -: Negativo

#### 4.5 Distribuição da frequência de infecção por hemoplasmas nas estações do ano

Na população de gatos estudada, pode-se evidenciar uma flutuação na frequência de gatos positivos para o gênero *Mycoplasma*, com distribuição heterogênea nas distintas estações do ano. Houve maior ocorrência de infecção durante o verão (33,3%), embora este dado não tenha sido estatisticamente significativo quando comparado às demais estações do ano. Extrapolando esta análise para a distribuição das espécies infectantes ao longo do ano, constatou-se que os picos de infecção também foram maiores nos meses correspondentes ao verão para *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, 7,7% e 17,9%, respectivamente. Contraditoriamente, a pico de infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ foi maior no inverno (5,6%), no entanto, vale ressaltar que estes achados não diferiram estatisticamente (Figura 8).



**Figura 8:** Ocorrência de hemoplasmas e suas respectivas espécies durante as estações do ano na Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

<sup>a</sup>Valores seguidos por letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%. Mhf: *Mycoplasma haemofelis*; CMhm: ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’; CMt: ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’.

## 4.6. Associação entre os parâmetros hematológicos e infecção por hemoplasmas

### 4.6.1 *Mycoplasma* spp.

No presente estudo, não foi verificada associação estatística entre infecção por *Mycoplasma* spp. e a média dos parâmetros hematológicos ( $p > 0,05$ ) na análise do eritrograma, leucograma e complementos, conforme discriminado nas tabelas 4 e 5. É digno de nota que, apesar de não haver diferença significativa, a média de monócitos dos gatos positivos foi superior a dos gatos negativos e acima do valor de referência para a espécie.

**Tabela 4:** Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp., pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	Positivo	45	6,8 <sup>a</sup>	2,4	0,4	1,9	10,2	0,816	5,0-10,0
	Negativo	152	6,9 <sup>a</sup>	2,3	0,2	1,3	11,2		
Hematócrito (%)	Positivo	45	33,0 <sup>a</sup>	10,3	1,5	9,0	46,0	0,949	24-45
	Negativo	152	33,6 <sup>a</sup>	10,7	0,9	7,0	57,0		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	45	10,7 <sup>a</sup>	3,4	0,5	2,9	16,0	0,712	8,0-15,0
	Negativo	152	11,0 <sup>a</sup>	3,5	0,3	2,3	19,0		
VGM (fL)	Positivo	45	50,3 <sup>a</sup>	7,7	1,2	41,0	89,0	0,798	39-55
	Negativo	152	48,9 <sup>a</sup>	3,8	0,3	39,0	62,0		
CHGM (%)	Positivo	45	32,5 <sup>a</sup>	1,7	0,3	27,0	35,0	0,470	31-35
	Negativo	152	32,9 <sup>a</sup>	1,3	0,1	30,0	35,0		
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Positivo	45	397 <sup>a</sup>	385	57	30	1,662	0,438	300-900
	Negativo	152	392 <sup>a</sup>	289	23	15	1,209		
PPT (g/dl)	Positivo	40	7,5 <sup>a</sup>	0,9	0,1	4,0	9,2	0,913	6-7,5**
	Negativo	142	7,5 <sup>a</sup>	1,2	0,1	4,6	11,0		

<sup>a</sup> Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ). VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

\*\* Valor de referência segundo Krimer (2011)

**Tabela 5:** Análise descritiva do leucograma dos gatos positivos e negativos na PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp., pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Leucócitos totais (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	17,83 <sup>a</sup>	12,06	1,80	3,90	73,9	0,508	5,5-19,5
	Negativo	152	19,21 <sup>a</sup>	12,70	1,03	1,50	100,0		
Metamielócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	0,009 <sup>a</sup>	0,06	0,009	0,00	0,41	0,927	0-0
	Negativo	152	0,004 <sup>a</sup>	0,04	0,003	0,00	0,46		
Bastões (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	0,75 <sup>a</sup>	1,08	0,16	0,00	4,43	0,910	0-0,3
	Negativo	152	0,64 <sup>a</sup>	0,91	0,74	0,00	6,50		
Segmentados (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	10,99 <sup>a</sup>	8,60	1,28	2,62	54,69	0,236	2,5-12,5
	Negativo	152	12,28 <sup>a</sup>	7,97	0,65	0,57	44,48		
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	4,15 <sup>a</sup>	3,25	0,48	0,39	16,29	0,827	1,5-7,0
	Negativo	152	4,63 <sup>a</sup>	8,07	0,65	0,45	96,00		
Monócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	1,00 <sup>a</sup>	1,21	0,18	0,00	7,96	0,813	0- 0,85
	Negativo	152	0,84 <sup>a</sup>	0,61	0,05	0,00	3,87		
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	0,91 <sup>a</sup>	1,69	0,25	0,00	9,42	0,951	0-1,5
	Negativo	152	0,80 <sup>a</sup>	1,12	0,09	0,00	8,10		
Basófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	45	0,004 <sup>a</sup>	0,02	0,004	0,00	0,16	0,962	Raros
	Negativo	152	0,020 <sup>a</sup>	0,12	0,010	0,00	1,43		

<sup>a</sup>Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

Na análise por frequência das alterações hematológicas dentro dos grupos positivo e negativo, pode ser observado que a ocorrência geral de hemoplasma na população felina foi associada ao índice hematimétrico CHGM diminuído quando comparados aos gatos negativos (p<0,04). Observou-se, adicionalmente, tendência à associação desta infecção com VGM aumentado (p<0,08). Tendo em vista que os parâmetros referentes à determinação de anemia não foram associados à infecção por este agente, a avaliação dos índices hematimétricos por si só não é de grande valia. As demais alterações hematológicas não foram associadas estatisticamente à infecção por *Mycoplasma* spp., a seguir: anemia, trombocitopenia, trombocitose, hiperproteinemia, leucocitose, leucopenia, neutropenia, neutrofilia, discreto DNNE, linfopenia, linfocitose, monocitose, eosinofilia e presença de monócitos ativados à macrófagos (Tabela 6).

**Tabela 6:** Alterações hematológicas associadas à infecção natural por *Mycoplasma* spp. em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		qPCR <i>Mycoplasma</i> spp. n(%)		p-valor
		Positivos (n=45)	Negativos (n=152)	
<b>Anemia (He, Ht, Hg)</b>	Sim	9 (20,0) <sup>a</sup>	28 (18,4) <sup>a</sup>	0,9833
	Não	36 (80,0)	124 (81,6)	
<b>VGM aumentado</b>	Sim	3 (6,7) <sup>a</sup>	2 (1,3) <sup>a</sup>	0,0795
	Não	42 (93,3)	150 (98,7)	
<b>CHGM diminuído</b>	Sim	3 (6,7) <sup>a</sup>	1 (0,7) <sup>b</sup>	<b>0,0379</b>
	Não	42 (93,3)	151 (99,3)	
<b>Trombocitopenia</b>	Sim	26 (57,8) <sup>a</sup>	77 (50,7) <sup>a</sup>	0,5028
	Não	19 (42,2)	75 (49,3)	
<b>Trombocitose</b>	Sim	5 (11,1) <sup>a</sup>	11 (7,2) <sup>a</sup>	0,2730
	Não	40 (88,9)	142 (92,8)	
<b>Hiperproteinemia*</b>	Sim	17 (42,5) <sup>a</sup>	69 (48,6) <sup>a</sup>	0,6154
	Não	23 (57,5)	73 (51,4)	
<b>Leucopenia</b>	Sim	4 (8,9) <sup>a</sup>	6 (3,9) <sup>a</sup>	0,2405
	Não	41 (91,1)	146 (96,1)	
<b>Leucocitose</b>	Sim	17 (37,8) <sup>a</sup>	57 (37,5) <sup>a</sup>	0,8875
	Não	28 (62,2)	95 (62,5)	
<b>Neutropenia</b>	Sim	0 (0) <sup>a</sup>	4 (2,6) <sup>a</sup>	0,5757
	Não	45 (100)	148 (97,4)	
<b>Neutrofilia</b>	Sim	13 (28,9) <sup>a</sup>	55 (36,2) <sup>a</sup>	0,4680
	Não	32 (71,1)	97 (63,8)	
<b>Discreto DNNE</b>	Sim	25 (55,6) <sup>a</sup>	83 (54,6) <sup>a</sup>	0,9538
	Não	20 (44,4)	69 (45,4)	
<b>Linfopenia</b>	Sim	6 (13,3) <sup>a</sup>	30 (19,7) <sup>a</sup>	0,4492
	Não	39 (86,7)	122 (80,3)	
<b>Linfocitose</b>	Sim	6 (13,3) <sup>a</sup>	20 (13,2) <sup>a</sup>	0,8257
	Não	39 (86,7)	132 (86,8)	
<b>Monocitose</b>	Sim	21 (46,7) <sup>a</sup>	63 (41,4) <sup>a</sup>	0,6525
	Não	24 (53,3)	89 (58,6)	
<b>Eosinofilia</b>	Sim	8 (17,8) <sup>a</sup>	21 (13,8) <sup>a</sup>	0,6749
	Não	37 (82,2)	131 (86,2)	
<b>MAM</b>	Sim	12 (26,7) <sup>a</sup>	33 (21,7) <sup>a</sup>	0,6217
	Não	33 (73,3)	119 (78,3)	

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; N:Número de gatos; He:Hemácias; Ht:Hematócrito; Hg:Hemoglobina; VGM:Volume globular médio; CHGM:Concentração de hemoglobina globular média; DNNE: Desvio nuclear neutrofílico à esquerda; MAM: Monócitos ativados à macrófagos; \*Grupos positivos e negativos com 40 e 142 gatos amostrados, respectivamente.

#### 4.6.2 *Mycoplasma haemofelis*

Na avaliação das médias dos parâmetros hematológicos frente à infecção por *Mycoplasma haemofelis*, algumas alterações foram observadas no eritrograma, leucograma e complemento. Gatos naturalmente infectados por *M. haemofelis* apresentaram-se anêmicos, condição esta estabelecida por valores de hemácias ( $p < 0,01$ ), hematócrito ( $p = 0,017$ ) e/ou hemoglobina ( $p = 0,004$ ) abaixo do padrão de referência para a espécie e estatisticamente significativos quando comparados aos gatos negativos. Por meio da análise dos índices hematimétricos VGM e CHGM, pode-se evidenciar que os gatos positivos manifestaram anemia do tipo normocítica hipocrômica predominantemente, sendo o índice CHGM associado estatisticamente à infecção ( $p = 0,002$ ). No entanto, o índice VGM aumentado apresentou tendência de associação à infecção ( $p = 0,08$ ), o qual conferiria anemia do tipo macrocítica. Outros parâmetros associados à infecção por este agente foram trombocitopenia ( $p = 0,038$ ) e linfocitose ( $p = 0,029$ ). Vale ressaltar que, apesar de não haver diferença significativa, a média de monócitos dos gatos positivos foi superior à dos gatos negativos e acima do valor de referência para a espécie (Tabelas 7 e 8).

**Tabela 7:** Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR para *Mycoplasma haemofelis*, pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	Positivo	9	4,4 <sup>a</sup>	2,7	0,9	1,9	9,2	< 0,01	5,0-10,0
	Negativo	188	7,1 <sup>b</sup>	2,2	0,2	1,3	11,2		
Hematócrito (%)	Positivo	9	23,5 <sup>a</sup>	12,0	4,0	9,0	39,7	0,017	24-45
	Negativo	188	33,9 <sup>b</sup>	10,3	0,7	7,0	57,0		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	9	7,2 <sup>a</sup>	3,7	1,2	2,9	12,7	0,004	8,0-15,0
	Negativo	188	11,2 <sup>b</sup>	3,3	0,2	2,3	19,0		
VGM (fL)	Positivo	9	57,1 <sup>a</sup>	14,4	4,8	43,3	89,0	0,080	39-55
	Negativo	188	48,9 <sup>a</sup>	3,7	0,3	39,0	62,0		
CHGM (%)	Positivo	9	30,7 <sup>a</sup>	2,1	0,7	27,0	33,0	0,002	31-35
	Negativo	188	32,9 <sup>b</sup>	1,3	0,1	30,0	35,0		
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Positivo	9	286 <sup>a</sup>	427	142	46	1,400	0,038	300-900
	Negativo	188	399 <sup>b</sup>	306	22	15	1,662		
PPT (g/dl)	Positivo	8	6,9 <sup>a</sup>	1,2	0,4	4,0	8,0	0,192	6-7,5**
	Negativo	174	7,6 <sup>a</sup>	1,1	0,1	4,6	11,0		

<sup>a</sup> Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney ou Análise de Variância, em nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ). VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

\*\* Valor de referência segundo Krimer (2011)



**Tabela 8:** Análise descritiva do leucograma dos gatos positivos e negativos na PCR para *Mycoplasma haemofelis*, pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Leucócitos totais (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	21,81 <sup>a</sup>	10,66	3,55	10,2	40,3	0,267	5,5-19,5
	Negativo	188	18,75 <sup>a</sup>	12,63	0,92	1,50	100,0		
Metamielócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	0,000 <sup>a</sup>	0,00	0,000	0,00	0,00	0,936	0-0
	Negativo	188	0,005 <sup>a</sup>	0,05	0,003	0,00	0,46		
Bastões (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	1,09 <sup>a</sup>	1,21	0,40	0,00	4,03	0,092	0-0,3
	Negativo	188	0,64 <sup>a</sup>	0,93	0,07	0,00	6,50		
Segmentados (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	10,59 <sup>a</sup>	5,87	1,96	4,05	20,55	0,711	2,5-12,5
	Negativo	188	12,05 <sup>a</sup>	8,21	0,60	0,57	54,69		
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	7,21 <sup>a</sup>	5,05	1,68	1,63	16,29	<b>0,029</b>	1,5-7,0
	Negativo	188	4,39 <sup>b</sup>	7,32	0,53	0,39	96,00		
Monócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	1,73 <sup>a</sup>	2,38	0,79	0,42	7,96	0,132	0- 0,85
	Negativo	188	0,84 <sup>a</sup>	0,61	0,04	0,00	3,87		
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	1,19 <sup>a</sup>	2,06	0,69	0,00	6,43	0,988	0-1,5
	Negativo	188	0,81 <sup>a</sup>	1,22	0,09	0,00	9,42		
Basófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	0,00 <sup>a</sup>	0,00	0,000	0,00	0,00	0,893	Raros
	Negativo	188	0,01 <sup>a</sup>	0,11	0,008	0,00	1,43		

<sup>a</sup> Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

As alterações hematológicas estatisticamente associadas à infecção por *Mycoplasma haemofelis* na análise por frequência foram anemia (p=0,0017), com predomínio de anemia do tipo macrocítica hipocrômica entre os animais positivos, constatada pelos índices hematimétricos VGM aumentado (p=0,0006) e CHGM diminuído (p=0,0003). Linfocitose (p=0,0220) e trombocitopenia (p=0,0365) m também associadas à infecção pelo agente, bem como a presença de monócitos ativados a macrófagos (p=0,0306), muito embora não tenha sido observada associação estatística da alteração monocitose à infecção. As demais alterações hematológicas analisadas não foram associadas à infecção por *M. haemofelis*, sendo estas trombocitose, hiperproteinemia, leucocitose, leucopenia, neutropenia, neutrofilia, discreto DNNE, linfopenia, monocitose e eosinofilia (Tabela 9).

