

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA**

**ALINE DA ROSA MACIEL**

**INFECÇÃO POR *Mycoplasma haemofelis* EM GATOS DO PLANALTO  
CATARINENSE: PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS, ALTERAÇÕES  
CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS**

**LAGES**

**2021**

**ALINE DA ROSA MACIEL**

**INFECÇÃO POR *Mycoplasma haemofelis* EM GATOS DO PLANALTO  
CATARINENSE: PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS, ALTERAÇÕES  
CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Assis Casagrande

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto

LAGES

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Maciel, Aline da Rosa

Infecção por Mycoplasma haemofelis em gatos do planalto catarinense: : prevalência e identificação dos fatores associados, alterações clínicas e hematológicas / Aline da Rosa Maciel. -- 2021. 56 p.

Orientadora: Renata Assis Casagrande

Coorientador: Luiz Cláudio Miletto

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2021.

I. hemoplasma. 2. diagnóstico. 3. biologia molecular. I. Casagrande, Renata Assis. II. Miletto, Luiz Cláudio. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

**ALINE DA ROSA MACIEL**

**INFECÇÃO POR *Mycoplasma haemofelis* EM GATOS DO PLANALTO  
CATARINENSE: PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS, ALTERAÇÕES  
CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Renata Assis Casagrande

Orientadora

Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

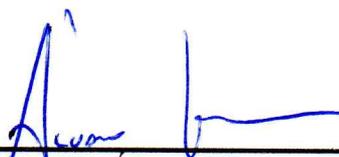
Membros:



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Mere Erika Saito

Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC



---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Alvaro Menin

Coordenadoria especial de Biociências e Saúde Única – UFSC/Curitiba-SC

Lages, 23 de julho de 2021.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora professora Dra. Renata Assis Casagrande por toda a confiança em mim depositada, paciência e ensinamentos que levarei deste mestrado para minha vida;

Ao meu co-orientador professor Dr. Luiz Claudio Milette e alunos por todo o auxílio que tão gentilmente recebi;

Ao professor Dr. Ubirajara Maciel da Costa e equipe do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) pelo apoio e contribuição para a conclusão do projeto;

À minha família e amigos, cada um à sua forma colaborou para a conclusão desta jornada me trazendo sempre carinho, força e motivação;

A todos meus colegas integrantes do grupo de patologia animal do CAV/UEDESC que em algum momento colaboraram para meu aprendizado, em especial aos agora meus amigos Giovana, Thierry e Amanda, vocês tornaram este processo mais leve e enriquecedor;

À CAPES, que por meio de bolsa de estudos possibilitou minha total dedicação ao Curso de pós-graduação e execução deste trabalho;

Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal do CAV/UEDESC, por possibilitar a realização desta importante etapa da minha vida profissional.



## RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos, são bactérias do gênero *Mycoplasma*, que se aderem à superfície de eritrócitos, sem levar ao rompimento da membrana. Das três espécies descritas infectando gatos, *Mycoplasma haemofelis* é o mais patogênico. Apesar de já descrito em diversos países, incluindo o Brasil, não há dados sobre a prevalência de *Mycoplasma haemofelis* no estado de Santa Catarina. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência de *Mycoplasma haemofelis* em gatos na região do planalto de Santa Catarina, Brasil, bem como, avaliar as alterações clínicas, hematológicas e os possíveis fatores que expõem os felinos à infecção. Foram analisadas 274 amostras de sangue de gatos domiciliados e semi-domiciliados, provenientes da rotina clínica do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (HCV-UDESC) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica o gene da região 16S rRNA. Foram compilados dados do hemograma, alterações clínicas e epidemiológicas apresentadas no momento do diagnóstico, submetidas à análise estatística descritiva, teste de medianas e análise de regressão logística. A amostra original foi dividida em Grupo 1, composto pelos animais positivos para *M. haemofelis*, Grupo 2 coinfectados por *M. haemofelis* e FeLV e Grupo 3 negativos para *M. haemofelis* e considerados saudáveis (grupo controle). A prevalência obtida para *M. haemofelis* foi 6,57% (18/274) (IC de 95% 3,63-9,49%). Entre os animais positivos, 33,33% (6/18) tinham coinfeção por FeLV, 5,55% (1/18) por FIV e 5,55% (1/18) por FIV e FeLV. Gatos machos apresentaram sete vezes mais chance de se infectarem por *M. haemofelis* ( $p < 0,001$ ; OR: 7,07). Quando a idade o Grupo 1, com mediana de 4,25 anos, apresentou animais significativamente mais velhos que o Grupo controle ( $p = 0,042$ ). Apenas três animais apresentaram alterações clínicas relacionadas ao *M. haemofelis* que foi palidez de mucosa em decorrência de anemia. Grupo 1 obteve diferença estatística quando comparado ao controle nos valores de hemoglobina, volume globular (VG) e neutrófilos bastonetes. Conclui-se que a infecção por *M. haemofelis* está presente na região do planalto de Santa Catarina, Brasil, com maior prevalência de machos, adultos. A maioria dos gatos infectados não apresentaram alterações clínicas, sugerindo que a positividade encontrada foi composta principalmente por animais portadores.

**Palavras-chave:** hemoplasma, medicina felina, diagnóstico, biologia molecular.

## ABSTRACT

Hemotropic Mycoplasmas are bacteria of the *Mycoplasma* genus, which adhere to the surface of erythrocytes, without breaking the membrane. Of the three species described infecting domestic cats, *Mycoplasma haemofelis* is the most pathogenic. Although already described in several countries, including Brazil, there are no data on the prevalence of *Mycoplasma haemofelis* in State of Santa Catarina. The aim of this study was to determine the prevalence of *Mycoplasma haemofelis* in cats in the plateau region of Santa Catarina, Brazil, as well as to assess clinical and hematological changes and possible factors that expose cats to infection. A total of 247 blood samples from domestic and semidomestic cats from the clinical routine of the veterinary Hospital of the Santa Catarina State University (HCV-UDESC) were analyzed using the polymerase chain reaction (PCR) that amplifies the gene of the 16S rRNA region. Blood count data, clinical and epidemiological changes presented at the time of diagnosis were compiled, submitted to descriptive statistical analysis, median test and logistic regression analysis. The original sample was divided into Group 1, composed of animals positive for *Mycoplasma haemofelis*, Group 2 co-infected with *Mycoplasma haemofelis* and FeLV, and Group 3 negative for *Mycoplasma haemofelis* and considered healthy (control Group). The prevalence obtained for *Mycoplasma haemofelis* was 6.57% (18/274) (CI: 95% 3.63-9.49%). Among the positive animals, 33.33% (6/18) had coinfection by FeLV, 5.55% (1/18) by FIV and 5.55% (1/18) by FIV and FeLV. Male cats were seven times more likely to be infected with *Mycoplasma haemofelis* ( $p < 0.001$ ; OR: 7.07). As about age, Group 1 with median 4.25 years, presented animals significantly older than the control Group ( $p = 0.042$ ). Only three animals showed clinical changes related to *Mycoplasma haemofelis*, which was pale mucosa due to anemia. Group 1 had statistical difference when compared to the control in values of hemoglobin, hematocrit and neutrophil rods. It is concluded that *Mycoplasma haemofelis* infection is present in the plateau region of Santa Catarina, Brazil with a higher prevalence of adult males. Most infected cats did not show clinical changes suggesting that positivity found was mainly composed of carrier animals.

**Keywords:** hemoplasma, feline medicine, diagnosis, molecular biology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fotomicrografia eletrônica de *Mycoplasma haemofelis* em eritrócito (a,b), observa-se organismos de formato discoide medindo cerca de 0,5 $\mu$ m de diâmetro e, fissão binária na superfície da célula (seta). Barras representam 1 $\mu$ m. .... 18
- Figura 2 - Fotomicrografia eletrônica de eritrócitos infectados por *Mycoplasma haemofelis* 10 dias após a infecção (a, b). Observa-se estruturas aderidas à superfície do eritrócito, mas que não invadem a célula. Barras representam 0,5 $\mu$ m..... 19
- Figura 3 - Estudos com resultados de prevalências de *Mycoplasma haemofelis* realizados no Brasil. .... 23

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Análise descritiva da amostra (n=274) de acordo com variáveis epidemiológicas e a positividade para *Mycoplasma haemofelis* em uma população hospitalar de gatos no Planalto de Santa Catarina, Brasil. .... 37
- Tabela 2 - Distribuição da idade dos gatos (n=274) de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil, considerando o status de infecção para *Mycoplasma haemofelis*. 38
- Tabela 3 - Razão de chance e valores de p estimados pela análise de regressão logística para fatores associados a positividade para *Mycoplasma haemofelis* em uma população hospitalar de gatos do Planalto de Santa Catarina, Brasil. .... 38
- Tabela 4 - Hemograma dos gatos infectados por *Mycoplasma haemofelis* (Grupo 1), *Mycoplasma haemofelis* e FeLV (Grupo 2) e negativos saudáveis (controle) oriundos de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina. .... 40
- Tabela 5 - Frequências das alterações encontradas para cada variável avaliada no hemograma dos gatos positivos para *Mycoplasma haemofelis* (Grupo 1), positivos para *Mycoplasma haemofelis* e FeLV (Grupo 2) e animais saudáveis (Controle). .... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABINPET	Associação brasileira da indústria de produtos para animais de estimação
AIF	Anemia infecciosa felina
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHGM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IFA	I imunofluorescência indireta
IHQ	Imuno-histoquímica
IC	Intervalo de confiança
LAPA	Laboratório de Patologia Animal
MHF	Micoplasmose hemotrópica felina
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de possibilidade)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIF	Peritonite infecciosa felina
qPCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SRD	Sem raça definida
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VG	Volume globular
VGM	Volume globular médio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1	<i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	18
3.1.1	Etiologia.....	18
3.1.2	Epidemiologia e aspectos clínicos da micoplasmose .....	19
3.2	ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE MICOPLASMOSE FELINA.....	21
3.3	ASSOCIAÇÃO DO <i>Mycoplasma haemofelis</i> COM INFECÇÃO POR FeLV e FIV 24	
3.4	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE <i>Mycoplasma</i> spp. ....	25
3.5	TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA MICOPLASMOSE FELINA .....	26
<b>4</b>	<b>INFECÇÃO POR <i>Mycoplasma haemofelis</i> EM GATOS DO PLANALTO CATARINENSE: PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS, ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS</b> .....	<b>29</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	31
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.2.1	População estudada.....	32
4.2.2	Colheita dos dados epidemiológicos, clínicos e hematológicos.....	33
4.2.3	Obtenção e processamento das amostras de sangue .....	34
4.2.4	Extração de DNA.....	34
4.2.5	Realização da PCR .....	34
4.2.6	Análise estatística .....	35
4.3	RESULTADOS .....	36
4.3.1	Avaliação Epidemiológica.....	36
4.3.2	Avaliação Clínica .....	39

4.3.3 Avaliação Hematológica.....	39
4.4 DISCUSSÃO.....	42
4.5 CONCLUSÃO.....	46
4.6 REFERÊNCIAS .....	47
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo país com maior população de cães e gatos, e o terceiro país em população total de animais de estimação, atingindo a marca dos 139,3 milhões (ABINPET, 2021). O gato está presente em 19,3% dos domicílios brasileiros, o equivalente a 14,1 milhões de unidades domiciliares. Na região sul, 21,2% dos domicílios possuem pelo menos um gato (IBGE, 2020) e a população estimada para a espécie no Brasil é de 23,9 milhões (ABINPET, 2021). O país, portanto, apresenta alta população de gatos, o que não se reflete quanto aos dados e pesquisas a respeito das enfermidades infecciosas que os afetam. O fato destes animais serem cada vez mais inseridos no convívio doméstico, justifica a importância do conhecimento sobre essas doenças.

Micoplasmas hemotrópicos, são bactérias do gênero *Mycoplasma*, que se aderem à superfície de eritrócitos, as parasitando sem levar ao rompimento da membrana. Das três espécies do gênero descritas infectando gatos, *Mycoplasma haemofelis* é o mais patogênico. Estudos relatam que a presença de *M. haemofelis* parasitando os eritrócitos tenha sido encontrada em até 38% dos gatos, e destes, apenas 7,9% teriam apresentado alguma alteração hematológica, além da variação normal dos parâmetros do hemograma, confirmando a existência de portadores assintomáticos (CARNEY; ENGLAND, 1993). A anemia é a principal alteração clínica e pode ser causada pela hemólise extravascular ou intravascular, como descrita em alguns gatos (QUINN et al., 2011).

A deficiência imunológica que o vírus da leucemia felina (FeLV) causa, facilita a infecção de agentes oportunistas como *M. haemofelis* (SANTOS et al., 2011). O impacto da coinfeção por FeLV e *Mycoplasma* sp. já foi estabelecido (TASKER, 2010). No entanto, no Brasil os estudos epidemiológicos são escassos e restritos aos grandes centros urbanos (MACIEIRA et al., 2008; RAIMUNDO et al., 2016; MARCONDES et al., 2018; MUNHOZ et al., 2018; PEREIRA, 2018; PETRY et al., 2020). No estado de Santa Catarina não há estudos sobre a prevalência de *M. haemofelis*. Um estudo, que avaliou a causa de óbitos em gatos do planalto catarinense necropsiados no período de 1995 a 2015 pelo Laboratório de Patologia Animal (LAPA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) demonstrou que a micoplasmose foi uma das principais *causa mortis* de origem infecciosa, sendo responsável por 7,33% dos óbitos (WITHOEFT et al., 2019). A infecção por *Mycoplasmas* sp. tem grande importância em medicina felina pois é causa de anemia e imunossupressão.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) ganhou grande visibilidade desde seu desenvolvimento por ser até então o método mais específico e sensível, tendo grande importância no diagnóstico complementar de diversas doenças e protocolos já consolidados

para babesiose, teileriose e doença da arranhadura do gato, dos quais possuem organismos em que o cultivo não é bem-sucedido. O mesmo ocorre no diagnóstico da micoplasmose, apresentando uma alternativa às limitações encontradas pela identificação da bactéria por avaliação do esfregaço sanguíneo. Em 1998 a técnica de PCR foi estabelecida para *M. haemofelis*. Berent e colaboradores (1998) identificaram uma porção de ácido nucléicos única do patógeno presente na sequência do gene 16S rRNA. Os resultados indicaram que os primers podem detectar a bactéria em amostras de sangue obtidas de gatos durante as fases sintomática e assintomática. *Mycoplasma haemofelis* pode iniciar uma fase carreadora crônica quando o gato recebe atendimento de suporte que permita sua recuperação mesmo não recebendo antibióticos. Estes gatos geralmente possuem volume globular (VG) limítrofe e a bactéria pode ser detectada de maneira esporádica durante o exame do esfregaço sanguíneo (BERENT et al., 1998). Estas vantagens fazem com que a PCR seja o método de eleição para o diagnóstico destes organismos, permitindo inclusive a diferenciação entre as espécies micoplasmares, o que não se atingiria apenas por esfregaços sanguíneos (WILLI et al., 2007).

Os métodos moleculares são essenciais no diagnóstico da infecção por *Mycoplasma* spp. A análise citológica do esfregaço sanguíneo quando comparado a métodos baseados na pesquisa de material genético, mostra-se menos sensível. Macieira e colaboradores (2009) descrevem maior sensibilidade da PCR em relação a análise do esfregaço sanguíneo, no qual, de um total de 149 felinos avaliados, 18 eram positivos para pelo menos uma das espécies de *Mycoplasma* testadas (*M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*') e, somente um deles foi positivo na análise citológica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Determinar a prevalência e os fatores associados à infecção por *Mycoplasma haemofelis* em gatos no planalto de Santa Catarina, bem como, avaliar as alterações clínicas e hematológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Aplicação da técnica de PCR para o diagnóstico de *M. haemofelis*;
- b. Determinar a prevalência de *M. haemofelis* em gatos naturalmente infectados no planalto de Santa Catarina;
- c. Estabelecer correlações entre a ocorrência de *M. haemofelis* com FeLV e FIV;
- d. Caracterização dos fatores associados à infecção por *M. haemofelis*;
- e. Caracterizar as alterações clínicas e hematológicas dos gatos infectados por *M. haemofelis*.

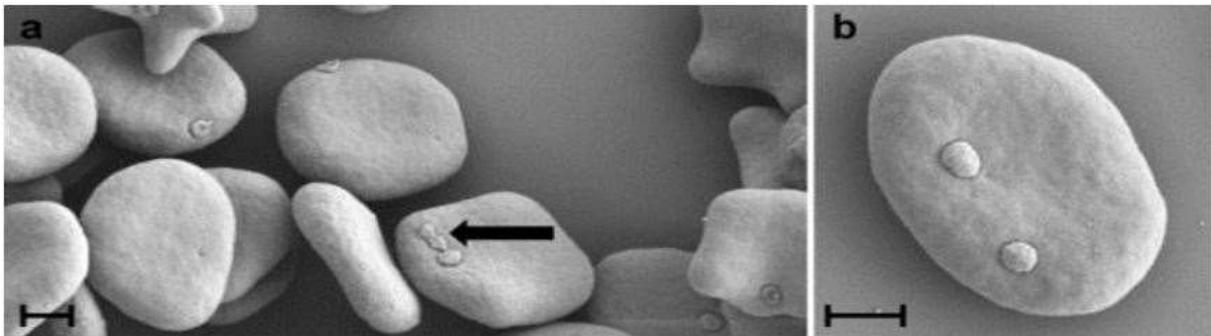
### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Mycoplasma haemofelis*

##### 3.1.1 Etiologia

Os micoplasmas hemotrópicos, normalmente conhecidos como hemoplasmas, são bactérias gram-negativas que se localizam na superfície dos eritrócitos (Figura 1). Pertencentes à classe dos *Mollicutes*, estas bactérias não possuem parede celular, sendo encontradas em uma ampla variedade de espécies hospedeiras, como humanos, outros mamíferos, peixes, répteis, artrópodes e plantas, podendo causar diferentes graus de anemia hemolítica nos hospedeiros infectados (ROURA et al., 2010; GUIMARAES et al., 2014).

Figura 1 - Fotomicrografia eletrônica de *Mycoplasma haemofelis* em eritrócito (a,b), observa-se organismos de formato discoide medindo cerca de 0,5µm de diâmetro e, fissão binária na superfície da célula (seta). Barras representam 1µm.



Fonte: WILLI et al., 2011.

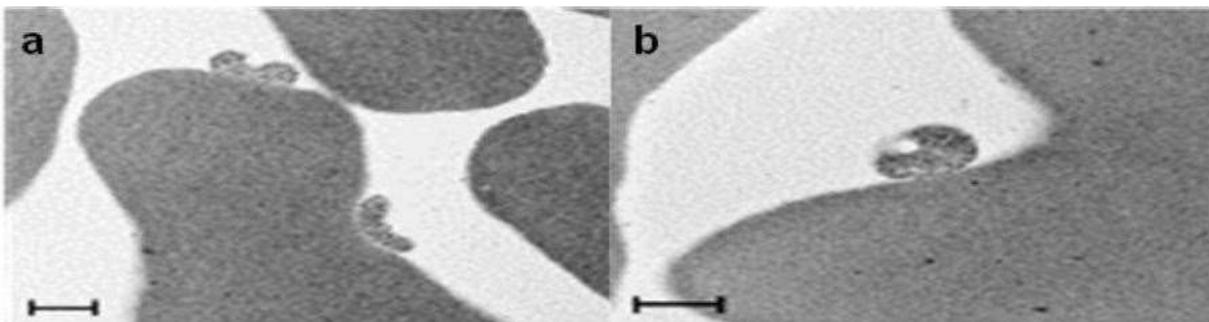
Os micoplasmas foram agrupados inicialmente como Rickettsias devido a fatores como o seu tamanho pequeno e propriedades de coloração, o fato de não poderem ser cultivados *in vitro*, a sua transmissão através de vetores artrópodes e de caráter hemotrópico, que os relacionava com a família *Anaplasmataceae* (NEIMARK et al., 2001; GUIMARAES et al., 2014). No entanto, as bactérias pertencentes a esta família, multiplicam-se por divisão binária dentro das hemácias (NEIMARK et al., 2001), enquanto a anteriormente designada por *Hemobartonella* não invade os eritrócitos, anexando-se simplesmente à superfície dos mesmos (HICKS et al., 2015). *Mycoplasma* spp. era antigamente chamado de *Haemobartonella* spp., porém estudos realizados através da análise de sequenciamento genético, baseados na subunidade 16S do rRNA, demonstraram que os microrganismos classificados até então como

*Haemobartonella* spp., deveriam ser realocados e renomeados, visto que são mais semelhantes às formas do gênero *Mycoplasma* (RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001).

Três espécies desse gênero causam infecção em gatos: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* (PETERS et al., 2008). Estudos indicam que infecções em gatos por *M. haemofelis*, anteriormente conhecido como *Hemobartonella felis* geralmente produzem anemia e sinais clínicos da doença sendo o patógeno causador da micoplasmose felina ou micoplasmose haemotrópica felina (MHF) também conhecida como anemia infecciosa felina (AIF). Este agente é pleomórfico, varia de pequenos cocos a anéis, podendo formar cordões de três a seis microrganismos. *Candidatus Mycoplasma haemominutum* é pequeno, normalmente se encontra isolado em pequenos cocos e *Candidatus Mycoplasma turicensis*, geralmente resultam em infecção inaparente e mínima alteração no volume globular, exceto nos casos em que estão associados a outras infecções, como o vírus da FIV e FeLV ou outras causas de imunossupressão em gatos. No entanto, não se distingue essas diferentes espécies com base apenas na forma analisadas na microscopia do sangue (NEIMARK et al., 2001; STAJONOVIK & FOLEY, 2011).

*Mycoplasma haemofelis*, assim como outros micoplasmas utiliza a glicose como única fonte de energia e possui diversas proteínas de superfície que poderão estar envolvidas no escape do sistema imunológico do hospedeiro. Essa bactéria se adere à superfície de eritrócitos maduros promovendo a lise destes (Figura 2) (BEUGNET & HALOS, 2015).

Figura 2 - Fotomicrografia eletrônica de eritrócitos infectados por *Mycoplasma haemofelis* 10 dias após a infecção (a, b). Observa-se estruturas aderidas à superfície do eritrócito, mas que não invadem a célula. Barras representam 0,5µm.



Fonte: WILLI et al., 2011.