**Tabela 9:** Alterações hematológicas associadas à infecção natural por *Mycoplasma haemofelis* em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		PCR <i>Mycoplasma haemofelis</i> n(%)		p-valor
		Positivos (n=9)	Negativos (n=188)	
<b>Anemia (He, Ht, Hg)</b>	Sim	6 (66,7) <sup>a</sup>	31 (16,5) <sup>b</sup>	<b>0,0017</b>
	Não	3 (33,3)	157 (83,5)	
<b>VGM aumentado</b>	Sim	3 (33,3) <sup>a</sup>	2 (1,0) <sup>b</sup>	<b>0,0006</b>
	Não	6 (66,7)	186 (99,0)	
<b>CHGM diminuído</b>	Sim	3 (33,3) <sup>a</sup>	1 (0,5) <sup>b</sup>	<b>0,0003</b>
	Não	6 (66,7)	187 (99,5)	
<b>Trombocitopenia</b>	Sim	8 (88,9) <sup>a</sup>	95 (50,5) <sup>b</sup>	<b>0,0365</b>
	Não	1 (11,1)	93 (49,5)	
<b>Trombocitose</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	15 (8,0) <sup>a</sup>	0,9725
	Não	8 (88,9)	173 (92,0)	
<b>Hiperproteinemia*</b>	Sim	1 (12,5) <sup>a</sup>	85 (48,9) <sup>a</sup>	0,0676
	Não	7 (87,5)	89 (51,1)	
<b>Leucopenia</b>	Sim	0 (0,0) <sup>a</sup>	10 (5,3) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	9 (100,0)	178 (94,7)	
<b>Leucocitose</b>	Sim	5 (55,6) <sup>a</sup>	69 (36,7) <sup>a</sup>	0,3000
	Não	4 (62,2)	119 (63,3)	
<b>Neutropenia</b>	Sim	0 (0,0) <sup>a</sup>	4 (2,1) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	9 (100,0)	184 (97,9)	
<b>Neutrofilia</b>	Sim	3 (33,3) <sup>a</sup>	65 (34,6) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	6 (66,7)	123 (65,4)	
<b>Discreto DNNE</b>	Sim	7 (77,8) <sup>a</sup>	101 (53,7) <sup>a</sup>	0,1882
	Não	2 (22,2)	87 (46,3)	
<b>Linfopenia</b>	Sim	0 (0,0) <sup>a</sup>	35 (18,6) <sup>a</sup>	0,2198
	Não	9 (100)	153 (81,4)	
<b>Linfocitose</b>	Sim	4 (44,4) <sup>a</sup>	23 (12,2) <sup>b</sup>	<b>0,0220</b>
	Não	5 (55,6)	165 (87,8)	
<b>Monocitose</b>	Sim	5 (55,6) <sup>a</sup>	79 (42,0) <sup>a</sup>	0,5000
	Não	4 (44,4)	109 (58,0)	
<b>Eosinofilia</b>	Sim	2 (22,2) <sup>a</sup>	27 (14,4) <sup>a</sup>	0,6192
	Não	7 (77,8)	161 (85,6)	
<b>MAM</b>	Sim	5 (55,6) <sup>a</sup>	40 (21,3) <sup>a</sup>	<b>0,0306</b>
	Não	4 (44,4)	148 (78,7)	

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; N: Número de gatos; He: Hemácias; Ht: Hematócrito; Hg: Hemoglobina; VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; DNNE: Desvio nuclear neutrofílico à esquerda; MAM: Monócitos ativados à macrófagos; \*Grupos positivos e negativos com 40 e 142 gatos amostrados, respectivamente.

#### 4.6.3 ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’

A frequência do hemoplasma ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e os parâmetros hematológicos médios (eritrograma, leucograma e complementos) não apresentaram qualquer correlação estatística ( $p>0,05$ ). No entanto, vale ressaltar que, a média do parâmetro proteína plasmática total dos gatos positivos foi superior àquela observada nos gatos negativos e acima do padrão de referência para a espécie, apesar de não haver diferença estatística (Tabelas 10 e 11).

**Tabela 10:** Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR para ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	Positivo	23	6,7 <sup>a</sup>	2,2	0,5	1,9	10,2	0,669	5,0-10,0
	Negativo	174	6,9 <sup>a</sup>	2,3	0,2	1,3	11,2		
Hematócrito (%)	Positivo	23	33,6 <sup>a</sup>	9,9	2,1	9,0	46,0	0,825	24-45
	Negativo	174	33,5 <sup>a</sup>	10,7	0,8	7,0	57,0		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	23	10,9 <sup>a</sup>	3,3	0,7	2,9	15,2	0,981	8,0-15,0
	Negativo	174	11,0 <sup>a</sup>	3,5	0,3	2,3	19,0		
VGM (fL)	Positivo	23	50,9 <sup>a</sup>	5,5	1,1	45,0	70,0	0,161	39-55
	Negativo	174	49,0 <sup>a</sup>	4,9	0,4	39,0	89,0		
CHGM (%)	Positivo	23	32,5 <sup>a</sup>	1,7	0,4	27,0	35,0	0,704	31-35
	Negativo	174	32,8 <sup>a</sup>	1,3	0,1	28,0	35,0		
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Positivo	23	434 <sup>a</sup>	421	88	79	1,662	0,988	300-900
	Negativo	174	388 <sup>a</sup>	296	22	15	1,400		
PPT (g/dl)	Positivo	20	7,7 <sup>a</sup>	1,2	0,3	4,0	9,2	0,290	6-7,5**
	Negativo	162	7,5 <sup>a</sup>	1,1	0,1	4,6	11,0		

<sup>a</sup> Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% ( $p>0,05$ ). VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

\*\* Valor de referência segundo Krimer (2011)

**Tabela 11:** Análise descritiva do leucograma dos gatos, positivos e negativos na PCR para ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Leucócitos totais (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	18,13 <sup>a</sup>	13,90	2,90	3,90	73,9	0,62	5,5-19,5
	Negativo	174	18,99 <sup>a</sup>	12,39	0,94	1,50	100,0		
Metamielócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	0,000 <sup>a</sup>	0,00	0,000	0,00	0,00	0,89	0-0
	Negativo	174	0,005 <sup>a</sup>	0,05	0,004	0,00	0,05		
Bastões (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	0,58 <sup>a</sup>	0,98	0,20	0,00	4,43	0,26	0-0,3
	Negativo	174	0,67 <sup>a</sup>	0,95	0,07	0,00	6,50		
Segmentados (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	11,85 <sup>a</sup>	10,58	2,21	3,28	54,69	0,57	2,5-12,5
	Negativo	174	12,01 <sup>a</sup>	7,77	0,59	0,57	44,48		
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	4,00 <sup>a</sup>	2,67	0,56	0,39	11,17	0,74	1,5-7,0
	Negativo	174	4,59 <sup>a</sup>	7,65	0,58	0,45	96,00		
Monócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	0,85 <sup>a</sup>	0,61	0,13	0,12	2,22	0,90	0- 0,85
	Negativo	174	0,88 <sup>a</sup>	0,81	0,06	0,00	7,96		
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	0,85 <sup>a</sup>	1,95	0,41	0,00	9,42	0,29	0-1,5
	Negativo	174	0,82 <sup>a</sup>	1,15	0,09	0,00	8,10		
Basófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	23	0,006 <sup>a</sup>	0,03	0,006	0,00	0,16	0,88	Raros
	Negativo	174	0,013 <sup>a</sup>	0,12	0,008	0,00	1,43		

<sup>a</sup> Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05); N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

Nenhuma alteração hematológica foi associada estatisticamente à infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ na análise por frequência (p>0,05), conforme demonstrado na Tabela 12.

**Tabela 12:** Alterações hematológicas associadas à infecção natural por ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		PCR ‘ <i>C.M.haemominutum</i> ’ n(%)		p-valor
		Positivos (n=23)	Negativos (n=174)	
<b>Anemia</b> (He, Ht, Hg)	Sim	4 (17,4) <sup>a</sup>	33 (19,0) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	19 (82,6)	141 (81)	
<b>VGM aumentado</b>	Sim	2 (8,7) <sup>a</sup>	3 (1,7) <sup>a</sup>	0,1049
	Não	21 (91,3)	171 (98,3)	
<b>CHGM diminuído</b>	Sim	2 (8,7) <sup>a</sup>	2 (1,1) <sup>b</sup>	0,3005
	Não	21 (91,3)	172 (98,9)	
<b>Trombocitopenia</b>	Sim	13 (56,5) <sup>a</sup>	90 (51,7) <sup>a</sup>	0,8248
	Não	10 (43,5)	84 (48,3)	
<b>Trombocitose</b>	Sim	3 (13,0) <sup>a</sup>	13(7,5) <sup>a</sup>	0,4071
	Não	20 (87,0)	161 (92,5)	
<b>Hiperproteïnemia*</b>	Sim	11 (55,0) <sup>a</sup>	75 (46,3) <sup>a</sup>	0,4863
	Não	9 (45,0)	87 (53,7)	
<b>Leucopenia</b>	Sim	2 (8,7) <sup>a</sup>	8 (4,6) <sup>a</sup>	0,6072
	Não	21(91,3)	166 (95,4)	
<b>Leucocitose</b>	Sim	9 (39,1) <sup>a</sup>	65 (37,4) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	14 (60,9)	109 (62,6)	
<b>Neutropenia</b>	Sim	0 (0) <sup>a</sup>	4 (2,3) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	23 (100)	170 (97,7)	
<b>Neutrofilia</b>	Sim	8 (34,8) <sup>a</sup>	60 (34,5) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	15 (65,2)	114(65,5)	
<b>Discreto DNNE</b>	Sim	9 (39,1) <sup>a</sup>	99(56,9) <sup>a</sup>	0,1226
	Não	14 (60,9)	75(43,1)	
<b>Linfopenia</b>	Sim	2 (8,7) <sup>a</sup>	33 (19,0) <sup>a</sup>	0,2662
	Não	21 (91,3)	141 (81,0)	
<b>Linfocitose</b>	Sim	3 (13,0) <sup>a</sup>	24(13,8) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	20 (87,0)	150 (86,2)	
<b>Monocitose</b>	Sim	11(47,8) <sup>a</sup>	73 (42,0) <sup>a</sup>	0,6565
	Não	12 (52,2)	101(58,0)	
<b>Eosinofilia</b>	Sim	3 (13,0) <sup>a</sup>	26 (14,9) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	20 (87,0)	148( 85,1)	
<b>MAM</b>	Sim	6 (26,1) <sup>a</sup>	39 (22,4) <sup>a</sup>	0,8965
	Não	17 (73,9)	135 (77,6)	

<sup>a</sup> Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; N:Número de gatos; He:Hemácias; Ht:Hematócrito; Hg:Hemoglobina; VGM:Volume globular médio; CHGM:Concentração de hemoglobina globular média; DNNE: Desvio nuclear neutrofílico à esquerda; MAM: Monócitos ativados à macrófagos;\*Grupos positivos e negativos com 40 e 142 gatos amostrados, respectivamente.

#### 4.6.4 ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’

A infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ não apresentou qualquer correlação estatística com os parâmetros hematológicos médios do eritrograma, leucograma e complementos ( $p>0,05$ ). No entanto, vale ressaltar que, a média das plaquetas dos gatos positivos foi inferior à dos gatos negativos e abaixo do padrão de referência para gatos (Tabelas 13 e 14).