### 3.1.2 Epidemiologia e aspectos clínicos da micoplasmose

Acredita-se que a transmissão de *M. haemofelis* seja principalmente por feridas causadas por mordeduras de gatos, por esse motivo os gatos mais acometidos têm entre um e três anos,

que possuem acesso à rua e através da picada de vetores artrópodes hematófagos, principalmente ixodídeos, pulgas e mosquitos. O mecanismo de transmissão exato ainda é pouco conhecido, tem-se relatos da infecção por hemoplasmas de forma ampla mesmo em locais aonde não há infestação por estes artrópodes. Woods et al. (2005) em estudo realizado, apenas um de seis animais apresentou PCR positivo para *M. haemofelis* e ausência de sinais clínicos, quando se tentou transmitir *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' por meio de pulgas. Outros vetores como moscas (*Stomoxys calcitrans*) e mosquitos (*Aedes aegypti*) podem estar envolvidos na transmissão de micoplasmas hemotrópicos (NEIMARK et al., 2001). A forma vertical de transmissão também é possível, porém de menor importância, não se sabe se esta ocorre durante o parto ou pela amamentação e a transmissão iatrogênica pode ocorrer, principalmente em ambientes hospitalares, através da transfusão sanguínea ou ainda pela manipulação de fômites (PAGE, 2003; HARVEY, 2006; TASKER, 2010).

A infecção por *M. haemofelis* é cíclica, o período de incubação pós-inoculação intravenosa varia de dois dias a um mês, porém também se verificou que a inoculação por via subcutânea também pode perdurar por até dois meses (BEUGNET & HALOS, 2015). A micoplasmose pode ser dividida em fases aguda e crônica. A fase aguda engloba o período entre o primeiro e último pico de bacteremia, esta costuma ser acompanhada de sinais clínicos como letargia, fraqueza, palidez de mucosas, dispneia, taquicardia, linfadenomegalia, anorexia e icterícia. Outros sinais podem ser identificados no exame físico, são eles, hepatomegalia, esplenomegalia, murmúrios cardíacos e febre intermitente, sendo que animais extremamente debilitados apresentaram hipotermia (FOLEY et al., 1998; SYKES, 2003). Esta fase é classicamente marcada pela destruição extravascular de eritrócitos, em órgãos do sistema fagocítico-mononuclear, ou ainda podendo ser intravascular, por meio da lesão à membrana das células infectadas, com aumento da permeabilidade osmótica. Além do mais, pode se observar episódios de auto-aglutinação em esfregaços sanguíneos de animais infectados, ocorrendo devido à deposição dos organismos nos eritrócitos, levando à exposição de antígenos na superfície destas células e conseqüentemente, deposição de anticorpos anti-eritrocitários (MESSICK, 2004).

Este agente infeccioso provoca anemia hemolítica aguda extravascular, podendo por vezes ser fatal, sendo a alteração hematológica mais frequente anemia regenerativa macrocítica, normocrômica, seguida de anisocitose, reticulocitose, policromasia podendo estar acompanhada de hemácias nucleadas, a anemia causada pelos hemoplasmas apresenta caráter regenerativo, e assim, pode-se encontrar na análise citológica do esfregaço sanguíneo policromasia, anisocitose, macrocitose, reticulocitose e corpúsculos de Howell-Jolly

(TASKER, et al., 2006). A anemia pode se caracterizar como não regenerativa se existir outra doença relacionada, como FeLV, que possa inibir a eritropoiese (HAEFNER et al., 2015). Quanto ao leucograma, este não apresenta valor diagnóstico, podendo se mostrar normal, com leucocitose ou mesmo leucopenia (HARRUS et al., 2002). Observa-se também o próprio agente na superfície de eritrócitos, visualiza-se pequenos cocos, anéis ou bastonetes que coram em azul. Pode verificar-se aumento de reticulócitos, podendo não ser perceptível se for acompanhado de imunossupressão ou volume globular médio (VGM) baixo (BEUGNET & HALOS, 2015).

Em gatos infectados com *M. haemofelis* se observa diminuição da contagem de eritrócitos e hemoglobina (RAMSEY & TENNANT, 2010; QUINN et al., 2011). Alguns casos a anemia arregenerativa pode ser encontrada e ocorre devido a coinfeções, como FeLV, ou devido o curto período de resposta da medula óssea (KEWISH et al., 2004). A hemólise aguda que pode estar associada a colapso, causa falta de oxigenação e o animal pode apresentar vocalização e sinais neurológicos (BEUGNET & HALOS, 2015). A existência de doenças concomitantes, imunossupressão ou animais previamente esplenectomizados podem predispor à infecção aguda ou mesmo o reaparecimento da infecção (AUGUST, 1992).

A fase crônica normalmente não cursa com sinais clínicos, mas os animais podem apresentar anemia leve. Devido às características globais dos micoplasmas, estes são capazes de permanecer latentes no organismo do animal, mesmo após o tratamento específico (BERENT, 2003). O fato dos hemoplasmas possuírem alta capacidade de evasão ao sistema imune, contribui para o desenvolvimento do estado de portador e, assim permanecerem positivos a PCR durante meses ou ainda anos após a infecção aguda (NOVACCO et al., 2011). No caso de *M. haemofelis* por apresentar grande variedade antigênica contribui na manutenção da bactéria no hospedeiro (SANTOS et al., 2011). Nos gatos sobreviventes, volta o valor normal do volume globular e não é mais possível a identificação de micoplasmas nos esfregaços sanguíneos. Esta fase tem a possibilidade do animal eliminar a infecção ou se tornar portador, estudos relatam que a anemia nestes gatos pode ser evidenciada em casos de estresse, gestação, neoplasias, ou ainda por administração de imunossupressores de forma iatrogênica (BEUGNET & HALOS, 2015).

### 3.2 ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE MICOPLASMOSE FELINA

Trabalhos de prevalência não se referem para predisposições entre raças ou idade, mas verificam maior acometimento dos machos, há estudos que apontam que gatos, machos (ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013), coinfectados por FIV e/ou FeLV teriam maior risco de

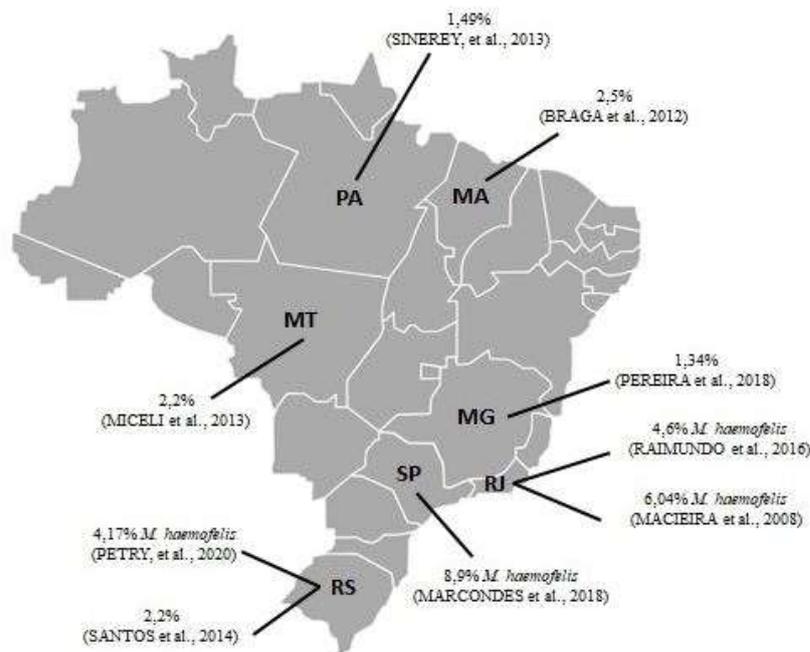
se infectarem com *M. haemofelis* (MACIEIRA et al., 2008). O agente se manifesta de preferência em machos, idosos, com acesso à rua, sem raça definida e coinfectados com FIV ou ainda que a infecção ocorre em gatos de 1 a 3 anos, que possuem acesso à rua e com maior frequência na primavera (QUINN et al. 2011; STOJANOVIC & FOLEY, 2011; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013; JENKINS et al., 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ, 2013).

Foram realizadas pesquisas em diversos países sobre prevalência de *Mycoplasma* spp., os resultados desses estudos são discrepantes entre si. Na América do Norte, em estudo realizado na Flórida 8,3% do animais testados foram positivos (LURIA et al., 2004), porém em trabalho realizado na Suíça, relata prevalência de 0,5% de gatos positivos para *M. haemofelis* (WILLI et al., 2010). Já em Portugal, NEVES (2013) obteve o valor de 20,7% do agente, bem mais alto que os 12,81% obtidos em estudo realizado na região Central-Norte do país (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013). Essa variação pode estar relacionada às diferenças climáticas, dos vetores ou ainda quanto à prestação de cuidados de saúde desses animais e aos fatores socioeconômicos (NEVES, 2013). Essas diferenças também são observadas na Itália, onde na mesma região se tinha 10,8% (SPADA et al., 2014), e três anos depois o valor identificado diminuiu para 4% (RAVAGNAN et al., 2017). Os autores do primeiro trabalho italiano atribuem a taxa devido ao tipo de população que foi amostrada, composta por gatos de rua com diversos fatores de risco simultâneos, como alta porcentagem de animais não saudáveis (anêmicos, doenças concomitantes) e probabilidade de interações agressivas entre grupos. As diferenças entre grupos amostrais devido às peculiaridades de cada um, torna a comparação entre trabalhos uma tarefa complexa, como apontou estudo realizado na Espanha (ROURA et al., 2010).

No Brasil existem pesquisas sobre prevalência da infecção por *M. haemofelis* realizadas em todas as regiões do país (Figura 3). Na cidade de São Luís, Maranhão, estudo realizado por Braga et al. (2012) por meio de PCR, detectou 2,5% em população de 200 gatos com acesso à rua. Trabalho realizado em Cuiabá, também utilizando PCR obteve resultado semelhante de 2,2% de positividade para *M. haemofelis* (MICELI et al., 2013). Em Belém, Pará estudo comparou gatos de rua capturados pelo centro de controle de zoonoses, gatos domiciliados e saudáveis e gatos domiciliados que apresentavam alguma afecção, em que encontrou prevalência de 1,49% para *M. haemofelis*, fazendo uso da PCR (SINEREY et al., 2013). A prevalência encontrada em um trabalho de 300 gatos em Uberlândia foi de 1,34%, por meio de avaliação do esfregaço sanguíneo (PEREIRA, 2018). Na cidade do Rio de Janeiro um estudo contendo 149 felinos realizado por Macieira et al. (2008), utilizando a técnica de PCR, obteve uma prevalência de 6,04% para *M. haemofelis*, dos quais a idade média dos animais infectados foi de  $5,9 \pm 3,5$  anos, sendo que entre os principais fatores associados estava positividade para

retrovírus, histórico de brigas/mordidas, presença de coabitantes mas nenhuma associação à presença de pulgas. Anos mais tarde com uso da PCR em Seropédica-RJ, obteve-se 4,6% de positividade para *M. haemofelis*, 1% deste número amostral estava ainda coinfectado por outro tipo de micoplasma felino, a frequência de ocorrência de hemoplasmas pareceu variar conforme as estações, durante o verão teve maior ocorrência de *M. haemofelis* (7,7%) e *Candidatus M. haemominutum* (17,9%) ( $p < 0,05$ ) (RAIMUNDO et al., 2016). Em Araçatuba-SP 8,9% das 90 amostras de sangue coletadas de gatos mestiços provenientes de abrigos ou do atendimento em Hospital Universitário Veterinário e submetidas a análise por PCR foram positivas para *M. haemofelis* (MARCONDES et al., 2018).