**Tabela 13:** Análise descritiva do eritrograma e complementos (plaquetas e proteína plasmática total) dos gatos positivos e negativos na PCR para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	Positivo	9	6,3 <sup>a</sup>	1,8	0,6	2,9	9,2	0,318	5,0-10,0
	Negativo	188	6,9 <sup>a</sup>	2,3	0,2	1,3	11,2		
Hematócrito (%)	Positivo	9	32,2 <sup>a</sup>	9,1	3,0	16	43	0,624	24-45
	Negativo	188	33,6 <sup>a</sup>	10,6	0,8	7	57		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	9	10,4 <sup>a</sup>	2,8	0,9	4,9	14	0,488	8,0-15,0
	Negativo	188	11,0 <sup>a</sup>	3,5	0,3	2,3	19		
VGM (fL)	Positivo	9	50,3 <sup>a</sup>	5,8	1,9	42	60,8	0,416	39-55
	Negativo	188	49,2 <sup>a</sup>	4,9	0,4	39	89		
CHGM (%)	Positivo	9	32,6 <sup>a</sup>	1,7	0,6	29,1	35	0,969	31-35
	Negativo	188	32,8 <sup>a</sup>	1,4	0,1	27,0	35		
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Positivo	9	294 <sup>a</sup>	138	46	37	550	0,827	300-900
	Negativo	188	398 <sup>a</sup>	318	23	15	1,662		
PPT (g/dl)	Positivo	9	7,2 <sup>a</sup>	0,6	0,2	6,2	8,4	0,215	6-7,5**
	Negativo	173	7,5 <sup>a</sup>	1,1	0,1	40	11,0		

<sup>a</sup> Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% ( $p>0,05$ ); VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

\*\* Valor de referência segundo Krimer (2011)

**Tabela 14:** Análise descritiva do leucograma dos gatos positivos e negativos na PCR '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', pertencentes à Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetro	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência*
Leucócitos totais (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	15,41 <sup>a</sup>	7,04	2,35	4,10	24,8	0,540	5,5-19,5
	Negativo	188	19,06 <sup>a</sup>	12,73	0,91	1,50	100,0		
Metamielócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	0,000 <sup>a</sup>	0,00	0,000	0,00	0,00	0,936	0-0
	Negativo	188	0,005 <sup>a</sup>	0,05	0,003	0,00	0,05		
Bastões (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	0,53 <sup>a</sup>	0,81	0,27	0,00	2,59	0,548	0-0,3
	Negativo	188	0,67 <sup>a</sup>	0,96	0,07	0,00	6,50		
Segmentados (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	9,09 <sup>a</sup>	4,83	1,61	2,62	17,11	0,315	2,5-12,5
	Negativo	188	12,13 <sup>a</sup>	8,22	0,60	0,57	54,69		
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	4,06 <sup>a</sup>	2,42	0,81	0,66	7,01	0,720	1,5-7,0
	Negativo	188	4,54 <sup>a</sup>	7,40	0,54	0,40	96,00		
Monócitos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	0,94 <sup>a</sup>	0,73	0,24	0,00	2,16	0,747	0- 0,85
	Negativo	188	0,88 <sup>a</sup>	0,79	0,06	0,00	7,96		
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	9	0,79 <sup>a</sup>	0,68	0,23	0,08	2,38	0,316	0-1,5
	Negativo	188	0,83 <sup>a</sup>	1,29	0,09	0,00	9,42		
Basófilos (x10 <sup>3</sup> /µl)	Positivo	188	0,00 <sup>a</sup>	0,00	0,000	0,00	0,00	0,893	Raros
	Negativo	9	0,01 <sup>a</sup>	0,11	0,008	0,00	1,43		

<sup>a</sup> Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05); N: número de gatos; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo.

\* Valores de referência segundo Jain (1993)

Nenhuma das alterações hematológicas analisadas foi associada estatisticamente à infecção por '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (p>0,05), a seguir: anemia, trombocitopenia, trombocitose, hiperproteinemia, leucocitose, leucopenia, neutropenia, neutrofilia, discreto DNNE, linfopenia, linfocitose, monocitose, eosinofilia e presença de monócitos ativados à macrófagos, conforme discriminado na Tabela 15. Foi evidenciado que os gatos negativos apresentaram mais frequentemente hiperproteinemia quando comparado aos gatos positivos (p=0,0370).

**Tabela 15:** Alterações hematológicas associadas à infecção natural por ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		PCR ‘ <i>C. (M.) haemominutum</i> ’ n(%)		p-valor
		Positivos (n=9)	Negativos (n=188)	
<b>Anemia (He, Ht, Hg)</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	36 (19,1) <sup>a</sup>	0,6965
	Não	8 (88,9)	152 (80,9)	
<b>VGM aumentado</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	4 (2,1) <sup>a</sup>	0,2098
	Não	8 (88,9)	184 (97,9)	
<b>CHGM diminuído</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	3 (1,6) <sup>a</sup>	0,1716
	Não	8 (88,9)	185 (98,4)	
<b>Trombocitopenia</b>	Sim	6 (66,7) <sup>a</sup>	97 (51,6) <sup>a</sup>	0,5018
	Não	3 (33,3)	91 (48,4)	
<b>Trombocitose</b>	Sim	0 (0) <sup>a</sup>	16 (8,5) <sup>a</sup>	0,6181
	Não	9 (100)	172 (91,5)	
<b>Hiperproteinemia*</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	85 (49,1) <sup>b</sup>	<b>0,0370</b>
	Não	8 (88,9)	88 (50,9)	
<b>Leucopenia</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	9 (4,8) <sup>a</sup>	0,3737
	Não	8 (88,9)	179 (95,2)	
<b>Leucocitose</b>	Sim	3 (33,3) <sup>a</sup>	71 (37,8) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	6 (66,7)	117 (62,2)	
<b>Neutropenia</b>	Sim	0 (0) <sup>a</sup>	4 (2,1) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	9 (100)	184 (97,9)	
<b>Neutrofilia</b>	Sim	2 (22,2) <sup>a</sup>	66 (35,1) <sup>a</sup>	0,5023
	Não	7 (78,8)	122 (64,9)	
<b>Discreto DNNE</b>	Sim	4 (44,4) <sup>a</sup>	104 (55,3) <sup>a</sup>	0,7340
	Não	5 (55,6)	84 (44,7)	
<b>Linfopenia</b>	Sim	2 (22,2) <sup>a</sup>	33 (17,6) <sup>a</sup>	0,6523
	Não	7 (77,8)	155 (82,4)	
<b>Linfocitose</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	26 (13,8) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	8 (88,9)	172 (86,2)	
<b>Monocitose</b>	Sim	3 (33,3) <sup>a</sup>	81 (43,3) <sup>a</sup>	0,7353
	Não	6 (66,7)	107 (56,7)	
<b>Eosinofilia</b>	Sim	1 (11,1) <sup>a</sup>	28 (14,9) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	8 (88,9)	160 (85,1)	
<b>MAM</b>	Sim	2 (22,2) <sup>a</sup>	43 (22,9) <sup>a</sup>	1,0000
	Não	7 (77,8)	145 (77,1)	

<sup>a</sup>Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; N:Número de gatos; He:Hemácias; Ht:Hematócrito; Hg:Hemoglobina; VGM:Volume globular médio; CHGM:Concentração de hemoglobina globular média; DNNE: Desvio nuclear neutrofílico à esquerda; MAM: Monócitos ativados à macrófagos;\*Grupos positivos e negativos com 40 e 142 gatos amostrados, respectivamente.



## 4.7 Fatores associados à infecção por hemoplasmas

### 4.7.1 *Mycoplasma* spp.

As variáveis idade, gênero e raça foram comparadas à ocorrência geral de hemoplasmas. Nesta condição, pode ser observado que somente a variável gênero apresentou correlação positiva com *Mycoplasma* spp. ( $p=0,0053$ ), em que os machos apresentaram aproximadamente duas vezes mais chances de se infectarem por hemoplasmas do que as fêmeas. Gatos adultos e idosos, bem como aqueles com raça definida apresentaram mais chances de se infectarem por hemoplasmas quando comparados aos gatos filhotes e sem raça definida, respectivamente. No entanto, as variáveis idade e raça não demonstraram correlação estatística com a infecção por *Mycoplasma* spp. ( $p>0,05$ ) (Tabela 16).

**Tabela 16:** Fatores associados à infecção natural por *Mycoplasma* spp. em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro

Variável	Número de gatos	Gatos positivos (%)	p-valor	Odds Ratio	IC (95%)
<b>Idade</b>					
Filhote	29	5 (17,2) <sup>a</sup>		1	
Adulto	168	40 (23,8) <sup>a</sup>	0,5902	1,5	0,53 – 4,19
<b>Gênero</b>					
Fêmea	108	16 (14,8) <sup>a</sup>		1	
Macho	89	29 (32,6) <sup>b</sup>	<b>0,0053</b>	2,78	1,39 – 5,55
<b>Raça</b>					
Sem raça definida	173	39 (22,5) <sup>a</sup>		1	
Com raça definida	24	6 (25,0) <sup>a</sup>	0,9926	1,16	0,43 – 3,08

<sup>a</sup>Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; Classificação da faixa etária: Foram considerados filhotes os gatos de até 12 meses e adultos aqueles com idade superior a doze meses; IC: Intervalo de confiança.

### 4.7.2 *Mycoplasma haemofelis*

Ao analisar os fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma haemofelis* constatou-se que a variável gênero demonstrou correlação estatística positiva à infecção ( $p= 0,0006$ ), de modo que somente gatos machos foram positivos para esta espécie de hemoplasma. As variáveis idade e raça não apresentaram correlação estatística com a infecção por este agente ( $p>0,05$ ). No entanto, pode se observar que somente os gatos adultos foram positivos e que gatos com raça definida apresentaram chance duas vezes maior de se infectarem por *M. haemofelis* quando comparados aos gatos sem raça definida (Tabela 17).

**Tabela 17:** Fatores associados à infecção natural por *Mycoplasma haemofelis* em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Variável	Número de gatos	Gatos positivos (%)	p-valor	Odds Ratio	IC (95%)
<b>Idade</b>					
Filhote	29	0 (0,0) <sup>a</sup>	0,3613	-	-
Adulto	168	9 (5,4) <sup>a</sup>			
<b>Gênero</b>					
Fêmea	108	0 (0,0) <sup>a</sup>	<b>0,0006</b>	-	-
Macho	89	9 (10,1) <sup>b</sup>			
<b>Raça</b>					
Sem raça definida	173	7 (4,0) <sup>a</sup>	0,2997	1	0,42 – 11,04
Com raça definida	24	2 (8,3) <sup>a</sup>			

<sup>a</sup>Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; Classificação da faixa etária Foram considerados filhotes os gatos de até 12 meses e adultos aqueles com idade superior a doze meses; IC: Intervalo de confiança.

#### 4.7.3 ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’

O fator gênero foi correlacionado estatisticamente à infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (p=0,0065), na qual os machos apresentaram quatro vezes mais chances de se infectarem pela espécie de hemoplasma em questão quando comparados às fêmeas. Embora na ausência de associação estatística (p>0,05), gatos adultos apresentaram respectivamente, aproximadamente quatro vezes mais chances de se infectarem pelo agente do que gatos filhotes, bem como gatos com raça definida tiveram maior probabilidade de se infectarem com relação aos gatos sem raça definida.

**Tabela 18:** Fatores associados à infecção natural por ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro

Variável	Número de gatos	Gatos positivos (%)	p-valor	Odds Ratio	IC (95%)
<b>Idade</b>					
Filhote	29	1 (3,4) <sup>a</sup>	0,2097	1	0,55 – 35,6
Adulto	168	22 (13,1) <sup>a</sup>			
<b>Gênero</b>					
Fêmea	108	6 (5,6) <sup>a</sup>	<b>0,0065</b>	1	1,51 – 10,68
Macho	89	17 (19,1) <sup>b</sup>			
<b>Raça</b>					
Sem raça definida	173	19 (11,0) <sup>a</sup>	0,4930	1	0,50 – 5,25
Com raça definida	24	4 (16,7) <sup>a</sup>			

<sup>a</sup>Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; Classificação da faixa etária Foram considerados filhotes os gatos de até 12 meses e adultos aqueles com idade superior a doze meses; IC: Intervalo de confiança.

#### 4.7.4 ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’

Em relação ao hemoplasma ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*, ao analisar os fatores associados à infecção, idade, gênero e raça, verificou-se que nenhuma variável apresentou correlação à infecção por este agente ( $p>0,05$ ). No entanto, os machos apresentaram chance duas vezes maior de infectarem do que as fêmeas. Em relação à idade, gatos filhotes apresentaram maior risco de infecção do que os adultos, assim como gatos sem raça definida apresentaram-se discretamente mais propensos à infecção do que gatos com raça definida.

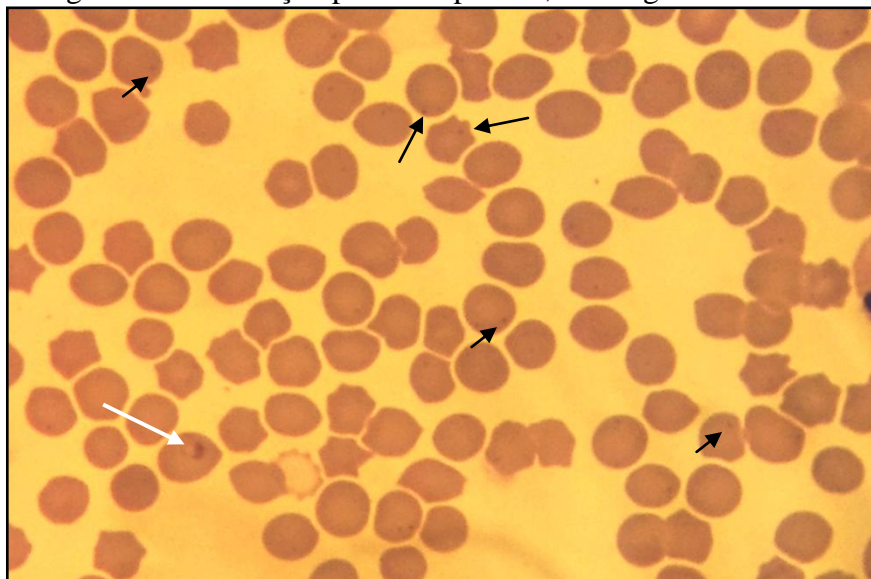
**Tabela 19:** Fatores associados à infecção natural por ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ em gatos provenientes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Variável	Número de gatos	Gatos positivos (%)	p-valor	Odds Ratio	IC (95%)
<b>Idade</b>					
Filhote	29	2 (6,9) <sup>a</sup>	0,6192	1,70	0,34 – 8,64
Adulto	168	6 (4,2) <sup>a</sup>			
<b>Gênero</b>					
Fêmea	108	3 (2,8) <sup>a</sup>	0,3041	1	0,61 – 10,42
Macho	89	6 (6,7) <sup>a</sup>			
<b>Raça</b>					
Sem raça definida	173	8 (4,6) <sup>a</sup>	1,000	1,13	0,13 – 9,33
Com raça definida	24	1 (4,2) <sup>a</sup>			

<sup>a</sup>Valores seguidos de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; Classificação da faixa etária foram considerados filhotes os gatos de até 12 meses e adultos aqueles com idade superior a doze meses; IC: Intervalo de confiança.

#### 4.8 Pesquisa direta de piroplasmas em esfregaços sanguíneos

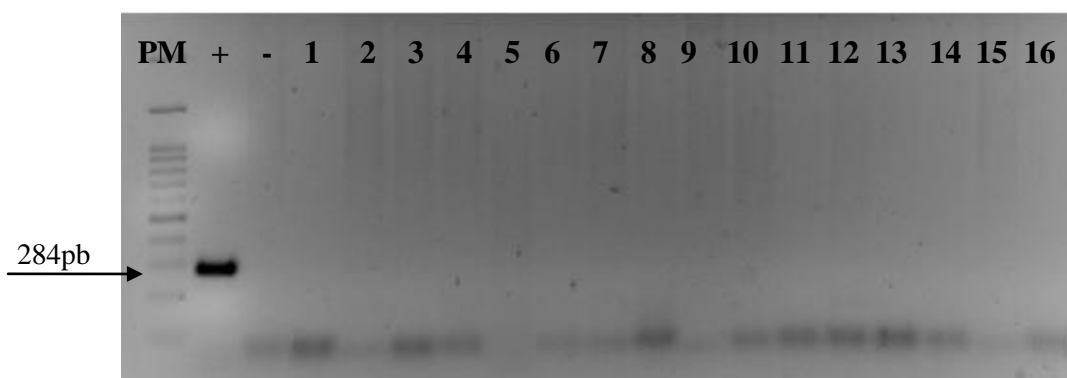
Na análise dos esfregaços sanguíneos foram evidenciadas formas de piroplasma no interior de hemácias de dois animais (1,0%). Destes, apenas um demonstrou também estruturas epieritrocíticas sugestivas de infecção por hemoplasma, vide figura 9.



**Figura 9.** Esfregaço de sangue com formas de piroplasma no interior de hemácias (seta branca). Notar, adicionalmente, estruturas epieritrocíticas (setas pretas) (Corante Panótipo Rápido, 1000x).

#### 4.9 Diagnóstico molecular de *Cytauxzoon felis* baseado no gene 18S rRNA

Todos os animais avaliados mostraram-se negativos para *Cytauxzoon felis* pela PCR convencional baseado no gene 18S rRNA, conforme demonstrado na figura 10.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O amplicono de 284 pares de base do gene 18S rRNA de *Cytauxzoon felis* demonstrado na figura é referente ao controle positivo da reação. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1-16: Gatos negativos.

## 5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a população de animais domésticos tem apresentado crescimento acentuado, em especial, os gatos, devido às facilidades de manejo e criação, no que diz respeito ao custo e espaço requerido. Conseqüentemente, há o estreitamento do convívio destes com o homem. Deste modo, estudos têm sido necessários acerca das enfermidades que acometem a espécie em questão, bem como os riscos de transmissão destas doenças ao homem. Este estudo investigou a ocorrência das hemoparasitoses, micoplasmose e citauxzoonose felina em gatos provenientes do município do Rio de Janeiro e Baixada Fluminense, assim como as alterações hematológicas e fatores associados à infecção.

### 5.1 *Micoplasmas* hemotróficos

Baseado no diagnóstico citológico em esfregaços sanguíneos, estruturas epieritrocíticas sugestivas de infecção por *Mycoplasma* spp. foram observadas em 11,2% (22/197) dos gatos amostrados. No entanto, somente sete destes animais tiveram a infecção por hemoplasmas confirmada por meio da técnica Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Níveis superiores de positividade em esfregaços sanguíneos foram observados por Milken et al. (2002), estudo no qual detectaram micro-organismos na superfície de hemácias em 30% dos gatos errantes de Uberlândia, Minas Gerais. Mendes-de-Almeida et al. (2007) detectaram, na população de gatos errantes alocados nos jardins do zoológico do Rio de Janeiro, crescente infecção por *Mycoplasma* spp., nos anos 2002 a 2004, com variação de 15,8% a 75,8%. No entanto, Maia (2008) observou tais estruturas sobre as hemácias em apenas 0,97% (2/207) dos animais amostrados. Nota-se que o grau de infecção por hemoplasmas na população de gatos errantes é superior quando comparado àquele de gatos domiciliados. Hora (2008), em estudo realizado em São Paulo, por meio da análise de esfregaços sanguíneos, evidenciou estruturas semelhantes em esfregaços sanguíneos de onze dos felinos anêmicos (4,07%); no entanto, somente seis destes animais confirmaram positividade nos ensaios moleculares. Mundialmente, a frequência de infecção por hemoplasmas obtida por meio de esfregaço sanguíneo pode variar de 0% a 42% (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; SULIMAN et al., 2009; NIBBLETT et al., 2010; GEORGES et al., 2012; JENKINS et al., 2013). Tais variações são resultantes das limitações do teste diagnóstico, localização geográfica e características das amostras coletadas nos distintos estudos.

Até recentemente, o diagnóstico da hemoplasmosse felina era realizado somente pela identificação dos micro-organismos em esfregaços sanguíneos (WILLI et al., 2007). No entanto, a sensibilidade e especificidade diagnóstica desta técnica é baixa (HARVEY, 2006). Em decorrência da baixa sensibilidade, resultados falso-negativos podem ser gerados, principalmente devido à característica flutuação da parasitemia de hemoplasmas, principalmente *Mycoplasma haemofelis*. Adicionalmente, é imprescindível a escolha de esfregaços sanguíneos frescos para o diagnóstico devido à remoção dos micro-organismos na presença de EDTA (SYKES, 2010; TASKER, 2010). Por outro lado, resultados falso-positivos podem ser obtidos, visto que, os organismos podem ser facilmente confundidos com precipitados de corantes, corpúsculos de Howell-Jolly, artefatos secundários à secagem lenta do esfregaço sanguíneo, formas de piroplasmas e/ou ponteados basofílicos (SYKES, 2003; BARKER; TASKER, 2013). Vale ressaltar que, em nosso estudo, foram utilizados esfregaços sanguíneos confeccionados no laboratório comercial a partir de sangue com o anticoagulante EDTA para pesquisa direta de hemoparasitos e que estes apresentavam, por vezes, excesso de precipitação de corante bem como outras sujidades, o que pode ter dificultado o diagnóstico de hemoplasmas. Em decorrência das limitações inerentes ao diagnóstico citológico, os ensaios moleculares tem sido teste de escolha para o diagnóstico de micoplasmas

hemotróficos (HORA, 2008; MACIEIRA, 2008; MAIA, 2008; TASKER, 2010). As técnicas moleculares de diagnóstico têm demonstrado maior sensibilidade quando comparada à técnica de citologia em esfregaços sanguíneos, principalmente no que diz respeito à detecção de hemoplasmas em gatos portadores assintomáticos (SYKES, 2010; BARKER; TASKER, 2013). As diferenças de sensibilidade e especificidade entre as técnicas de citologia em esfregaço sanguíneo e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real no presente estudo foram evidenciadas pelo pobre grau de concordância determinado pelo teste estatístico Kappa ( $k=0,07$ ). Somente sete gatos (15,6%) mostraram-se positivos simultaneamente para ambas as técnicas. Maior sensibilidade e especificidade dos ensaios moleculares frente ao diagnóstico citológico de micoplasmas hemotróficos também foi evidenciada por Hora (2008).

As espécies de hemoplasmas não são passíveis de serem distinguidas morfológicamente em esfregaço sanguíneo (WILLI et al., 2007; 2011). Baseado neste princípio e com auxílio da ferramenta molecular de diagnóstico, pode-se sugerir que dentre os gatos positivos pelo teste citológico estavam circulantes as três espécies de hemoplasmas mais comumente observadas nas infecções de gatos, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. No entanto, esta última somente foi identificada em animais coinfectados por *M. haemofelis* ou ‘*Candidatus M. haemominutum*’, o que sugere que as estruturas epieritrocíticas observadas nos esfregaços sanguíneos não correspondem à ‘*Candidatus M. turicensis*’, mas sim à outra espécie identificada no mesmo animal. Em estudo realizado por Willi et al. (2011), não foram notadas estruturas indicativas de ‘*Candidatus M. turicensis*’ em gatos sabidamente infectados pelo agente, independente do método de preparação dos esfregaços sanguíneos. Até o presente momento, ‘*Candidatus M. turicensis*’ não foi identificado em esfregaços sanguíneos de gatos natural ou experimentalmente infectados, provavelmente, devido à baixa parasitemia deste micro-organismo (WILLI et al., 2006). Logo, o diagnóstico de hemoplasmoses felina não deve basear-se somente na detecção do hemoparasito em esfregaços sanguíneos (WILLI et al., 2011).

Embora a pesquisa direta seja comumente utilizada como técnica de diagnóstico de hemoplasmas em gatos no Brasil, o uso de ensaios moleculares como alternativa de diagnóstico tem aumentado a sensibilidade de detecção destes agentes na população felina de diferentes regiões do Brasil (BIONDO et al., 2009). Neste estudo, por meio da qPCR, foi detectada a presença de hemoplasmas em 22,8% (45/197) dos gatos provenientes da região metropolitana no Rio de Janeiro. Destes, 21,3% eram provenientes da cidade do Rio de Janeiro (17/197) e 23,9% (28/197) da Baixada Fluminense. A não distinção da ocorrência de hemoplasmas entre estas duas áreas da Região Metropolitana do Rio de Janeiro demonstra a distribuição homogênea do agente e, portanto, igual risco de infecção por hemoplasmas entre os gatos pertencentes a estas áreas. Tal característica de distribuição de infecção por hemoplasmas também foi observada por Maia (2008) ao longo das regiões centro-sul, metropolitana e serrana do Rio de Janeiro.

A frequência de micoplasmas hemotróficos observada neste estudo assemelha-se aos resultados obtidos por Santos (2008) e Aragão-de-Sousa et al. (2013) utilizando PCR convencional como ferramenta de diagnóstico, nos quais o DNA de pelo menos um hemoplasma foi detectado em 21,3% (79/371) e 19,9% (40/201) na população dos gatos amostrados em Porto Alegre e Belém, respectivamente. Bortoli et al. (2012), no entanto, evidenciaram menor frequência de infecção em São Paulo, no qual 6,5% (3/46) dos gatos aparentemente saudáveis submetidos à campanha de castração gratuita mostraram-se positivos para micoplasmas hemotróficos. Ainda em São Paulo, Hora (2008) observou ocorrência de hemoplasmas em 9,3% (25/270) dos felinos anêmicos amostrados. Ambos os estudos utilizaram PCR convencional como método de diagnóstico. Frequência superior foi

evidenciada em estudo desenvolvido num Hospital Veterinário de Curitiba, no qual a frequência de hemoplasmas foi de 56,7% em gatos anêmicos (BAUMANN et al., 2006).

Estudos moleculares, baseados em PCR convencional, abordando a frequência de *Mycoplasma* spp. na população felina do Rio de Janeiro evidenciaram níveis de infecção inferiores ao obtido no presente estudo. Macieira (2008) evidenciou frequência de 12,1% (18/149) em amostras obtidas de clínica veterinária especializada em felinos na zona sul do Rio de Janeiro, assim como Maia (2008) reportou infecção em 14% (29/207) dos gatos amostrados provenientes das Regiões Metropolitana, Centro-Sul e Serrana do estado do Rio de Janeiro. A diferença observada entre os estudos acima citados e o trabalho aqui redigido provavelmente é secundária a dois fatores associados ou não entre si, sendo estes as distintas técnicas moleculares utilizadas e/ou amostragem diferenciada. A PCR em tempo real, ferramenta utilizada para determinação da ocorrência geral de hemoplasmas no presente estudo, tem como característica a maior sensibilidade de detecção de patógenos quando comparadas à PCR convencional (GARY et al., 2006; TASKER, 2010; VEIR; LAPPIN, 2010). Por meio da PCR em tempo real, espécies de hemoplasmas podem ser detectadas um dia após a infecção (TASKER; LAPPIN, 2006).

Ensaio moleculares baseados nas reações de PCR convencional e qPCR têm sido utilizados mundialmente no diagnóstico de infecção por micoplasmas hemotróficos, com frequência de infecção variando entre 4% a 52,5% (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; KEWISH et al., 2004; LOBETTI; TASKER, 2004; NIBBLETT et al., 2004; TASKER et al., 2004; BAUMANN et al., 2006; LAPPIN et al., 2006; ISHAK et al., 2007; PETERS et al., 2008; GENTILINI et al., 2009; JUVET et al., 2010; MAHER et al., 2010; ROURA et al., 2010; BENETT et al., 2011; STOJANOVIC; FOLEY, 2011; ASSARASAKON et al., 2012; JENKINS et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ., 2013). A prevalência de hemoplasmas, bem como das espécies infectantes variam, adicionalmente, em função da categoria das amostras estudadas – gatos anêmicos ou não, gatos errantes, domiciliados ou de abrigo. Em amostragens por conveniência, ou seja, sem predileção por qualquer categoria, os níveis de infecção variam entre 18,9% a 43,4%, com predomínio da espécie ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (TASKER et al., 2004; LAPPIN et al., 2006; GENTILINI et al., 2009; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013). Em estudos com gatos doentes e anêmicos, as prevalências variam de 11,2% a 52,5%, nos quais, *Mycoplasma haemofelis* é o principal hemoplasma observado em gatos doentes/anêmicos quando comparado aos gatos saudáveis/não anêmicos (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; KEWISH et al., 2004; WILLI et al., 2006; ISHAK et al., 2007).