Figura 3 - Estudos com resultados de prevalências de *Mycoplasma haemofelis* realizados no Brasil.



Fonte: autoria própria.

No Rio Grande do Sul, Petry et al. (2020) avaliaram 192 gatos utilizando a PCR, na qual a prevalência para *Candidatus M. haemominutum*, *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus M. turicensis* juntos foi de 14,6%, e 7,83%, 4,17% e 1,56%, respectivamente.

Em Santa Catarina, apesar de não terem trabalhos que avaliaram a prevalência de *Mycoplasma* sp. em gatos, este foi elencado como uma das principais doenças bacterianas responsável pela morte dos gatos. Entre os animais que vieram a óbito devido a doenças infecciosas (273 gatos), 7,33% ocorreram devido a infecção por *Mycoplasma* sp., sendo mais relatada em gatos machos adultos 55% (11/20) (WITHOEFT et al., 2019).

### 3.3 ASSOCIAÇÃO DO *Mycoplasma haemofelis* COM INFECÇÃO POR FeLV e FIV

O potencial debilitante característico dos retrovírus FIV e FeLV aumentam as chances de um animal positivo ter sinais clínicos mais graves da micoplasmose. De acordo com Santos et al. (2011) entre 20 a 40% de gatos doentes ou com anemia estão infetados com *M. haemofelis* e cerca de 40% a 50% dos gatos infetados com sinais clínicos de *M. haemofelis* são FeLV positivos. Esses dados estão de acordo com o observado por Ramsey & Tennant (2010), que designou o FeLV como cofator no desenvolvimento de anemia infecciosa felina em zonas onde este vírus é comum, estimando que cerca de 50% dos gatos está coinfectado com *M. haemofelis*. Devido à supressão da resposta imune causada pelo FeLV, esta pode facilitar a infecção por micoplasmas hemotrópicos, já que uma pequena carga bacteriana já é o suficiente para causar a doença ou mesmo deixar ativa uma infecção que até então se encontrava latente (SANTOS et al., 2011).

Esta importância se deve à capacidade dos vírus (FIV e FeLV) de originarem doenças neoplásicas, alterações hematológicas, imunossupressão e serem de fácil disseminação. A facilidade de contágio do animal pode ser dependente da prevalência de cada um destes agentes (FIV, FeLV e *Mycoplasma* spp.) (AZEVEDO, 2017). Gatos infectados por esses vírus, podem desenvolver síndromes clínicas, abrindo espaço para infecções de caráter oportunista e agravando o quadro clínico sendo a mais expressiva a micoplasmose felina (RIVETTI-JÚNIOR, 2006; ARAGÃO-DE-SOUSA et al., 2013; MUNHOZ et al., 2018).

No planalto de Santa Catarina um trabalho recente identificou prevalência de 22,26% para FeLV e 5,84% para FIV (BIEZUS et al., 2019a). Outro estudo realizado pelos mesmos autores demonstrou que a anemia foi a alteração hematológica mais encontrada, a maioria de caráter grave, arregenerativa, do tipo normocítica e normocrômica. Em 13,79% destes animais houve desenvolvimento de icterícia resultante do quadro de anemia intensa, podendo estar correlacionada por coinfecção com *Mycoplasma* spp. (BIEZUS et al., 2019b). Outros dois estudos na região no planalto catarinense, um que pesquisou a associação entre a formação de tumores por meio da caracterização patológica de linfomas, de acordo com aspectos anatômicos e histológicos marcaram com reagente anti-FeLV em 56.6% da coorte e outro sobre o desenvolvimento de leucemia, e sua correlação com as infecções pelos vírus da FIV e FeLV por meio de imuno-histoquímica (IHQ), onde 78,4% tiveram marcação positiva para antígeno da FeLV na medula óssea e 16,2% com marcação positiva para FIV (CRISTO et al., 2019a; 2019b), salientam quão habitual é a presença desses retrovírus na região, e este conjunto de dados sugere também que a micoplasmose é uma doença importante na localidade.

Independente da forma a qual venha a ocorrer a interação entre estes agentes, geralmente um gato infectado com FeLV e *M. haemofelis* apresenta sinais clínicos mais graves. Há anemia grave não regenerativa, prostração e emaciação, não responsivo ao tratamento e um prognóstico reservado. Diferentemente, uma infecção concorrente de *M. haemofelis* e FIV não aparenta causar uma anemia mais grave do que quando o animal tem apenas *M. haemofelis* (HARVEY, 2006).

### 3.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma* spp.

A infecção por *M. haemofelis* é comumente diagnosticada por meio da detecção do microrganismo na superfície dos eritrócitos em esfregaços sanguíneos periféricos corados por diversas técnicas de coloração como *Romanowsky: Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Wright e Wright-Giemsa*. O *Giemsa*, quando comparado aos corantes à base de azul-de-metileno possuiu sensibilidade 20% maior (BOBADE & NASH, 1987). Este método é considerado pouco sensível uma vez que apenas se consegue identificar a bactéria nos esfregaços em menos de 50% dos gatos infectados na fase aguda da doença (RIVETTI-JÚNIOR, 2006). O sangue deve preferencialmente ser colhido da parte interna do pavilhão auricular, otimizando assim a possibilidade de se encontrar o microrganismo. Deve-se realizar a colheita de sangue total sem anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), este anticoagulante pode fazer com que o agente se desprenda da superfície dos eritrócitos, e assim, impedir a identificação destes pela microscopia óptica. Falsos positivos podem acontecer quando ocorre precipitação de estruturas devido à secagem e fixação incorreta dos esfregaços sanguíneos, assim como a presença de resquícios nucleares dos eritrócitos conhecidos como corpúsculos de Howell-Jolly, que devem ser diferenciados de *M. haemofelis* no teste por visualização direta ou pela confirmação pela técnica de PCR, o que é mais recomendado (BEUGNET & HALOS, 2015).

A bacteremia pode tanto aumentar quanto diminuir de hora em hora, o que torna o diagnóstico por este método um achado clínico em casos de suspeitas de anemia infecciosa. Pode ser necessário que se realize colheitas por sete dias consecutivos, para que se possa observar o agente no esfregaço, ainda assim, alguns autores relatam a necessidade que esse período seja de pelo menos 10 dias, casos de flutuações cíclicas com abruptas quedas de hematócrito e o número de eritrócitos infectados chega a variar de 90% a 1% num período de apenas três horas (BEUGNET & HALOS, 2015).

Métodos sorológicos como *Western blot* (ALLEMAN et al., 1999) imunofluorescência indireta (RIFI) também são utilizados para identificação. Apesar do progresso de técnicas sorológicas e de citometria, testes sorológicos para diagnóstico da micoplasmose mesmo que

demonstrando alta sensibilidade não estão disponíveis comercialmente, possivelmente devido ao caráter de portador que a bactéria pode induzir (BEUGNET & HALOS, 2015). Algumas variações antigênicas entre tipos de *M. haemofelis* podem não possuir reações cruzadas gerando falsos negativos.

Cerca de 50% dos gatos são falsos negativos na observação do esfregaço, por isso deve ser utilizada a técnica da PCR para confirmação do diagnóstico. Este é o método de eleição para o diagnóstico, devido a maior sensibilidade e especificidade frente ao exame citológico usual, identificando até mesmo as diferentes espécies de micoplasmas felinos (QUINN et al. 2011). Utilizando sangue ou amostras de tecidos dos animais infectados, a técnica tem como base a amplificação da zona do gene 16S do rRNA, sendo possível detectar resultado positivo a partir de 100 organismos/ml de sangue (WILLI et al., 2007; BEUGNET & HALOS, 2015). No entanto, o uso da técnica não dispensa uma boa interpretação dos sinais clínicos apresentados pelo animal, sendo que um resultado positivo na PCR não significa que a infecção esteja ativa, pois esses animais podem se tornar portadores sem a manifestação de sintomatologia clínica (BARKER et al., 2011). Por este motivo, na rotina clínica, os resultados da PCR devem sempre ser associados aos sinais clínicos apresentados.

Infecções por babesiose felina e cytauxzoonose possuem sinais clínicos como anorexia, depressão, letargia, perda de peso e icterícia principalmente na fase aguda, e devem ser incluídas no diagnóstico diferencial da micoplasmose (RAMNSEY & TENNANT, 2010). Outras causas de anemia hemolítica, tais como intoxicação por diferentes agentes ou drogas e anemia hereditária comum nas raças Abissínios e Somali, assim como a peritonite infecciosa felina (PIF), em sua fase inicial deve ser considerada também como diagnóstico diferencial devido à semelhança entre os sinais clínicos que são inespecíficos, como a anorexia, perda de peso e palidez de mucosas (SYKES, 2010).

### 3.5 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA MICOPLASMOSE FELINA

Na micoplasmose felina pode ser necessário tratamento de suporte caso a anemia seja grave, incluindo a correção da desidratação com fluidoterapia e/ou transfusões sanguíneas. O suporte nutricional também é importante, se necessário colocar uma sonda nasogástrica para alimentação em animais com hiporexia/anorexia, mas em todos os casos o ponto crucial é limitar o estresse pelo qual o animal esteja sujeito. Gatos infectados, com sucesso no tratamento, ficam geralmente portadores e não demonstram recidivas (TASKER; LAPPIN, 2002).

Os animais sintomáticos devem ser medicados com antibioticoterapia. A tetraciclina de eleição para gatos é a doxiciclina, por ter menos efeitos colaterais. Estudos demonstram que

alguns gatos apresentam vômito quando a doxiciclina é dada uma vez ao dia na dose de 10mg/kg. Nestes casos recomenda-se então que seja ministrada a dose 5mg/kg duas vezes ao dia por via oral (VO). A terapêutica deve ser continuada por um período de 14 a 21 dias. A enrofloxacina é uma segunda opção de antibiótico, para uso em gatos intolerantes a doxiciclina, no entanto, deve-se tomar cuidado com sua administração, não ultrapassando a dose de 5 a 10 mg/kg por dia, VO, por 2 a 3 semanas visto que estudos já observaram o aparecimento de cegueira súbita em gatos tratados com enrofloxacina. A cegueira súbita pode estar associada à degeneração retiniana difusa, considerada por alguns autores como reação rara e idiossincrática (TASKER & LAPPIN 2002). Uma opção de tratamento em alternativa os antibióticos de primeira escolha a pradofloxaxina, que tem como benefício diferentemente da enrofloxaxina, não levar a atrofia da retina em gatos. Gatos intolerantes, tanto a doxiciclina e enrofloxaxina podem ser tratados com 2 a 4 injeções de dipropionato de imidocarb na dose de 5mg/kg intramuscular (IM) ou subcutâneo (SC) a cada 2 semanas (BEUGNET & HALOS, 2015).