Em nosso estudo, a frequência das espécies infectantes foi de 4,6% (9/197), 4,6% (9/197) e 11,7% (23/197) para *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, respectivamente. Constatou-se maior distribuição de gatos positivos para as espécies ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ no município do Rio de Janeiro quando comparado à Baixada Fluminense ( $p > 0,05$ ). No entanto, a infecção por *Mycoplasma haemofelis* foi maior na Baixada Fluminense (6,8%), área na qual os gatos apresentaram chance cinco vezes maior risco de infecção do que os gatos do Rio de Janeiro (1,3%) ( $p > 0,05$ ). Uma vez que dados inerentes ao animal não foram obtidos neste estudo, pouco se pode supor a respeito dos fatores relacionados a este achado. Entretanto, dispondo da informação de que os micoplasmas hemotróficos são micro-organismos oportunistas e que a espécie *Mycoplasma haemofelis* é dita na literatura como a mais patogênica, suspeita-se que a frequência deste agente nos gatos da Baixada Fluminense esteja relacionada a alguma doença debilitante como as retrovíroses ou neoplasias, ao descuido no manejo e criação destes animais ou ainda, que estes animais estivessem de fato com micoplasmose clínica. ‘*Candidatus M. haemominutum*’ representa a espécie de hemoplasma de maior ocorrência na população de gatos amostrados,

seguidos por igual ocorrência de ‘*Candidatus M. turicensis*’ e *M. haemofelis*. No Brasil, a maioria dos estudos previamente realizados demonstrou ser ‘*Candidatus M. haemominutum*’ a espécie de maior ocorrência no país (MACIEIRA, 2008; MAIA, 2008; SANTOS, 2008; BORTOLI et al., 2012; BRAGA et al., 2012; MICELI et al., 2013). No entanto, em estudos em que a população estudada não é escolhida por conveniência, a espécie infectante predominante pode variar em função do grau de patogenicidade entre os micoplasmas hemotróficos. Baumann et al. (2006) e Hora (2008) demonstraram ser *M. haemofelis* a espécie de maior ocorrência dentre a população de felinos domésticos anêmicos. Aragão-de-Sousa et al. (2013), por outro lado, observou ‘*Candidatus M. turicensis*’ com maior frequência na população de gatos amostrados no Pará. O presente estudo é o primeiro a detectar ‘*Candidatus M. turicensis*’ em gatos naturalmente infectados no estado do Rio de Janeiro.

Coinfecções entre ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* (1%), ‘*Candidatus M. turicensis*’ e *M. haemofelis* (0,5%) e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ (0,5%), assim como coinfecção tripla em um gato (0,5%) foram observadas nos gatos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. A ocorrência de coinfecção por duas ou mais espécies de hemoplasmas é um evento pouco comum na literatura cujos valores geralmente são baixos, corroborando aos nossos achados. No Brasil, coinfecção entre ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. turicensis*’ e *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ já foram descritas, com variação de 2% a 12,5% (MACIEIRA, 2008; BORTOLI et al., 2012; BRAGA et al., 2012; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013) ou mesmo ausentes (HORA, 2008; MAIA, 2008). Coinfecção entre ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* é a mesma frequentemente observada no Brasil. Até o presente momento, coinfecção tripla em felinos domésticos só havia sido reportada em Porto Alegre (SANTOS, 2008). Este estudo representa, portanto, a primeira detecção de coinfecção pelas três espécies de hemoplasmas mais comumente reportadas na literatura em gato naturalmente infectado na região metropolitana do Rio de Janeiro, animal este que não apresentou qualquer alteração hematológica. Mundialmente, já foram observadas coinfecções dupla, tripla e quádrupla (TASKER et al., 2004; LAPPIN et al., 2006; WILLI et al., 2006; ISHAK et al., 2007; PETERS et al., 2008; GENTILINI et al., 2009; JUVET et al., 2010; MAHER et al., 2010; ROURA et al., 2010; JENKINS et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ., 2013). A coinfecção quádrupla foi identificada em gato coparasitado por *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ em Portugal (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013). No presente estudo, as amostras de gatos positivas na PCR em tempo real para *Mycoplasma* spp. foram submetidas sequencialmente à PCR convencional espécie específica para determinação de espécie de hemoplasma infectante. No entanto, treze gatos positivos na triagem para *Mycoplasma* spp. não foram positivos para quaisquer das espécies de hemoplasmas quando submetidos à PCR convencional, tal fato pode estar relacionado ao diferente limiar de detecção das técnicas qPCR e cPCR ou a circulação de outra espécie de hemoplasma.

Observou-se que a frequência de gatos positivos para hemoplasmas foi maior no verão ( $p < 0,05$ ). No que concerne às espécies infectantes, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* demonstraram picos maiores de infecção durante o verão. Já ‘*Candidatus M. turicensis*’ apresentou pico de infecção durante o inverno ( $p > 0,05$ ). Embora não tenha sido um dos objetivos deste trabalho, uma vez que as amostras foram obtidas de laboratório comercial, tais dados sugerem que ocorra distribuição heterogênea das infecções por micoplasmas hemotróficos ao longo do ano. Na literatura são escassos os estudos epidemiológicos a respeito da distribuição sazonal de micoplasmas hemotróficos. No entanto, Gentilini et al. (2009), em estudo realizado na Itália, observaram significativamente maior prevalência de infecção no verão (29,3%) em relação a estação de outono (8,5%). Tais observações são consistentes com a hipótese de que uma das formas naturais de transmissão



de hemoplasmas seja por intermédio de artrópodes vetores. A pulga *Ctenocephalides felis* é o principal ectoparasita incriminado na transmissão de micoplasmas hemotróficos em felinos mundialmente, principalmente por ser o ectoparasito encontrado com maior frequência parasitando estes animais (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2007; TASKER, 2010). Nos EUA, pulgas *C. felis* foram encontradas parasitando animais em todas as estações do ano, no entanto, aparecem mais abundantemente nos meses mais quentes (MAIN, 1970). Amostras de DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’, *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. turicensis*’ já foram detectados em pulgas e suas fezes (SHAW et al., 2004; WOODS et al., 2005; LAPPIN et al., 2006; HORNOK et al., 2010; ASSARASAKORN et al., 2012). No entanto, a transmissão via repasto sanguíneo destes artrópodes nos hospedeiros ainda não está totalmente comprovada e elucidada. Amostras de DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* também já foram detectadas em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, sendo este, portanto, também incriminado na transmissão destes agentes (FYUMAGWA et al., 2008). Hornok et al. (2010), por outro lado, sugere que carrapatos não desempenham importante papel na transmissão de hemoplasmas. No presente estudo, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ demonstrou pico de infecção no inverno, período este pouco favorável à proliferação de artrópodes vetores. No entanto, vale ressaltar que o Rio de Janeiro apresenta clima tropical com estação chuvosa bem caracterizada durante o verão e estação seca, com temperaturas amenas, durante o inverno. No inverno de 2012, no entanto, as temperaturas médias se apresentaram ligeiramente acima da média climatológica normal para o período segundo relatório emitido pelo projeto MonitorAr-Rio, sendo tal observação associada a permanência de massas de ar quente sobre a região após prolongado período de estiagem (MONITORAR-RIO, 2012).

Assimilando esta observação ao fato de que a infecção por hemoplasmas já foi observada na ausência de vetores (TASKER, 2010), pode-se sugerir que existam outras formas de infecção. Aliado ao fato de que ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ‘*Candidatus M. turicensis*’ e *M. haemofelis* já tenham sido detectados em saliva, glândulas salivares e fezes de gatos (DEAN et al., 2008; MUSEUX et al., 2009; TASKER, 2010), a transmissão direta de hemoplasmas via interações agressivas constitui uma forma alternativa de transmissão, assim como via transfusão sanguínea e transplacentária (ALMOSNY, 2002; GARY et al., 2006; WILLI et al., 2006).

A hematologia tem sido utilizada amplamente com a finalidade de obter informações acerca de doenças que acometem uma ampla variedade de animais domésticos para facilitar e direcionar o diagnóstico clínico. Os resultados das análises hematológicas foram avaliados por dois métodos estatísticos, pela média obtida dos parâmetros hematológicos entre os grupos positivo e negativo e pela frequência das alterações hematológicas nos respectivos grupos, no intuito de evidenciar toda e qualquer alteração associada à enfermidade. No que diz respeito às alterações hematológicas associadas à infecção por hemoplasmas em geral (*Mycoplasma* spp.), somente o índice hematimétrico CHGM diminuído, o qual confere a classificação da anemia em hipocrômica segundo a concentração de hemoglobina, apresentou associação à micoplasmose felina. Os índices hematimétricos CHGM e VGM constituem indicadores referentes à concentração de hemoglobina e volume de eritrócitos utilizados na classificação das anemias (TVEDTEN, 2010). Partindo do princípio de que não foi constatada a associação de anemia à infecção geral por hemoplasmas neste estudo ( $p > 0,05$ ), a avaliação dos índices hematimétricos torna-se desnecessária. Embora a anemia seja uma alteração hematológica associada clinicamente a gatos suspeitos de infecção por hemoplasmas, muitos estudos falharam na associação desta alteração à enfermidade (WILLI et al., 2006; ISHAK et al., 2007; GENTILINI et al., 2009; MAHER et al., 2010; NIBBLETT et al., 2010; JENKINS et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ et al. 2013). No entanto, Kewish et al. (2004) conseguiram comprovar esta associação, na qual 72,2% e 36,4% de gatos anêmicos suspeitos ou não de

micoplasmose foram comprovadamente positivos para *Mycoplasma* spp., confrontando aos 10% de gatos saudáveis positivos. Santos (2008) também observou associação entre anemia e micoplasmose felina. Nem todos os gatos infectados desenvolvem anemia clinicamente, na verdade, a maioria destes sobrevive à infecção sem antibioticoterapia e a infecção pode persistir por meses em gatos tratados ou não (ISHAK et al., 2007). Estes gatos assintomáticos constituem, portanto, fontes de infecção a gatos sadios.

No que concerne às alterações hematológicas secundárias à infecção por *Mycoplasma haemofelis*, foi possível observar que este agente promoveu alterações no eritrograma, leucograma e complementos. Anemia foi observada em 66,7% dos gatos naturalmente infectados por *M. haemofelis* na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, com hematócrito variando de 9 a 23%. Alteração esta predominantemente do tipo macrocítica hipocrômica, indicando anemia regenerativa com hemácias jovens não totalmente hemoglobinizadas. A anemia é um achado comum em animais infectados por hemoplasmas, principalmente *M. haemofelis* (HARVEY, 2006). Corroborando aos nossos achados, Hora (2008) observou associação de anemia e VGM aumentado à infecção por *M. haemofelis*. De modo semelhante, Kewish et al. (2004) evidenciaram ser *M. haemofelis* a espécie mais prevalente em gatos com anemia regenerativa (66%). Criado-Fornelio et al. (2003) observou predominantemente *M. haemofelis* em gatos com suspeita clínica de micoplasmose felina. Estas observações evidenciam o caráter regenerativo da anemia causada por esta espécie em particular, bem como o potencial patogênico deste agente. Willi et al. (2006) e Macieira (2008), no entanto, não encontraram correlação entre anemia e infecção por este hemoplasma. No presente estudo, as alterações linfocitose, trombocitopenia e presença de monócitos ativados à macrófagos também foram associadas estatisticamente à infecção por *M. haemofelis*. No entanto, parte destas alterações provavelmente está relacionada a outras causas, visto que alterações em contagens de plaquetas e leucócitos não são consistentes com infecções por hemoplasmas (SYKES, 2003; TASKER, 2004). Hora (2008) também observou associação entre trombocitopenia e infecção por este hemoplasma. Criado-Fornelio et al. (2003) observaram trombocitopenia em 44% dos gatos amostrados. Braddock et al. (2004), no entanto, não observaram tal alteração em nenhum dos hemogramas realizados durante monitoramento por 30 dias de felino infectado naturalmente por *M. haemofelis*. Corroborando o presente estudo, deste modo, aos dados na literatura de que a contagem de plaqueta não é afetada na micoplasmose felina (TASKER, 2004; MACIEIRA, 2008). No presente estudo, acredita-se que a alteração observada não esteja relacionada de fato à infecção por este hemoplasma e que possivelmente se trata de pseudotrombocitopenia, alteração que é frequentemente observada em amostras de sangue de gatos em decorrência de agregação plaquetária secundária à coleta dificultosa (RUSSELL, 2010). Linfocitose também corresponde a uma alteração corriqueiramente observada em amostras de felinos, sendo, possivelmente secundária ao ato da coleta propriamente dito. Em gatos, a linfocitose geralmente é fisiológica mediada por ação de catecolaminas, entretanto, cronicidade, convalescência ou leucemia linfocítica também podem gerar este achado (VALENCIANO et al., 2010). Embora não tenha sido observada monocitose associada à infecção por *Mycoplasma haemofelis*, monócitos ativados a macrófagos foram observados com frequência em esfregaços sanguíneos e consistentemente associados à infecção por esta espécie de hemoplasma. Segundo Harvey & Gaskin (1977), presença de monócitos ativados, bem como, monocitose e eritrofagocitose são comuns na fase aguda de infecção.

Os gatos parasitados somente por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ou ‘*Candidatus M. turicensis*’ apresentaram anemia discreta a moderada, com hematócrito variando de 16% a 21%. Anemia severa (hematócrito < 13%) somente foi observada em felinos coinfectedos por *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Nos gatos anêmicos e positivos para estas espécies de hemoplasmas houve predomínio de anemia arregenerativa do tipo normocítica

normocrômica. No entanto, nenhuma alteração hematológica, inclusive anemia, foi associada à infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ou ‘*Candidatus M. turicensis*’. Tal fato associado aos achados laboratoriais na infecção por *M. haemofelis* confirma a distinta patogenicidade das espécies de micoplasmas hemotróficos relatada na literatura, onde ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ são consideradas espécies menos patogênicas (FOLEY et al., 1998; HARVEY, 2006; TASKER, 2010; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013). Infecção causada somente por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ou ‘*Candidatus M. turicensis*’ não cursa frequentemente com anemia significativa. Adicionalmente, acredita-se que cofatores como as retrovíroses, coinfeção por hemoplasmas e doenças concomitantes possam estar envolvidos no desenvolvimento e agravamento dos sinais clínicos (WILLI et al. 2006; MACIEIRA, 2008; PETERS et al., 2008; HAGIWARA, 2009; TASKER, 2010). Tal correlação foi observada no presente estudo, visto que, alguns gatos coparasitados por hemoplasmas apresentaram alterações laboratoriais com maior grau de severidade quando comparados aqueles com infecção por um único hemoplasma. Neste estudo, o ‘*status*’ de retrovíroses não foi investigado, o que inviabiliza a associação de coinfeção por hemoplasmas à anemia arregenerativa evidenciada. No entanto, esta correlação já foi reportada na literatura (VILLERS, 2005; HORA, 2008). Hiperproteïnemia foi observada com maior frequência em gatos negativos na infecção por ‘*Candidatus M. turicensis*’, o que indica que este parâmetro não apresenta correlação à infecção por hemoplasmas, conforme relatado por Macieira (2008).

Com relação aos fatores associados, a infecção por hemoplasmas em geral (*Mycoplasma* spp.) apresentou associação significativa com o gênero ( $p=0,0053$ ), no qual os gatos machos apresentaram-se duas vezes mais propensos à infecção do que as fêmeas. Tal correlação positiva também foi observada nas infecções por *M. haemofelis* ( $p=0,0006$ ) e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ( $p=0,0065$ ), de modo que somente machos foram positivos para *M. haemofelis* e àqueles positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ apresentaram-se quatro vezes mais expostos à infecção do que as fêmeas. ‘*Candidatus M. turicensis*’, por outro lado, não demonstrou associação do gênero à infecção, embora os machos tenham apresentado duas vezes mais chances de infecção do que as fêmeas. Tais observações podem ser justificadas pelo comportamento dos machos de acesso à rua, principalmente daqueles não castrados, o que confere maior exposição aos artrópodes vetores e brigas resultando em maior probabilidade de infecção (HARRUS; BANETH, 2005). Neste estudo, as variáveis idade e raça não apresentaram correlação positiva às infecções por quaisquer dos agentes. No entanto, foi observada maior frequência de gatos adultos positivos nas infecções por *Mycoplasma* spp., *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’; portanto, estes representam a classe de maior risco de infecção por estes agentes. ‘*Candidatus M. turicensis*’, contraditoriamente, foi observado com maior frequência parasitando filhotes, fato provavelmente relacionado ao reduzido número de animais positivos. Com relação à variável raça, gatos com raça definida apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, principalmente. Hora (2008) não observou correlação estatística entre idade, raça e positividade para os *M. haemofelis*, entretanto, a maior frequência em machos foi observada corroborando aos nossos achados. Santos (2008) evidenciou associação de infecção por hemoplasma a gatos machos e com acesso à rua. Tais dados enfatizam a hipótese de transmissão direta destes agentes entre os gatos. Willi et al. (2006), Santos (2008) e Aragão-de-Sousa et al. (2013) evidenciaram a susceptibilidade de machos à infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Aliando estes achados à detecção prévia de hemoplasmas em saliva, glândulas salivares, mucosa oral e fezes de gatos (DEAN et al., 2008; MUSEUX et al., 2009; TASKER, 2010; BENNETT et al., 2011), é reforçada a proposta de transmissão direto destes agentes por meio de interações agressivas entre gatos machos. Milken et al. (2002), no entanto, não associaram a infecção por hemoplasmas a gatos machos.

Estudos mundiais prévios sugerem que os fatores idade, sexo e raça não são predisponentes à infecção por hemoplasmas (GENTILINI et al., 2009; JUVET et al., 2010; NIBBLETT et al., 2010; ASSARASAKORN et al., 2012; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013). Outros, no entanto, comprovam tais associações (TASKER et al., 2004; MAHER et al., 2010; ROURA et al., 2010; STOJANOVIC; FOLEY, 2011; JENKINS et al., 2013). Embora diversos estudos tenham associado infecções por FIV e/ou FeLV à susceptibilidade à hemoplasmose (HORA, 2008; MACIEIRA, 2008; GENTILINI et al., 2009; ROURA et al., 2010; JENKINS et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013) , tal investigação não foi realizada no presente estudo.

## 5.2 *Cytauxzoon felis*

Estruturas sugestivas de infecção por piroplasmas foram observadas em 1,0% (2/197) das amostras analisadas por citologia de esfregaço sanguíneo. Por outro lado, nenhuma amostra foi positiva para *Cytauxzoon felis* por meio da PCR convencional. De modo semelhante, Maia (2008) observou baixa ocorrência de piroplasmas em gatos do Rio de Janeiro, com apenas um gato positivo (0,48%) por citologia de esfregaço sanguíneo. Em contrapartida, Mendes-de-Almeida et al. (2007) observaram crescente infecção por piroplasmas (15,8% a 48,5%) em gatos errantes assintomáticos do zoológico do Rio de Janeiro. Utilizando esta mesma técnica, Suliman (2009) e Carli et al. (2012) observaram prevalência de 22% e 23,8% em Mosul e Itália, respectivamente. Vale ressaltar a impossibilidade de diferenciação de formas de *C. felis*, *Theileria* spp. e *Babesia* spp. por meio de citologia (MEINKOTH; KOCAN, 2005), de modo que, os estudos de elevada ocorrência do agente em questão, estão, provavelmente superestimando a presença deste piroplasma. Por este fato, denota-se a importância do diagnóstico molecular para este agente. Utilizando a técnica de PCR como diagnóstico, Maia (2008) evidenciou infecção de *C. felis* em 0,48% dos gatos amostrados. Na Itália, Carli et al. (2012) detectaram DNA de *C. felis* em 9,6% e 30,2% dos gatos domiciliados e errantes, respectivamente. Nos EUA, a prevalência observada em gatos errantes foi de 0,3% (HABER et al., 2007) e em gatos domiciliados com suspeita de citauxzoonose houve variação de 1% a 30,3% (REICHARD et al., 2008; BROWN et al., 2010). Extrapolando esta análise para gatos sintomáticos a prevalência de *C. felis* foi de 93,4% a 100% (BIRKENHEUER et al., 2006; BROWN et al., 2009). No presente estudo foi observada coinfeção por piroplasma e hemoplasma em um animal amostrado, conforme observado por Maia et al. (2013).

Até o presente momento, casos esporádicos de citauxzoonose foram reportados no Brasil. A identificação de *C. felis* em felídeos selvagens se iniciou no final da década de 90 e se estende até os dias de hoje (PEIXOTO et al., 1999; SOARES, 1999a; SOARES, 1999b; SOARES et al., 2004; PEIXOTO et al., 2007; ANDRÉ et al., 2009; FILONI et al., 2012). Já em gatos naturalmente infectados, DNA de *Cytauxzoon felis* foi identificado pela primeira vez no Brasil e América do Sul em 2008 (MAIA, 2008). Estudos baseados no diagnóstico molecular de *C. felis* demonstram que a prevalência mundial deste agente varia de 0,3% a 93,4% (HABER et al., 2007; REICHARD et al., 2008; BROWN et al., 2009; BROWN et al., 2010; CARLI et al., 2012). T tamanha discrepância é resultante de características climáticas diversas, da distribuição do carrapato vetor e categoria de população estudada. *C. felis* é endêmico nos EUA, país no qual os carrapatos com competência vetorial são *D. variabilis* e *A. americanum* (BLOUIN et al., 1984; REICHARD et al., 2009). No Brasil, no entanto, os artrópodes vetores são desconhecidos. André et al. (2009) não detectaram DNA de *C. felis* em pulgas que foram encontradas parasitando os felídeos selvagens infectados. Mendes-de-Almeida et al. (2007) evidenciaram carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* parasitando gatos errantes do zoológico do Rio de Janeiro, no entanto, a presença de *C. felis* não foi investigada nestes ixodídeos. A epidemiologia de citauxzoonose no Brasil ainda é incerta. Estudos futuros

devem ser realizados no intuito de definir os possíveis artrópodes vetores, o papel dos felinos domésticos e selvagens na ocorrência da doença, bem como identificar demais rotas de transmissão, caso estas existam.

## 6 CONCLUSÕES

- A micoplasmose felina é frequente na população de gatos do Rio de Janeiro, na qual estão inseridas as seguintes espécies infectantes: *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’;
- ‘*Candidatus M. haemominutum*’ é a espécie de maior ocorrência na população felina da Região Metropolitana do Rio de Janeiro;
- *Mycoplasma haemofelis* é a espécie mais patogênica, cujas alterações hematológicas secundárias à infecção correspondem à anemia predominantemente macrocítica hipocrômica, linfocitose, trombocitopenia e presença de monócitos ativados a macrófagos;
- Gatos machos estão mais propensos à infecção por ‘*Mycoplasma haemofelis*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’;
- Piropasmas, ainda que em baixa ocorrência, circulam na população de gatos amostrados no Rio de Janeiro.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINPET. Divulgação de dados. Disponível em:< abinpet.org.br>. Acesso em 10 de Novembro de 2013.

ALLEMAN, A. R.; PATE, M. G.; HARVEY, J. W.; GASKIN, J.M.; BARBET, A. F. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1474-1479, 1999.

ALMOSNY, N.R.P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. 1 ed. L.F.Livros. p. 135, 2002.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R. Z.; ALLEGRETI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; SILVA, K. F.; NAKAGHI, A. C. H.; DAGNONE, A. S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 234 - 237, 2009.

ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, p.342-347, 2011.

ANDRÉ, M. R. **Deteção sorológica e caracterização molecular de agentes Anaplasmataceae, micoplasmas haemotróficas, piroplasmas e *Hepatozoon* sp. em canídeos e felídeos selvagens mantidos em cativeiro no Brasil**. São Paulo, 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista.

ARAGÃO-DE-SOUSA, S. K. S.; SAMPAIO-JUNIOR, F. D.; SOUSA, L. O.; SANTOS, R. C.; GONÇALVES, E. C.; SCOFIELD, A.; GÓES-CAVALCANTE, G. Diagnóstico molecular da infecção por hemoplasmas em gatos domésticos naturalmente infectados da cidade de Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1116-1120, 2013.

ASSARASAKORN, S.; VEIR, J. K.; HAWLEY, J. R.; BREWER, M. M.; MORRIS, A. K.; HILL, A. E.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Bartonella* species, hemoplasmas, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand. **Research in Veterinary Science**, v.93, p. 1213-1216, 2012.

BALAZS, T.; ROBINSON, J.; GREY, D.; GRICE, H. C. Feline Haemobartonellosis – A Case Report. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 25, p.220-222, 1961.

BARKER, E. M.; HELPS, C. R.; PETERS, I. R.; DARBY, A. C.; RADFORD, A. D.; TASKER, S. Complete Genome Sequence of *Mycoplasma haemofelis*, a Hemotropic Mycoplasma. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 2060-2061, 2011a.

BARKER, E. M.; DARBY, A. C.; HELPS, C. R.; PETERS, I. R.; HEESOM, K. J.; ARTHUR, C. J.; CROSSETT, B.; HUGHES, M. A.; RADFORD, A. D.; TASKER, S. Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. **Veterinary Research**, v. 42, p. 83, 2011b.

BARKER, E.; TASKER, S. Hemoplasmas: Lessons learnt from cats. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, p. 184-192, 2013.

BARFIELD, D.; ADAMANTOS, S. Feline Blood Transfusions: A Pinker Shade of Pale. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 11-23, 2011.

BAUMANN, A.; GUIMARÃES, A. M. S.; SILVA, C. C.; YAMAGUTI, M.; KOZEMJAKIM, D. A.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; TIMENETSKY, J. *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. **Veterinary Clinical Pathology Supplement**, v. 35, p. 370, 2006.

BAUMANN, J.; NOVACCO, M.; RIOND, B.; BORETTI, F. S.; HOFMANN-LEHMANN, R. Establishment and characterization of a low-dose *Mycoplasma haemofelis* infection model. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 410-446, 2013.

BENNETT, A. D.; GUNN-MOORE, D. A.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasmas and *Toxoplasma gondii* in cats in Scotland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 553 -557, 2011.

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 of Veterinary Research**, Chicago, v. 59, p.1215-1220, 1998.

BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. Uma revisão da ocorrência dos hemoplasmas (micoplasmas hemotróficos) no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 18, p. 1-7, 2009.

BIRKENHEUER, A. J.; MARR, H.; ALLEMAN, A. R.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 144– 149, 2006.

BIRKENHEUER, A. J.; MARR, H. S.; WARREN, C.; ACTON, A. E.; MUCKER, E. M.; HUMPHREYS, J. G.; TUCKER, M. D. *Cytauxzoon felis* infections are present in bobcats (*Lynx rufus*) in a region where cytauxzoonosis is not recognized in domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 153, p. 126-130, 2008.