A anemia induzida por *Mycoplasma* spp. é em parte imunomediada, recomendando-se assim, administrar glicocorticoides. A prednisolona na dose de 2mg/Kg uma vez ao dia é a mais utilizada, sendo que esta pode diminuir a eritrofagocitose, aumentar o apetite e estimular a medula óssea. A retirada deste medicamento deve ser gradual, diminuindo sua dose em um período de três semanas conforme ocorrer aumento no volume globular, senão poderá causar imunossupressão ainda maior, exacerbando ainda mais os sinais clínicos, sendo indicada por alguns autores somente em casos de pacientes que não respondam à terapêutica com antibióticos isolados, ou quando o diagnóstico ainda não é certo (BEUGNET & HALOS, 2015). O uso de glicocorticoides deve ser evitado inclusive em gatos com doença cardíaca e *diabetes mellitus* (TASKER & LAPPIN, 2002). Já os animais positivos na PCR e subclínicos não se recomenda a administração de antibióticos, já que não se garante que o tratamento com antibióticos elimine a infecção, não sendo aconselhável tratar pacientes positivos para que estes sejam utilizados como doadores de sangue (BEUGNET & HALOS, 2015). Segundo Tasker & Lappin (2002), ideal seria que gatos que irão ser utilizados como doadores de sangue sejam previamente testados, com a técnica de PCR para *Mycoplasma* spp.

O combate de ectoparasitas, como pulga e carrapato, é importante para um programa de prevenção a micoplasmose, trazendo melhor qualidade de vida e menores riscos ao animal (WILLI, 2007). Estudos mostram que gatos FeLV positivo são mais predispostos a desenvolver a doença, desta forma, a prevenção inclui o diagnóstico desse agente, além da vacinação dos animais não infectados (RAMSEY & TENNANT, 2010; QUINN *et al.* 2011). A castração

nestes animais também é indicada, visto que diminui a agressividade, evitando-se brigas e diminui as saídas a rua (ALLISON & HOOVER, 2003).

#### 4 INFEÇÃO POR *Mycoplasma haemofelis* EM GATOS DO PLANALTO CATARINENSE: PREVALÊNCIA, FATORES ASSOCIADOS, ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS

##### RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos, são bactérias do gênero *Mycoplasma*, que se aderem à superfície de eritrócitos, sem levar ao rompimento da membrana. Das três espécies descritas infectando felinos domésticos, *Mycoplasma haemofelis* é o mais patogênico. Apesar de já descrito em diversos países, não há dados sobre a prevalência de *M. haemofelis* no estado de Santa Catarina. O objetivo desse estudo foi determinar a prevalência de *M. haemofelis* em gatos na região do planalto de Santa Catarina, Brasil, bem como, avaliar as alterações clínicas, hematológicas e os possíveis fatores que expõem os felinos à infecção. Foram analisadas 274 amostras de sangue de gatos domiciliados e semi-domiciliados, provenientes da rotina clínica do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (HCV-UDESC) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica o gene da região 16S rRNA. Foram compilados dados do hemograma, alterações clínicas e epidemiológicas apresentadas no momento do diagnóstico, submetidas a análise estatística descritiva, teste de medianas e análise de regressão logística. A amostra original foi dividida em Grupo 1, composto pelos animais positivos para *M. haemofelis*, Grupo 2 coinfectados por *M. haemofelis* e FeLV e Grupo 3 negativos para *M. haemofelis* e considerados saudáveis (grupo controle). A prevalência obtida para *M. haemofelis* foi 6,57% (18/274) (IC de 95% 3,63-9,49%). Entre os animais positivos, 33,33% (6/18) tinham coinfecção por FeLV, 5,55% (1/18) por FIV e 5,55% (1/18) por FIV e FeLV. Gatos machos apresentaram sete vezes mais chance de se infectarem por *M. haemofelis* ( $p < 0,001$ ; OR: 7,07). Quando a idade o Grupo 1, com mediana de 4,25 anos, apresentou animais significativamente mais velhos que o Grupo controle ( $p = 0,042$ ). Apenas três animais apresentaram alterações clínicas relacionadas ao *M. haemofelis* que foi palidez de mucosa em decorrência de anemia. Grupo 1 obteve diferença estatística quando comparado ao controle nos valores de hemoglobina, volume globular (VG) e neutrófilos bastonetes. Conclui-se que a infecção por *M. haemofelis* presente na região do planalto de Santa Catarina, Brasil tem maior prevalência de machos, adultos. A maioria dos gatos infectados não apresentaram alterações clínicas, sugerindo que a positividade encontrada foi composta principalmente por animais portadores.

**Palavras-chave:** hemoplasma, medicina felina, diagnóstico, biologia molecular.

*Mycoplasma haemofelis* INFECTION IN SANTA CATARINA'S PLATEAU CATS: PREVALENCE, ASSOCIATED FACTORS, CLINICAL AND HEMATOLOGICAL CHANGES

**ABSTRACT**

Hemotropic Mycoplasmas are bacteria of the *Mycoplasma* genus, which adhere to the surface of erythrocytes, without breaking the membrane. Of the three species described infecting domestic cats, *Mycoplasma haemofelis* is the most pathogenic. Although already described in several countries, including Brazil, there are no data on the prevalence of *Mycoplasma haemofelis* in State of Santa Catarina. The aim of this study was to determine the prevalence of *Mycoplasma haemofelis* in cats in the plateau region of Santa Catarina, Brazil, as well as to assess clinical and hematological changes and possible factors that expose cats to infection. A total of 247 blood samples from domestic and semidomestic cats from the clinical routine of the veterinary Hospital of the Santa Catarina State University (HCV-UDESC) were analyzed using the polymerase chain reaction (PCR) that amplifies the gene of the 16S rRNA region. Blood count data, clinical and epidemiological changes presented at the time of diagnosis were compiled, submitted to descriptive statistical analysis, median test and logistic regression analysis. The original sample was divided into Group 1, composed of animals positive for *Mycoplasma haemofelis*, Group 2 co-infected with *Mycoplasma haemofelis* and FeLV, and Group 3 negative for *Mycoplasma haemofelis* and considered healthy (control Group). The prevalence obtained for *Mycoplasma haemofelis* was 6.57% (18/274) (CI: 95% 3.63-9.49%). Among the positive animals, 33.33% (6/18) had coinfection by FeLV, 5.55% (1/18) by FIV and 5.55% (1/18) by FIV and FeLV. Male cats were seven times more likely to be infected with *Mycoplasma haemofelis* ( $p < 0.001$ ; OR: 7.07). As about age, Group 1 with median of 4.25 years, presented animals significantly older than the control Group ( $p = 0.042$ ). Only three animals showed clinical changes related to *Mycoplasma haemofelis*, which was pale mucosa due to anemia. Group 1 had statistical difference when compared to the control in values of hemoglobin, hematocrit and neutrophil rods. It is concluded that *Mycoplasma haemofelis* infection is present in the plateau region of Santa Catarina, Brazil with a higher prevalence of adult males. Most infected cats did not show clinical changes suggesting that positivity found was mainly composed of carrier animals.

**Keywords:** hemoplasma, feline medicine, diagnosis, molecular biology.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Os micoplasmas são microorganismos extracelulares, ausentes de parede celular e possuem genoma pequeno, tornando-se necessariamente dependentes do seu hospedeiro (DUARTE et al., 2015). Por muitos anos considerados parte do grupo das *Rickettsias*, denominados como “hemobartonella” foram reclassificados e pertencem atualmente ao gênero *Mycoplasma* (PETERS et al., 2008). Esta classificação foi baseada na análise dos resultados de sequenciamento genético da região 16S do rRNA, provando que os hemoplasmas não se encontram no interior dos eritrócitos e causam anemia, diferentemente de *Bartonella* spp. (RIKIHISA et al. 1997). *Mycoplasma* sp. podem infectar diferentes mamíferos, incluindo os felinos, que parasitam eritrócitos, anexando-se e crescendo à superfície destes (DUARTE et al. 2015), causando anemia hemolítica por hemólise extravascular de eritrócitos pelo sistema mononuclear fagocitário, além de intravascular devido a lesão direta da membrana e aumento da fragilidade osmótica, dando a doença o nome de anemia infecciosa felina, ou micoplasmose, a doença clínica é especialmente observada, quando associada a outras enfermidades imunossupressoras como o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) (SYKES, 2010).

Uma constante causa de anemia e imunossupressão, a infecção por *Mycoplasma* sp. é de grande importância na medicina felina, assim como as retrovíruses, tanto nos gatos domésticos de rua quanto os domiciliados, devido ao caráter oportunista, quando o vírus da FeLV está presente, a infecção por *Mycoplasma* sp. pode ser facilitada, o impacto causado por estes agentes é cada vez mais evidente na prática felina (SANTOS et al., 2011).

Estudos em gatos identificaram uma prevalência de *M. haemofelis* de 0,5 a 20,7%, conforme a região e população estudada (LURIA et al., 2004; ROURA et al., 2010; WILLI et al., 2010; NEVES, 2013; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013; SPADA et al., 2014; RAVAGNAN et al., 2017). No Brasil, apenas grandes centros urbanos têm relatos epidemiológicos com *M. haemofelis* (MUNHOZ et al., 2018). Em Araçatuba, São Paulo, 8,9% das 90 amostras de sangue coletadas de gatos mestiços provenientes de abrigos ou do atendimento em Hospital Universitário Veterinário e submetidas a análise por PCR foram positivas (MARCONDES et al., 2018). Na cidade de São Luís, Maranhão foi detectado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) 2,5% de prevalência (BRAGA et al., 2012). No estado do Mato Grosso, em Cuiabá, também utilizando a PCR, obteve-se prevalência semelhante ao trabalho realizado em São Luís, 2,2% (MICELI et al., 2013). O resultado da detecção da infecção por hemoplasmas na região

Sul do país se aproxima dos valores relatados nos trabalhos no Maranhão e Mato Grosso, em Porto Alegre, dos 369 gatos testados por meio da PCR, 2,7% eram positivos para *M. haemofelis* (SANTOS et al., 2014). Na região Norte o valor encontrado ao utilizar a técnica de PCR foi o mais baixo conhecido no país, ao comparar 201 felinos, entre eles gatos capturados da rua, com gatos domiciliados doentes e também gatos domiciliados que não apresentavam nenhuma afecção, encontrou prevalência de 1,49% (SINEREY et al., 2013).

A forma de diagnóstico mais utilizada na rotina clínica ainda é a análise citológica do esfregaço sanguíneo, a técnica apresenta baixa sensibilidade, podendo levar a resultados falso-negativos devido à facilidade com que a estrutura bacteriana possa ser confundida com artefatos da técnica, corpúsculos de Howell-Jolly ou pontilhados basofílicos durante a análise do esfregaço sanguíneo (BEUGNET & HALOS, 2015). Devido às restrições descritas acerca da análise citológica do esfregaço sanguíneo, esta foi substituída por técnicas moleculares, que se mostraram imprescindíveis no diagnóstico da infecção por hemoplasmas. Em estudo realizado por Macieira et al. (2009), quando avaliados 149 felinos para infecção por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*', se obteve maior sensibilidade da PCR em relação a análise citológica do esfregaço sanguíneo, que identificou apenas um animal positivo, frente aos dezoito felinos que demonstraram PCR positiva para pelo menos uma das duas espécies pesquisadas.

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência das infecções por *Mycoplasma haemofelis* na população de gatos do Planalto Catarinense, avaliar os principais fatores associados que possam expor a população em estudo ao risco de infecção além de descrever e comparar as alterações clínicas e hematológicas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 População estudada

Os animais utilizados no presente projeto foram selecionados de um estudo previamente publicado, em que foi obtida a prevalência da infecção por FIV e FeLV em gatos do Planalto de Santa Catarina (BIEZUS et al., 2019a). Os gatos eram provenientes da rotina de atendimentos no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UDESC.