BLOUIN, E.F.; KOCAN, A.A.; GLENN, B.L.; KOCAN, K.M.; HAIR, J.A. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, p. 241-242, 1984.

BORTOLI, C. P.; ANDRÉ, M. R.; SEKI, M. C.; PINTO, A. A.; MACHADO, S. T. Z.; MACHADO, Z. M. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 219-223, 2012.

BOSNIC, D.; BAREŠIĆ, M.; ANIĆ, B.; ŠENTIĆ, M.; ČEROVEC, M.; MAYER, M.; CIKES, N. Rare zoonosis (hemotrophic mycoplasma infection) in a newly diagnosed



systemic lupus erythematosus patient followed by a *Nocardia asteroides* pneumonia. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 14, p. 92–95, 2010.

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

BRAGA, M. S. C. O.; ANDRÉ, M. R.; FRESCHI, C. R.; TEIXEIRA, M. C. A.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of hemoplasma infection among cats from São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 569-575, 2012.

BROWN, H. M.; LATIMER, K. S.; ERIKSON, L. E.; CASHWELL, M. E.; BRITT, J. O.; PETERSON, D. S. Detection of persistent *Cytauxzoon felis* infection by polymerase chain reaction in three asymptomatic domestic cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 485–488, 2008.

BROWN, H. M.; BERGHAUS, R. D.; LATIMER, K. S.; BRITT, J. O.; RAKICH, P. M.; PETERSON, D. S. Genetic variability of *Cytauxzoon felis* from 88 infected domestic cats in Arkansas and Georgia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 59-63, 2009.

BROWN, H. M.; LOCKHART, J. M.; LATIMER, K. S.; PETERSON, D. S. Identification and genetic characterization of *Cytauxzoon felis* in asymptomatic domestic cats and bobcats. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 311–316, 2010.

CARLI, E.; TROTTA, M.; CHINELLI, R.; DRIGO, M.; SINIGOI, L.; TOSOLINI, P.; FURLANELLO, A.; CALDIN, M.; SOLANO-GALLEGO, L. *Cytauxzoon* sp. Infection in the first endemic focus described in domestic cats in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 343-352, 2012.

CARNEY, H. C.; ENGLAND, J. J. Feline hemobartonellosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 23, p. 79-90, 1993.

CLARK, R. *Eperythrozoon felis* (sp. Nov) in a cat. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v.13, p 15–16, 1942.

CLARK, K. G. A basophilic micro-organism infecting human red cells. **British Journal of Haematology**, v. 29,p. 301–304, 1975.

COHN, L. A.; BIRKENHEUER, A. J.; BRUNKER, J. D.; RATCLIFF, E. R.; CRAIG, A.W. Efficacy of atovaquone and azithromycin or imidocarb dipropionate in cats with acute cytauxzoonosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 55-60, 2011.

COWELL, R. L.; FOX, J. C.; PANCIERA, R. J.; TYLER, R. D. Detection of Anticytauxzoon Antibodies in Cats Infected with a *Cytauxzoon* Organism from Bobcats. **Veterinary Parasitology**, v. 28, p. 43-52, 1988.

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.

CRYSTAL, M. A. Cytauxzoonosis. In: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M. A.; GRACE, S. F.; TILLEY, L. P. **The Feline Patient**. 3ed. Blackwell Publishing, p. 61-62, 2006.

DEAN, R.S.; HELPS, C.R.; JONES, T.J.G.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in the saliva and salivary glands of hemoplasma-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 413-417, 2008.

DUARTE, M. I.; OLIVEIRA, M. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARIANO, O. N.; TAKAKURA, C. F.; PAGLIARI, C.; CORBETT, C. E. *Haemobartonella*-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, p. 976-977, 1992.

FERRIS, D. H. A progress report on the status of a new disease of american cats: Cytauxzoonosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 1, p. 269-276, 1979.

FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; WILLI, B.; MELI, M. L.; RAMIRO CORRÊA, S. H.; MARQUES, M. C.; ADANIA, C. H.; SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; NETO, J. S. F.; DURIGON, E. L.; CARVALHO, V. M.; COUTINHO, S. D.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropic and exotic felids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 166-173, 2012.

FLINT, J. C.; MOSS, L. C. Infectious anemia in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 122, p. 45-48, 1953.

FLINT, J. C.; MCKELVIE, D. H. Feline Infectious Anaemia -Diagnosis and Treatment. In **XCII Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association**, p. 240-242, 1955.

FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 59, p. 1581-1588, 1998.

FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N. C. '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 815-817, 2001.

FYUMAGWA, R. D.; SIMMLER, P.; WILLI, B.; MELI, M. L.; SUTTLER, A.; HOARE, R.; DASEN, G.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in *Rhipicephalus sanguineus* tick species collected on lions (*Panthera leo*) from Ngorongoro Crater, Tanzania. **South African Journal of Wildlife Research**, v. 38, p. 117-122, 2008.

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**, v. 8, p. 321-326, 2006.

GARNER, M. M.; LUNG, N. P.; CITINO, S.; GREINER, E. C.; HARVEY, J. W.; HOMER, B. L. Fatal Cytauxzoonosis in a Captive-reared White Tiger (*Panthera tigris*). **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 82-86, 1996.

GENTILINI, F.; NOVACCO, M.; TURBA, M. E.; WILLI, B.; BACCI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R. Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infectious in Northern Italy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 277-285, 2009.

GEORGES, K.; EZEOKOLI, C.; AUGUSTE, T.; SEEPERSAD, N.; POTTINGER, A.; SPARAGANO, O.; TASKER, S. A comparison of real-time PCR and reverse line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 8, p. 103, 2012.

GERMAN, A. J.; CANNON, M. J.; DYE, C.; BOOTH, M. J.; PEARSON, G. R.; REAY, C. A.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Oesophageal strictures in a cats associated with doxycycline therapy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 7, p. 33-41, 2005.

GLENN, B. L.; ROLLEY, R. E.; KOCAN, A. A. *Cytauxzoon*-like piroplasms in erythrocytes of wild-trapped bobcats in Oklahoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, p. 1251-1253, 1982.

GLENN, B. L.; KOCAN, A. A.; BLOUIN, E. F. Cytauxzoonosis in bobcats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 183, p. 1155-1158, 1983.

GREENE, C. E.; MEINKOTH, J. H.; KOCAN, A. A. Cytauxzoonosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and the cat**. 3ed. Saunders Elsevier, p. 722-733, 2006.

GUIMARÃES, A. M. S.; JAVOROUSKI, M. B.; LACERDA, O.; BALBINOTTI, B.; QUEIROZ, L. G. P. B.; TIMENETSKI, J.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Molecular detection of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a lion (*Panthera leo*) from a Brazilian zoological garden. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 195-196, 2007.

HABER, M. D.; TUCKER, M. D.; MARR, H. S.; LEVY, J. K.; BURGESS, J.; LAPPIN, M. R.; BIRKENHEUER, A. J. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 316-320, 2007.

HAGIWARA, M. K. Anemia in cats: Is it *Mycoplasma*? **XXXIV World Small Animal Veterinary Congress**, São Paulo, Brazil, 2009.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1309-1318, 2005.

HARVEY, J. W.; GASKIN, J. M. Experimental feline haemobartonellosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 13, p. 28-38, 1977.

HARVEY, J. W. Hemotropic mycoplasmosis (hemobartonellosis). In: GREENE, C. E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3ed. Saunders Elsevier, p. 252-260, 2006.

HOLMAN, P. J.; SNOWDER, K. F. Canine Hepatozoonosis and Babesiosis, and feline Ctauxzoonosis. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 39, p. 1035-1053, 2009.

HOOVER, J. P.; WALKER, D. B.; HEDGES, J. D. Cytauxzoonosis in cats: eight cases (1985-1992). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 455-460, 1994.

HORA, A. S. **Associação da infecção por *Mycoplasma haemofelis* e os vírus da leucemia e imunodeficiência em felinos anêmicos**. São Paulo, 2008. 115f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

HORNOK, S.; MELI, M. L.; PERRETEN, A.; FARKAS, R.; WILLI, B.; BEUGNET, F.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 98–104, 2010.

HU, Z.; YIN, J.; SHEN, K.; KANG, W.; CHEN, Q. Outbreaks of Hemotropic Mycoplasma Infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 1139-1140, 2009.

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, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, p. 417, 1993.

JENKINS, K. S.; DITTMER, K. E.; MARSHALL, J. C.; TASKER, S. Prevalence and risk factors analysis of feline haemoplasma infection in New Zealand domestic cats using a real-time PCR assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, p. 1063-1069, 2013.

JUVET, F.; LAPPIN, M. R.; BRENNAN, S.; MOONEY, C. T. Prevalence of selected infectious agents in cats in Ireland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 476-482, 2010.

KETZ-RILEY, C. J.; REICHARD, M. V.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HOOVER, J. P.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A. An intraerythrocytic small piroplasm in wild-caught Palla’s cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, p. 424-430, 2003.

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. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, p. 749-752, 2004.

KIER, A. B.; WAGNER, J. E.; KINDEN, D. A. The Pathology of Experimental Cytauxzoonosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 97, p. 415-432, 1987.

KOCAN, A. A.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; MUKOLWE, S. W. A Redescription of Schizogony of *Cytauxzoon felis* in the Domestic Cat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 653, p. 161-167, 1992.

KRIMER, P. M. Reference Intervals. In: LATIMER, K. S. **Duncan & Prasses: Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology**. 5ed. Blackwell Publishing, p. 375, 2011.

LAPPIN, M.R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M.M.; JENSEN, W.A. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 85-90, 2006.

LOBETTI, R. G.; TASKER, S. Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v. 75, p. 94-99, 2004.

LOBETTI, R.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Toxoplasma gondii*, *Bartonella* species, and haemoplasma infection in cats in South Africa. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, p. 857-862, 2012.

LUACES, I.; AGUIRRE, E.; GARCIA-MONTIJANO, M.; VELARDE, J.; TESOURO, M.A.; SÁNCHEZ, C.; GALKA, M.; FERNÁNDEZ, P.; SAINZ, A. First report of an intra-erythrocytic small piroplasm in wild Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, p. 810-815, 2005.

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R. C. A. A.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MCLANE, H.L.; DAGGY, J.K. ; MESSICK, J.B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro- **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 120-129, 2008.

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R. C. A. A.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MESSICK, J. B. Uso da técnica de Southern Blot/Hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 1-6, 2009.

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum' in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 103, 2013.

MAHER, I. E.; TASKER, S.; POLIZOPOULOU, Z.; DASOPOULOU, A.; EGAN, K.; HELPS, C. R.; PAPASOULIOTIS, K. Polymerase chain reaction survey of feline haemoplasma infectious in Greece. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 601-605, 2010.

MAIA, L. M. P. **Avaliação da ocorrência de piroplasmas e hemoplasmas em gatos domésticos no estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense.

MAIA, L. M. P.; CERQUEIRA, A. M. F.; MACIEIRA, D. B.; SOUZA, A. M.; MOREIRA, N. S.; SILVA, A. V.; MESSICK, J. B.; FERREIRA, R. F.; ALMOSNY, N. R. P. *Cytauxzoon felis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, p.289-192, 2013.

MAIN, A. J. Distribution, seasonal abundance and host preference of fleas in New England (Siphonaptera). **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 72, p. 73-89, 1970.

MARTIN, H.; BROCKLESBY, D. W. A new parasite of the eland. **Veterinary Record**, v. 72, p. 331-332, 1960.

MARTÍNEZ-DÍAZ, V. L.; SILVESTRE-FERREIRA, A. C.; VILHENA, H.; PASTOR, J.; FRANCINO, O.; ALTET, L. Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, p. 879-885, 2013.

MASSARD, C. L.; FREIRE, N. M. S.; FLAUSINO, W. Sobre o encontro de *Haemobartonella felis* Flint & Mckelvie, 1955 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em *Felis catus domesticus* L. no continente Sul-americano, Brasil. **Anais do XC Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, p. 161, 1978.

MCCULLY, R. M.; KEEP, M. E.; BASSON, P.A. Cytauxzoonosis in a giraffe *Giraffa camelopardalis* (Linnaeus, 1758) in Zululand. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 37, p.7-9, 1970.

MCGROTTY, Y. L.; KNOTTENBELT, C. M. Oesophageal strictures in a cat due to oral administration of tetracyclines. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 221-223, 2002 (Abstract).

MEINKOTH, J.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MURPHY, G.; FOX, J. C.; WOODS, J. P. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997–1998). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 521–525, 2000.

MEINKOTH, J. H. *Cytauxzoon felis*. In: LAPPIN, M. R., **Feline Internal Medicine Secrets**. 2ed. Philadelphia: Hanley & Belfus INC, p. 383-387, 2001.

MEINKOTH, J. H.; KOCAN, A. A. Feline cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35, p.89–101, 2005.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; LABARTHE, N.; GUERRERO, J.; FARIA, M.C.; BRANCO, A.S.; PEREIRA, C.D.; BARREIRA, J.D.; PEREIRA, M.J. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 9-15, 2007.