O tamanho amostral foi calculado utilizando o *software Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (Package EpiCalc)*, por meio da fórmula  $n = Z \times Z [P(1-P)] / D^2$ ,

de amostragem aleatória simples para populações infinitas, em que  $Z$  se refere ao multiplicador (1,645) obtido por meio do intervalo de confiança desejado (90%), com base na distribuição normal. Sendo  $P$  a prevalência esperada de 50% e  $D$  o erro máximo aceitável na estimativa (0,05). Desta maneira, o número mínimo de animais a serem amostrados foi de 271 gatos.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o nº 7665260221.

#### **4.2.2 Colheita dos dados epidemiológicos, clínicos e hematológicos**

Foram revisados os prontuários dos felinos, obtendo dados provenientes da avaliação clínica realizada no momento da colheita de sangue e informações a respeito da raça, gênero, status reprodutivo, idade, acesso à rua, número de felinos por habitação, comportamento do felino mediante outros gatos. Estas variáveis foram consideradas como fatores associados à infecção.

Quanto à raça, os felinos foram classificados como sem raça definida ou com sua raça específica; com relação ao gênero foram classificados como macho ou fêmea, inteiros ou castrados; quanto a idade em meses de vida; se possuem acesso à rua ou não; com relação ao número de felinos na mesma habitação foram divididos em 1 animal por domicílio e 2 ou mais animais por domicílio; quanto ao comportamento do felino mediante outros gatos, foram divididos em dóceis ou agressivos.

Quanto à avaliação clínica foi obtido o escore corporal, coloração das mucosas, tamanho e consistência dos linfonodos, frequência cardíaca e respiratória, temperatura corporal e diagnóstico da enfermidade apresentada. Quanto ao escore corporal, os gatos foram classificados de acordo com as diretrizes estabelecidas pela avaliação da *Global Nutrition Committee of the world small animal veterinary association* (BJOMVAD et al., 2011). Foram classificados da seguinte maneira, de acordo com o índice de condição corporal (ICC): Animais caquéticos tinham o índice de condição corporal (ICC) entre 1 e 2; os classificados como magros tinham o ICC igual a 3; os com condição corporal regular tinham o ICC de 4 a 5; aqueles com sobrepeso tinham o ICC de 6 a 9.

Quanto à positividade dos animais para FIV e FeLV, foram tabulados os dados obtidos previamente por Biezus et al. (2019a). O método diagnóstico utilizado foi o ELISA, por meio do kit SNAP FIV/FeLV Combo Test<sup>®</sup> (IDEXX Laboratories) que detecta a proteína p27 do FeLV e anticorpos contra a proteína p24 do FIV.

Também foram obtidas informações quanto ao cuidado dos tutores com seus animais, como por exemplo: frequência que o felino é levado ao veterinário (primeira vez, a cada trimestre, a cada semestre, todo o ano, somente quando doente); quando presente, foi obtido se o animal recebia ou não medicação para controle de ectoparasitas.

Da avaliação hematológica foram obtidos dados de eritrograma, leucograma, proteína plasmática total e contagem de reticulócitos quando solicitado. Em nenhum dos animais testados foi solicitado pelo clínico a pesquisa de hemoparasita por meio da análise citológica do esfregaço sanguíneo. Os dados obtidos foram compilados em planilhas no Excel para posterior análise.

#### 4.2.3 Obtenção e processamento das amostras de sangue

Foram utilizadas amostras de sangue previamente obtidas, separadas em alíquota e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por um período de 48 a 60 meses, correspondente a cada animal selecionado para a análise.

#### 4.2.4 Extração de DNA

As amostras de sangue, armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , após seu descongelamento foram imediatamente submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial “GeneElute TM Blood Genomic DNA”, conforme orientação do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro *Nano Drop 2000* (Thermo Scientific®) e diluído para se manter a concentração mínima de  $20\text{ng}/\mu\text{L}$ .

#### 4.2.5 Realização da PCR

Para a detecção de *Mycoplasma haemofelis* utilizou-se os “primers” Hfelis-fl (5'-GAC TTTGG TTTTCGGCCAAGG -3') e Hfelis-r3 (5'-CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC-3'), que amplificam parte do gene 16s rRNA como já descrito por Berent et al. (1998). Em cada reação de PCR fez-se uso do DNA de um gato positivo para *M. haemofelis* confirmado por sequenciamento (ACTGene, Alvorada, RS, Brasil) como controle positivo, e como controle negativo utilizada água ultrapura.

O protocolo foi otimizado ajustando algumas concentrações para utilização da *Taq* DNA Polimerase  $5\text{U}/\mu\text{L}$  (quatro G, Porto Alegre, RS, Brasil) seguindo as orientações do fabricante. A solução final para a amplificação continha  $1\mu\text{L}$  de DNA teste,  $2,5\mu\text{L}$  tampão de reação [10x],  $0,75\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  [50mM],  $0,5\mu\text{L}$  da solução mix de dNTP's [10mM],  $0,75\mu\text{L}$  do *primer forward*

[10 $\mu$ M], 0,5  $\mu$ L do *primer reverse* [10 $\mu$ M] e 0,125 unidades  $\mu$ L de *Taq* [5U/  $\mu$ L]. A solução foi completada com água ultrapura q.s.p para 25 $\mu$ L.

As condições utilizadas para a reação em termociclador BIOER® com gradiente LIFE PRO foram: desnaturação a 94°C por 7 minutos; seguida por 35 ciclos de anelamento a 94°C por 1 minuto (desnaturação), 54°C por 45 segundos (hibridização), 72°C por 1 minuto (extensão) e extensão final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Foi acrescentado aos produtos amplificados 2 $\mu$ L de GelRed® (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil) e 1,5 $\mu$ L de 6X DNA *Loading Dye Buffer* (Ludwig Biotecnologia Ltda, Alvorada, RS, Brasil) a cada 5 $\mu$ L de amostra, este composto foi submetido a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% por 30min a 140V, o resultado foi visualizado por meio de exposição à luz ultravioleta, em que o segmento esperado era de 393 pares de base (pb). Uma escala de 100pb (KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil) foi utilizada para comparar o tamanho dos produtos amplificados.

#### 4.2.6 Análise estatística

A prevalência de *M. haemofelis* foi calculada a partir do número de amostras positivas divididos pelo número total de amostras. O Cálculo da prevalência foi corrigido para a obtenção do intervalo de confiança (IC) a 95% por meio da fórmula  $IC\ 95\% = P \pm 1.96 \sqrt{(P (1 - P) / N)}$ . Para a análise dos fatores associados foi empregada análise de regressão logística, que permitiu quantificar a associação entre duas ou mais variáveis.

Para análise dos dados, foram feitas planilhas no Excel e analisadas por meio de estatística descritiva e inferencial. O número de gatos positivos foi calculado de acordo com a idade, gênero, raça, status reprodutivo, origem, acesso à rua, coabitação com mais gatos, comportamento mediante outros gatos e coinfeção com FIV e/ou FeLV, considerando o número total de amostras testadas e expressas em porcentagem.

Foram construídos dois modelos individuais de análise estatística para testar a hipótese de associação entre resultados positivos para infecções por *M. haemofelis* e informações específica do hospedeiro. Foi utilizada uma abordagem de regressão logística não condicional. As variáveis independentes submetidas à análise univariada, utilizando o *status* de infecção do felino para *M. haemofelis* (0 = negativo; 1 = positivo) como variáveis dependentes, foram a idade, o gênero, a raça, o acesso à rua, a coabitação com mais gatos, comportamento mediante outros gatos e a coinfeção com FIV e/ou FeLV. Essas também foram submetidas a avaliação quanto à colinearidade, e não foram encontradas correlações significativas. As variáveis independentes foram testadas utilizando o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Todas

as variáveis independentes com  $p < 0,20$  na análise univariada foram consideradas para análise multivariada. Todas as interações bidirecionais entre variáveis nos modelos finais foram avaliadas quanto ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  utilizando o *software* e IBM® SPSS® *Statistics*, versão 25.

Para a caracterização da idade, avaliação clínica e hematológica os gatos foram divididos em três grupos a partir da amostra original: Grupo 1: positivo no teste de PCR para *M. haemofelis*; Grupo 2: animais coinfectados por *M. haemofelis* e FeLV; e Grupo 3 (controle): gatos negativos para *M. haemofelis* e clinicamente saudáveis. No grupo 3 foram mantidos somente os gatos provenientes de avaliações para castração, doação de sangue e consultas de rotina que não apresentavam alterações no exame físico ou sequer foram positivos para algum dos três agentes relatados. Animais coinfectados com FIV foram excluídos dessa análise. Foi utilizado o teste de medianas, em que os dados inicialmente foram submetidos à análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk, e as variáveis não paramétricas foram então submetidas ao teste de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks e método de Dunn's ( $p < 0,05$ ). Os dados gerados foram analisados no software estatístico *Sigmaplot*®, versão 12.5.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Avaliação Epidemiológica

Das 274 amostras foi obtida prevalência total de 6,57% (18/274) (IC de 95% 3,63-9,49%) para *M. haemofelis*. Entre os positivos para *M. haemofelis*, 33,33% (6/18) foram positivos também para FeLV, 5,55% (1/18) para FIV e 5,55% (1/18) para os dois retrovírus. A distribuição de gatos amostrados, de acordo com as variáveis epidemiológicas e a positividade para *M. haemofelis*, está expressa na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise descritiva da amostra (n=274) de acordo com variáveis epidemiológicas e a positividade para *Mycoplasma haemofelis* em uma população hospitalar de gatos no Planalto de Santa Catarina, Brasil.

Variáveis	Grupos	Número de gatos por grupo (%)	Positividade para <i>Mycoplasma haemofelis</i> (%)
<b>Raça</b>	SRD	243 (88,69)	15 (5,47)
	Puras	31 (11,31)	3 (1,09)
<b>Sexo</b>	Macho	114 (41,60)	15 (5,47)
	Fêmea	160 (58,40)	3 (1,09)
<b>Castração</b>	Sim	125 (45,62)	7 (2,55)
	Não	148 (54,01)	11 (4,01)
<b>Acesso à rua</b>	Sim	182 (66,42)	15 (5,47)
	Não	92 (33,57)	3 (1,09)
<b>Coabita com gatos</b>	Sim	163 (59,49)	9 (3,28)
	Não	109 (39,78)	9 (3,28)
<b>Agressividade</b>	Sim	115 (41,97)	8 (2,92)
	Não	152 (55,47)	10 (3,65)
<b>Coinfecção com FeLV</b>	Sim	61 (22,26)	7 (2,55)
	Não	213 (77,74)	11 (4,01)
	Sim	16 (5,84)	2 (0,73)
<b>Coinfecção com FIV</b>	Não	258 (94,16)	16 (5,84)

SRD: sem raça definida.

Com relação aos cuidados dispensados pelos tutores aos seus gatos foi obtido que para 40% (4/10) do Grupo 1 e 33,33% (2/6) do Grupo 2, o momento da inclusão do estudo também foi a primeira consulta ao médico veterinário. Tinham o hábito de procurar serviço veterinário somente quando o animal apresentava alguma doença em 30% (3/10) dos tutores no Grupo 1 e 50% (3/6) do Grupo 2; 30% (3/10) do Grupo 1 e apenas 16,66% (1/6) do Grupo 2 submetiam o felino a consultas de rotina no mínimo uma vez ao ano. No Grupo 1, 40% (4/10) recebiam medicação para controle de ectoparasitas; no Grupo 2, somente 16,66% recebiam a medicação.

Pode-se observar, com relação ao local de origem dos felinos amostrados, que no Grupo 1 20% (2/10) foram adotados e eram provenientes das ruas e nenhum no Grupo 2, 30% (3/10) do Grupo 1 foram obtidos em outro domicílio e no Grupo 2 nenhum gato, do Grupo 1, 20% (2/10) e 66,66% (4/6) do Grupo 2 nasceram na mesma casa aonde habitam e que 30% (3/10) do Grupo 1 e somente 33,33% (2/6) do Grupo 2 foram comprados de criadores ou em estabelecimentos veterinários.

Com relação à idade foi obtida diferença estatística significativa ( $p=0,042$ ) entre o Grupo 1 e o Grupo controle, sendo o Grupo 1 composto por animais significativamente mais velhos. Os valores obtidos na análise estatística podem ser observados na Tabela 2. O felino

com infecção concomitante por *M. haemofelis*, FIV e FeLV tinha 1,5 anos no momento do diagnóstico e o felino com infecção concomitante por *M. haemofelis* e FIV tinha 5 anos.

Tabela 2 - Distribuição da idade dos gatos (n=274) de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina, Brasil, considerando o status de infecção para *Mycoplasma haemofelis*.

Grupos	Média±desvio padrão	Idade (meses)			Grupos versus Controle	p	Grupo 1 versus Grupo 2
		Mediana	25%	75%			
Grupo 1	73,2 (±66,74)	36	24	60	0,042*	0,155	
Grupo 2	30 (±10,39)	33	12	36	0,871	-	
Controle	42,94 (±36,33)	18	10	36	-	-	

Grupo 1: positivos para a infecção por *Mycoplasma haemofelis*; Grupo 2: positivos para *M. haemofelis* e FeLV; Controle: gatos saudáveis; \*diferença estatística significativa entre os grupos.

Na análise univariada e na multivariada foi obtida associação estatística significativa entre a infecção por *Mycoplasma haemofelis* e o gênero, sendo que gatos machos tem sete vezes mais chance de ser positivo. Os demais fatores não apresentaram significância estatística. Os resultados da análise de regressão logística para os fatores associados e a positividade para *M. haemofelis* podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Razão de chance e valores de *p* estimados pela análise de regressão logística para fatores associados a positividade para *Mycoplasma haemofelis* em uma população hospitalar de gatos do Planalto de Santa Catarina, Brasil.

Fator associado		Univariada		Multivariada	
		Valor de <i>p</i>	OR (IC:95%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC:95%)
<b>Raça</b>	SRD	0,72	0,61 (0,17-2,25)	-	-
	Puras	-	-	-	-
<b>Sexo</b>	Macho	<0,001 <sup>a</sup>	7,93 (2,24-28,09)	0,003 <sup>a</sup>	7,07 (1,97-25,34)
	Fêmea	-	-	-	-
<b>Castração</b>	Sim	-	-	-	-
	Não	0,72	1,35 (0,51-3,60)	-	-
<b>Acesso à rua</b>	Sim	0,19	2,66 (0,75-9,45)	0,21	2,26 (0,61-8,25)
	Não	-	-	-	-
<b>Coabitação com gatos</b>	Sim	0,52	0,649 (0,25-1,70)	-	-
	Não	-	-	-	-
<b>Agressividade</b>	Sim	0,90	1,06 (0,40-2,78)	-	-
	Não	-	-	-	-
<b>Coinfecção com FeLV</b>	Sim	0,14	2,38 (0,88-6,43)	0,30	1,71 (0,612-4,83)
	Não	-	-	-	-
<b>Coinfecção com FIV</b>	Sim	0,64	2,16 (0,45-10,34)	-	-
	Não	-	-	-	-

OR: Odds ratio ou razão de chance; IC: intervalo de confiança; <sup>a</sup>: representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos.

### 4.3.2 Avaliação Clínica

Dos 274 animais que compunham a amostra original, 85 se encaixaram aos perfis estabelecidos para a avaliação clínica e hematológica. Constituíram o Grupo 1, 10 felinos que foram positivos para *M. haemofelis*. O Grupo 2 foi constituído por seis gatos coinfectados por *M. haemofelis* e FeLV, já o Grupo 3 (controle) foi formado por 67 animais sem alterações clínicas.

Dos animais que compreendem o Grupo 1, apenas um gato apresentou alteração clínica relacionada à micoplasmose que foi a palidez de mucosa que refletiu em anemia, provavelmente arregenerativa. Seis gatos tinham alterações clínicas não correlacionadas à micoplasmose. Foram observadas dermatopatias (3/10), decorrentes de lesões pruriginosas devido à dermatite alérgica à saliva da pulga (DASP) (1/3), laceração de pele (1/3) e nódulo subcutâneo (1/3) de diagnóstico inconclusivo; doença do trato urinário inferior dos felinos (DTUIF) (2/10); complexo gengivite estomatite felino (CGEF) (1/10), e os demais foram atendidos para consultas de rotina (3/10).

Os animais do Grupo 2 apresentaram no momento da inclusão do estudo as seguintes alterações clínicas: palidez de mucosa (2/6) em decorrência de anemia arregenerativa (1/2) e de anemia regenerativa (1/2); DASP (1/6); linfoma extranodal (1/6), localizado em cavidade nasal e região periorbital, alteração neurológica de causa indeterminada (1/6). Um gato não tinha alteração e a consulta foi de rotina.

Para os casos considerados separadamente, o felino diagnosticado com infecção concomitante por *M. haemofelis*, FIV e FeLV não apresentou alterações no exame físico. O gato coinfectado por *M. haemofelis* e FIV estava magro e foi diagnosticado com complexo gengivite estomatite felina (CGEF). Os sinais clínicos observados nos animais do grupo 1 e 2 estão descritos no APÊNDICE A.

### 4.3.3 Avaliação Hematológica

O felino com infecção concomitante por *M. haemofelis*, FIV e FeLV e com infecção concomitante por *M. haemofelis* e FIV, os resultados estavam dentro dos valores de referência para a espécie e não foram considerados na análise estatística.

No hemograma, foi encontrado diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre as medianas para a concentração de hemoglobina, volume globular e contagem de neutrófilos bastonetes do Grupo 3 (Controle) em relação aos Grupos 1 e 2. As medianas obtidas para concentração de hemoglobina e volume globular foram significativamente menores que no Grupo 3, enquanto para contagem de neutrófilos bastonetes foi maior. Também foi observado

diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as medianas para o volume globular médio (VGM) e a contagem de linfócitos entre os Grupos 2 e controle, sendo que para VG a mediana foi significativamente maior no grupo 2 e a contagem de linfócitos foi menor. Ainda, foi observado diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem de eritrócitos entre os Grupos 1 e 2, e do Grupo 2 com o Controle. Em ambos os casos a mediana obtida para o Grupo 2 foi menor. Os valores de mediana e de  $p$  obtidos na análise estatística podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Hemograma dos gatos infectados por *Mycoplasma haemofelis* (Grupo 1), *Mycoplasma haemofelis* e FeLV (Grupo 2) e negativos saudáveis (controle) oriundos de uma população hospitalar do Planalto de Santa Catarina.

Variável hematológica	Controle n=67		Grupo 1 n=10		p (vs. controle)	Grupo 2 n=6		p (vs. controle)	Grupo1 vs. Grupo2 p
	Md	25%-75%	Md	25%-75%		Md	25%-75%		
Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8,73	8,02-9,31	7,85	6,57-8,85	0,211	7,07	2,63-8,45	0,002*	0,023*
Hemoglobina (g/dL)	12,4	11,47-13,2	10,95	9,65-11,82	0,004*	10,5	4,4-11,7	0,002*	0,123
VG (%)	40	36-42	36	30-38	0,014*	35	13-38	0,005*	0,21
VGM (fL)	44,9	43,5-47,4	46,95	41,3-52,8	0,558	51,85	46-54,7	0,05*	0,056
CHCM (g/dL)	31	30,3-32	30,65	29,7-35,4	0,689	30,3	29,1-32,4	0,646	1
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	374	306-459	306	229-402	0,227	270	222-450	0,267	0,858
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9,83	8,2-14,4	11,36	7,2-18,1	0,122	9,3	5,8-11,47	0,244	0,109
N. Bast. ( $/\mu\text{L}$ )	0	0-0	0	0-157	0,004*	77,5	0-163	0,001*	0,493
N. Seg. ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5,75	4-7,9	6,8	4-14	0,023	5,82	3,6-8,9	0,659	0,122
Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	3,29	2,4-4,7	1,98	1,52-3,67	0,220	1,32	1-2,6	0,002*	0,129
Eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,82	0,04-1,2	0,2	0-1,2	0,168	0,14	0-1,3	0,137	0,620
Basófilos ( $/\mu\text{L}$ )	0	0-0	0	0-0	0,856	0	0-0	0,342	0,439
Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,16	0-1,82	0,21	0,9-4,6	0,266	0,16	0,01-0,45	0,577	0,913

Md.: mediana; Vs.: versus; VG: volume globular; VGM: volume globular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; N.: neutrófilos; Bast.: bastonetes; Seg.: segmentados; E.: Eritrócitos; \*: indica diferença estatística significativa. <sup>1</sup>valores de referência segundo Weiss e Wardrop (2010).

As frequências das alterações encontradas para cada variável avaliada no hemograma dos grupos 1, 2 e 3 (controle) podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequências das alterações encontradas para cada variável avaliada no hemograma dos gatos positivos para *Mycoplasma haemofelis* (Grupo 1), positivos para *Mycoplasma haemofelis* e FeLV (Grupo 2) e animais saudáveis (Controle).

Alteração	Grupo 1 (n=10) %	Grupo 2 (n=6) %	Controle (n=67) %
<b>Anemia</b>	10 (1/10)	33,33 (2/6)	0
<b>Trombocitopenia</b>	20 (2/10)	66,66 (4/6)	17,91 (12/67)
<b>Leucocitose</b>	40 (4/10)	0	8,95 (6/67)
<b>Leucopenia</b>	10 (1/10)	16,66 (1/6)	2,98 (2/67)
<b>Neutrofilia</b>	30 (3/10)	0	7,46 (5/67)
<b>Neutropenia</b>	10 (1/10)	0	4,47 (3/67)
<b>Linfocitose</b>	10 (1/10)	0	8,95 (6/67)
<b>Linfopenia</b>	10 (1/10)	16,66 (1/6)	4,47 (3/67)
<b>Eosinofilia</b>	20 (2/10)	33,33 (2/6)	11,94 (8/67)
<b>Monocitose</b>	10 (1/10)	0	4,47 (3/67)

A anemia identificada no Grupo 1 (10%) corresponde ao mesmo animal que apresentou palidez de mucosas, era provavelmente arregenerativa VG: 15% a (contagem de reticulócitos não foi realizada), normocítica e normocrômica. O felino também apresentou trombocitopenia ( $40 \times 10^3/\text{mL}$ ; VR:  $300-800 \times 10^3/\text{mL}$ ), leucopenia ( $1,71 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; VR:  $5,5-19,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutropenia ( $1,42 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; VR:  $2,5-12,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e linfopenia ( $0,23 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; VR:  $1,5-7 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). Na avaliação citológica foi observado as seguintes alterações: leve anisocitose, corpúsculos de Howell-Jolly, neutrófilos tóxicos, corpúsculos de Dohle e macroplaquetas.