- MENDES-DE-ALMEIDA, F.; CRISSIUMA, A. L.; GERSHONY, L. C.; WILLI, L. M. V.; PAIVA, J. P.; GUERRERO, J.; LABARTHE, N. Characterization of ectoparasites in an urban cat (*Felis catus* Linnaeus, 1758) populations of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, p. 1431-1435, 2011.
- MESSICK, J.B. New perspectives about Hemotropic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 1453-65, 2003.
- MESSICK, J.B.; SANTOS, A.P. Identification, Bioinformatics Analyses, and Expression of Immunoreactive Antigens of *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 1275-1281, 2011.
- MILKEN, V. M. F.; CABRAL, D. D.; SANTOS, R. T. G.; BARBOSA, S. P. F. Prevalência de *Haemobartonella felis* em gatos errantes no município de Uberlândia, Minas Gerais. **Biotemas**, v. 15, p. 79-84, 2002.
- MONITORAR-RIO. Caracterização meteorológica. In: Estação de monitoramento da qualidade do ar. **MonitorAr-Rio 2011-2012**. Rio de Janeiro, 2012, cap.4, p.54.
- MORAIS, H. A.; GUIMARAES, 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**, v. 9, p. 518-520, 2007.
- MUSEUX, K.; BORETTI, F.S.; WILLI, B., RIOND; B., HOELZLE; K., HOELZLE, L.E.; WITTENBRINK, M.M.; TASKER, S.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. In vivo transmission studies of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ in the domestic cat. **Veterinary Research**, v. 40, p. 45, 2009.
- NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 891–899, 2001.
- NEITZ, W.O. Theileriosis, gonderiosis, and cytauxzoonosis. A Review. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 27, p.275-430, 1957.
- NEITZ, W. O.; THOMAS, A. D. *Cytauxzoon sylvicaprae* gen. nov., spec. nov., Protozoan responsible for a hitherto undescribed disease in the duiker *Sylvicapra grimmia* (Lenne). **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 23, p. 63-76, 1948.
- NIBBLETT, B. M. D.; WALDNER, C.; TAYLOR, S. M.; JACKSON, M. L.; KNORR, L. M.; SNEAD, E. C. Hemotropic Mycoplasma prevalence in shelter and client-owned cats in Saskatchewan and a comparison of polymerase chain reaction (PCR) – Results from two independent laboratories. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 91-96, 2010.

- NIETFELD, J. C.; POLLOCK, C. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, p. 607–610, 2002.
- NIR-PAZ, R.; ISRAEL, A.; HONIGMAN, A.; KAHANE, I. *Mycoplasma* regulate HIV-LTR-dependent gene expression. **FEMS Microbiology letters**, v. 128, p.63-68, 1995.
- PEIXOTO, P. V.; SOARES, C. O.; SANTIAGO, C. D.; BARROS, S. S.; BARROS, C. L. S.; CUNHA, B. M. Citauxzoonose fatal em leões (*Panthera leo*) no Brasil. In: **Anais XXVI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 1999.
- PEIXOTO, P.V.; SOARES, C.O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C.D.; FRANÇA, T.N.; BARROS, S.S. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 383-387, 2007.
- 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**, v. 126, p. 142-150, 2008.
- PUNTARIC, V.; BORCIC, D.; VUKELIC, D.; JEREN, T.; BUREK, V.; WIKERHAUSER, T.; RICHTER, B. Eperythrozoonosis in man. **Lancet**, v. 2, p. 868–869, 1986.
- REICHARD, M. V.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; MEINKOTH, J. H.; HOOVER, J. P.; KOCAN, A. A. A new species of *Cytauxzoon* from pallas' cats caught in Mongolia and comments on the systematics and taxonomy of piroplasmids. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 420-426, 2005.
- REICHARD, M. V.; BAUM, K. A.; CADENHEAD, S. C.; SNIDER, T. A. Temporal occurrence and environmental risk factors associated with cytauxzoonosis in domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 314–320, 2008.
- REICHARD, M. V.; MEINKOTH, J. H.; EDWARDS, A. D.; SNIDER, T. A.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; LITTLE, S. E. Transmission of *Cytauxzoon felis* to a domestic cat by *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 110-115, 2009.
- REICHARD, M.V.; EDWARDS, A.C.; MEINKOTH, J.H., SNIDER, T.A.; MEINKOTH, K.R.; HEINZ, R.E.; LITTLE, S.E. Confirmation of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) as a vector for *Cytauxzoon felis* (Piroplasmida: Theileriidae) to domestic cats. **Journal of Medical Entomology**, v. 47,p. 890-896, 2010.
- RELFORD, R. L.; DIMARCO, A. New diagnostic tools for infectious disease. In: AUGUST, R. J. **Consultation in feline internal medicine**. 5ed. Elsevier Saunders, p. 45-49, 2006.
- RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and Comparison of 16S rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 823-829, 1997.



RISTIC, M.; KREIER, J. P. Anaplasmataceae. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, p. 719-729, 1984.

ROTSTEIN, D.S.; TAYLOR, S.K.; HARVEY, J.W.; BEAN, J. Haematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, p. 613-617, 1999.

ROURA, X.; PETERS, I. R.; ALTET, L.; TABAR, M. D.; BARKER, E. N.; PLANELLAS, M.; HELPS, C. R.; FRANCINO, O.; SHAW, S. E.; TASKER, S. Prevalence of hemotropic micoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 270-274, 2010.

RUSSELL, K. E. Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. 6ed. Blackwell Publishing, p.576-585, 2010.

SANTOS, A. P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre, RS, Tese (Doutorado em Ciências veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

SANTOS, A. P.; DOS SANTOS, R. P.; BIONDO, A.W.; DORA, J. M.; GOLDANI, L. Z.; DE OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A. M. S.; TIMENETSKY, J.; DE MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1922-1924, 2008.

SANTOS, A. P.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; OLIVEIRA, S. T.; PEDRALLI, V.; LASTA, C. S.; LACERDA, L. A.; ESTEVES, V. S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; WILLI, B.; GONZALEZ, F. H. D. Design, optimization and application of a conventional PCR assay with an internal control of *Candidatus Mycoplasma turicensis* 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, p. 443-452, 2009.

SCOFIELD, A. A. **Análises genotípica e filogenética do gene 18S rRNA de isolados brasileiros de *Cytauxzoon felis* (Apicomplexa: Theileriidae)**. Rio de Janeiro, 2006. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SEAMER, J.; DOUGLAS, S. W. A new blood parasite of British cats. **Veterinary Record**, v. 71, p. 405-408, 1959.

SHAW, S. E.; KENNY, M. J. TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. **Veterinary Microbiology**, v. 102, p. 183-188, 2004.

SHINDEL, N.; DARDIRI, A. H.; FERRIS, D. H. An Indirect Fluorescent Antibody Test for the detection of *Cytauxzoon*-like organisms in experimentally infected cats. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, p. 460-465, 1978.

SIMPSON, C. F.; HARVEY, J. W.; LAWMAN, M. P. J.; MURRAY, J.; KOCAN, A. A.; CARLISLE, J. W. Ultrastructure of schizonts in the liver of cats with experimentally induced cytauxzoonosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, p. 384-390, 1985.

SOARES, C. O.; PEIXOTO, P. V.; SCOFIELD, A. FONSECA, A. H.; MASSARD, C. L.; SANTIAGO, C. D. *Cytauxzoon* sp. Neitz & Thomas, 1948 (Apicomplexa: Theileriidae) em *Panthera onca*. In: **Anais XI Seminário Brasileiro de Parasitologia**, Salvador, p. 235, 1999a.

SOARES, C. O.; PEIXOTO, P. V.; SCOFIELD, A. FONSECA, A. H.; SANTIAGO, C. D. *Cytauxzoon* sp. Neitz & Thomas, 1948 (Apicomplexa: Theileriidae) em *Felis tigrina* (*Leopardus tigrinus*) no Brasil. In: **Anais XXVI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Campo Grande, 1999b.

SOARES, C. O. Cytauxzoonose felina é diagnosticada e isolada pela primeira vez na América Latina. **Revista Clínica Veterinária**, v. 32, p. 56-58, 2001.

SOARES, J. R.; SOUZA, A. I.; NETTO, N. T.; SCHEIDE, R.; SCOFIELD, A. *Cytauxzoon felis*-like in the Mountain Lion (*Puma concolor*): A Case Report. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 3, p. 820-823, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. Infectious Disease: Hemotropic mycoplasmosis. In: **Handbook of Small Animal Practice**, 5ed. Saunders Elsevier, p. 1126-1127, 2008.

STOJANOVIC, V.; FOLEY, P. Infectious disease prevalence in a feral cat population on Prince Edward Island, Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, p. 979-982, 2011.

SULIMAN, E.G. Detection the infection with *Babesia* spp. *Cytauxzoon felis* and *Haemobartonella felis* in stray cats in Mosul. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 23, p. 49-55, 2009.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Veterinary Clinical of Small Animals**, v. 33, p. 773 – 789, 2003.

SYKES, J. Feline hemotropic micoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p. 62-69, 2010.

TASKER, S.; LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 4, p. 3-11, 2002.

TASKER, S.; BRADDOCK, J.A.; BARAL, R., HELPS, C.R.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; MALIK, R. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, p. 345-354, 2004.

TASKER, S. Feline Infectious Anaemia. In: CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Feline Medicine and Therapeutics**, 3ed. Blackwell Publishing. p. 669-678, 2004.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In Practice**, v. 28, p. 136-141, 2006.

TASKER, S.; LAPPIN, M. R. Update on hemoplasmosis. In: AUGUST, R. J. **Consultation in feline internal medicine**, 5ed. Elsevier Saunders, p. 605-610, 2006.

TASKER, S.; PETERS, I. R.; DAY, M. J.; WILLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; GRUFFYDD-JONES, T.; HELPS, C. R. Distribution of *Mycoplasma haemofelis* in blood and tissues following experimental infection. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, p. 334-340, 2009a.

TASKER, S.; PETERS, I. R.; PAPASOULIOTIS, K.; CUE, S. M.; WILLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; KNOWLES, T. G.; DAY, M. J.; HELPS, C. R. Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: Copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. **Veterinary Microbiology**, v. 139, p. 323-332, 2009b.

TASKER, S. Hemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, p.369-381, 2010.

TASKER, S.; PETERS, I. R.; MUMFORD, A. D.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, S.; PRETORIUS, A. M.; BIRTLES, R. J.; HELPS, C. R.; NEIMARK, H. Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1285-1292, 2010.

TOLEDO-PINTO, E. P.; SALVARANI, R. S.; SANTOS, G. J.; MOÇO, H. F. Hemobartonelose em gatos: Revisão de Literatura. In: **Anais da 3ª Semana de Patologia Veterinária**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2005.

TVEDTEN, H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. 6ed. Blackwell Publishing, p.152-161, 2010.

UILENBERG, G.; FRANSSSEN, F. F. J.; PERIÉ, N. M. Relationships between *Cytauxzoon felis* and African Piroplasmids. **Veterinary Parasitology**, v. 26, p. 21-28, 1987.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Veterinary Parasitology**. 2ed. Black Well Science, p. 211, 2003.

VALENCIANO, A. C.; DECKER, L. S.; COWELL, R. L. Interpretation of Feline Leukocytes Responses. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. 6ed. Blackwell Publishing, p. 335-344, 2010

VEIR, J. K.; LAPPIN, M. R. Molecular Diagnostic Assays for Infectious Diseases in Cats. **Veterinary Clinical of Small Animals**, v. 40, p. 1189-1200, 2010.

VILLIERS, E. Disorders of erythrocytes. In: VILLIERS, E.; BLACKWOOD, L. **Manual of canine and feline clinical pathology**, 2ed. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA), p. 44-45, 2005.

WAGNER, J. E. A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 168: p. 585-588, 1976.

WAGNER, J. E.; FERRIS, D. H.; KIER, A. B.; WIGHTMAN, S. R.; MARING, E.; MOREHOUSE, L. G.; HANSEN, R. D. Experimentally induced cytauxzoonosis-like disease in domestic cats. **Veterinary Parasitology**, v. 6, p. 305-311, 1980.

WARDROP, K. J. Coombs' Testing and Its Diagnostic Significance in Dogs and Cats. **Veterinary Clinical of Small Animals**, v. 42, p. 43-51, 2012.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M. T.; 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, p. 2581–2585, 2005.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 961-969, 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**, v.125, p. 197-209, 2007.

WILLI, B.; MUSEUX, K.; NOVACCO, M.; SCHRANER, E. M.; WILD, P.; GROEBEL, K.; ZIEGLER, U.; WOLF-JÄCKEL, G. A.; KESSLER, Y.; GERET, C.; TASKER, S. LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First morphological characterization of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' using electron microscopy. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 367–373, 2011.

WILSON, D.E.; BARSCH, R. C.; BIGALKE, R. D.; THOMAS, S. E. Observations on mortality rates and disease in roan and sable antelope on nature reserves in the Transvaal. **South African Wildlife Management Association**, v. 4, p. 203-206, 1974.

WOLF-JÄCKEL, G. A.; JÄCKEL, C.; MUSEUX, K.; HOELZLE, K.; TASKER, S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, Characterization, and Application of a Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotropic Mycoplasma Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, p. 1917-1925, 2010.

WOLF-JÄCKEL, G. A.; CATTORI, V.; GERET, C. P.; NOVACCO, M.; MELI, M. L.; RIOND, B.; BORETTI, F. S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Quantification of the humoral immune response and hemoplasma blood and tissue loads in cats coinfecting with 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and feline leukemia virus. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, p. 74-80, 2012.

WOODS, J.E.; BREWER, M.M.; HAWLEY, J.R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M.R. Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 1008–1012, 2005.

YANG, D.; TAI, X.; QIU, Y.; YUN, S. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiology and Infection**, v. 125, p. 421–426, 2000.

YUAN, C.L.; LIANG, A.B.; YANG, Z.B.; ZHU, J.G.; CUI, L.; YU, F.; ZHU, N.Y.; YANG, X.W.; HUA, X.G. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine

and swinr-farm workers in Shangai, China. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, p.890-894, 2009.

ZINKL, J. G.; MCDONALD, S. E.; KIER, A. B.; CIPPA, S. J.; SMALL, P. Cytauxzoon-like organisms in erythrocytes of two cheetahs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.79, p.1261-1262, 1981.