No Grupo 2, em 33,33% (2/6) havia anemia, em um dos casos se tratava de anemia regenerativa, VG:9%, contagem de reticulócitos agregados  $106800/\mu\text{L}$ , normocítica, hipocrômica. O felino também apresentava trombocitopenia ( $216 \times 10^3/\text{mL}$ ; VR:  $300-800 \times 10^3/\text{mL}$ ) e na avaliação citológica foi observada: anisocitose, policromatofilia moderadas e corpúsculos de Howell-Jolly; neutrófilos tóxicos e corpúsculos de Dohle; macroplaquetas e agregados plaquetários. O outro caso era uma anemia arregenerativa, VG: 8%, na contagem de reticulócitos  $20720/\mu\text{L}$ , que foi classificado como macrocítica e hipocrômica. O animal apresentou também trombocitopenia ( $156 \times 10^3/\text{mL}$ ; VR:  $300-800 \times 10^3/\text{mL}$ ), leucopenia ( $5,28 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; VR:  $5,5-19,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrofilia ( $0,26 \times 10^3/\mu\text{L}$ ; VR:  $0-0,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), linfopenia ( $1/\mu\text{L}$ ; VR:  $1,5-7 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), eosinofilia ( $0/\mu\text{L}$ ; VR:  $0-1,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e plasma intensamente icterico. Havia intensas anisocitose e policromatofilia, eritrócitos nucleados e corpúsculos de Howell-

Jolly. Foram observados também macroplaquetas, agregados plaquetários e nos neutrófilos corpúsculos de Dohle e neutrófilos tóxicos.

#### 4.4 DISCUSSÃO

O estudo epidemiológico em questão demonstrou prevalência de 6,57% (IC de 95% 3,63-9,49%) para infecção por *M. haemofelis* nos gatos analisados, sendo a porcentagem mais alta obtida entre os trabalhos realizados com o mesmo método de diagnóstico nos outros estados brasileiros, nos quais os valores obtidos variaram de 1,49 a 6,04%. Nas cidades de São Luís (2,5%) (BRAGA et al., 2012), Belém (1,49%) (SINEREY et al., 2013), Cuiabá (2,2%) (MICELI et al., 2013) e Porto Alegre (2,16%) (SANTOS et al., 2014), as prevalências encontradas foram bem mais baixas, este fato pode ser devido à maior circulação de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ nestes locais, que são agentes menos patogênicos e perduram por mais tempo no organismo (FOLEY et al., 1998). Estudos realizados em Santa Maria (4,17%) (PETRY et al., 2020), Rio de Janeiro e região metropolitana (4,6%) (RAIMUNDO et al., 2016) e na cidade do Rio de Janeiro (6,04%) (MACIEIRA et al., 2008), relataram prevalências semelhantes à do presente estudo. Alguns trabalhos analisaram as três espécies de micoplasmas que afetam os felinos como um todo, obtendo assim a prevalência de infecção por *Mycoplasma* sp. (8,9%, 95% IC: 3,9–16,7%) em gatos e não somente de *M. haemofelis* (MARCONDES et al., 2018).

As diferenças das frequências de infecção por *M. haemofelis* encontradas nos trabalhos realizados no Brasil, podem ter relação com as diferenças no tipo de população estudada, além disso, parece existir diferença geográfica relacionada à infecção pelos micoplasmas hemotrópicos, já que o país possui dimensões continentais com muitas variações climáticas, influenciando assim a frequência de vetores, agentes infecciosos e doenças concomitantes (SANTOS et al., 2014).

Ao que se refere a influência do gênero sobre a infecção por *M. haemofelis*, observou-se associação estatística nos machos, possibilitando o felino ter sete vezes mais chance de se infectar. Essa associação com o gênero também foi observada em outros trabalhos (TASKER et al., 2004; ROURA et al., 2010; STOJANOVIC & FOLEY, 2011; JENKINS et al., 2013; PETRY et al., 2020). Santos et al. (2014) relacionaram que gatos machos e com acesso à rua apresentaram maior prevalência de infecção por hemoplasmas, provavelmente devido ao estilo de vida mais agressivo e maiores ocorrências de brigas e arranhaduras. Esta relação foi desencorajada por Martinez-Diaz et al. (2013), ao sugerir que os fatores idade, gênero e raça não são fatores predisponentes à infecção por hemoplasmas. Sykes (2010) ao reportar episódios

de micoplasmose em gatos machos após brigas, ratifica também que hábitos de deambulação e brigas, que são mais comuns nos machos, sejam fatores associados à infecção por *Mycoplasma* sp. Este dado foi sustentado por Willi et al. (2007) após realizarem infecção experimental por meio da inoculação, e identificar a presença do material genético de *Mycoplasma* sp. em saliva, glândula salivar, mucosa oral e fezes de felino, levando a crer que o contato agressivo entre gatos tenha papel na transmissão deste organismo.

No presente estudo em 83,33% (15/18) dos gatos positivos, apresentavam acesso à rua, no entanto na análise estatística não foi um fator associado à infecção por *M. haemofelis*. Este resultado pode ter relação com o tipo de população amostrada, já que quase 70% possuíam acesso à rua. No Grupo 1, 60% não fazia controle de ectoparasitos e este dado foi ainda maior no Grupo 2, 83,33%. Esses felinos são submetidos a mais estressores ambientais, e entre eles aos ectoparasitos e por este motivo poderiam apresentar predisposição à infecção (TASKER et al., 2003; SYKES et al., 2008).

Em alguns estudos observaram maior prevalência da infecção em felinos jovens (SYKES et al., 2008; PETRY et al., 2020), isto pode estar associado à imunidade ainda imatura que os animais jovens apresentam (DUARTE et al., 2015). Assim como observado neste trabalho, outros estudos descrevem uma maior relação com idade mais avançada e a infecção por *M. haemofelis*, fazendo com que a infecção crônica tenha maior importância no decorrer da vida do animal e fazendo com que estes permaneçam propagando o agente no estado de portador por vários anos (SANTOS et al., 2014). Já em trabalho realizado por Macieira et al. (2009) ao avaliarem a infecção por *M. haemofelis* e/ou '*Candidatus M. haemominutum*', não houve diferença significativa na idade dos gatos positivos. Em Santa Catarina, um estudo avaliou a causa de óbitos em gatos do planalto catarinense necropsiados no período de 1995 a 2015 demonstrou a micoplasmose felina como uma das principais doenças causadas por bactérias, sendo responsável pelo óbito de 7,33% (20/273) dos animais avaliados que morreram em decorrência de doença infecciosa e essa foi mais relatada em gatos machos adultos (55%; 11/20) (WITHOEFT et al., 2019).

No presente estudo, 50% dos gatos positivos para *M. haemofelis* estavam coinfectados com FeLV e/ou FIV e 38,9% estavam coinfectados com FeLV, no entanto na análise estatística as retrovíroses não foram consideradas fatores associados a infecção por *M. haemofelis*. Muitos trabalhos descrevem as retrovíroses como fator predisponente da micoplasmose (HORA, 2008; MACIEIRA, 2008; ROURA et al., 2010; JENKINS et al., 2013; MARTINEZ-DIAZ et al., 2013), especialmente a FeLV, por comprometer o sistema imunológico do animal e levar a infecções secundárias ou ativas a infecção latente (TASKER & LAPIN, 2002; LURIA et al.,

2004). O presente estudo utilizou os mesmos gatos do estudo de Biezus et al. (2019a) que também encontrou o gênero masculino e a agressividade como fator associado à infecção por FeLV. Para FIV, houve associação com gatos machos, agressivos e mais velhos. As condições de criação dos felinos dessa região do estudo são precárias, os métodos de controle e prevenção de doenças infecciosas são pouco difundidos, indicado pela baixa frequência que os animais são levados para atendimento veterinário. Em sua maioria não eram castrados, tinham livre acesso à rua e coabitavam com outros gatos, sendo que estas características poderiam ter facilitado a disseminação de patógenos.

Dos animais do Grupo 1, 60% foram atendidos por causas não correlatas à micoplasmose, a positividade foi um dado encontrado ao acaso e ausente de manifestações clínicas, o mesmo foi reportado por Biondo et al., (2009) ao revisar estudos moleculares dentro do território brasileiro que caracterizaram a ocorrência de hemoplasmas. Em trabalho realizado por Petry et al. (2020) não se observou sinais clínicos que fossem apenas em decorrência da micoplasmose nos gatos positivos para *M. haemofelis*. Apenas uma animal do presente estudo apresentou palidez de mucosa sustentada pela anemia que possivelmente seria arregenerativa, podendo ter relação com a infecção por *M. haemofelis*. No Grupo 2 33,33% (2/6) dos gatos apresentaram alterações clínicas relacionadas tanto à FeLV quanto ao *M. haemofelis*, este trabalho corrobora com Harrus et al., (2002) ao afirmar que a infecção por *M. haemofelis* associada ao FeLV resulta em quadro clínico mais grave do que o observado quando apenas *M. haemofelis* está presente, e FIV por outro lado associado ao *M. haemofelis* não parece desencadear anemia mais grave do que a encontrada nas infecções isoladas destes organismos.

Das espécies de micoplasmas felinos, sabe-se que *M. haemofelis* é o mais patogênico, podendo levar à anemia grave e desenvolvimento de sinais clínicos, mesmo sem infecção concomitante (MESSICK, 2004). Há estudos que reportam que quando há ausência de anemia o comum não é se suspeitar de *M. haemofelis*, mas de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’, pois estes últimos são agentes de baixa patogenicidade e possuem maior capacidade de sustentar a infecção sem que leve à doença grave, apesar de diversos trabalhos indicarem anemia ou VG reduzido como fatores associados para infecções por todos os hemoplasmas em gatos (JENSEN et al., 2001; HARRUS et al., 2002; TASKER et al., 2003; KEWISH et al., 2004). O presente trabalho não demonstra essa associação, pois a maioria dos gatos positivos não apresentaram alterações clínicas ou hematológicas. Tal fato também foi relatado por Willi et al. (2007) em estudo realizado na Suíça, Jenkins et al. (2013) na Nova Zelândia e Martinez-Diaz et al. (2013) em Portugal. A ausência de anemia em 90% dos gatos do Grupo 1 pode ter relação com a presença de portadores crônicos de *M. haemofelis*. Alguns

estudos afirmam que a ausência de alterações hematológicas tem relação entre a bactéria e o hospedeiro que podem ter atingido o equilíbrio, em que a replicação do agente se estabiliza pela fagocitose e eliminação do organismo, assumindo baixa carga bacteriana (DUARTE et al., 2015; SANTOS et al., 2014). Assim sendo, justifica o baixo número de alterações hematológicas encontradas na população estudada em que apenas três felinos apresentaram anemia e dois desses tinham coinfeção por FeLV.

No eritrograma, as medianas para contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito dos gatos de todos os grupos apesar dos valores mais baixos descritos serem identificados nos grupos 1 e 2. O VGM também se apresentou dentro do intervalo de referência para os Grupos 1, 2 e controle. Nos valores de CHCM houve pequena diferença entre os grupos, sendo que o grupo controle permaneceu com valores dentro do intervalo de referência, enquanto nos Grupos 1 e 2 foram limítrofes. Pode-se observar valores decrescentes de plaquetas conforme a implicância clínica dos grupos, maior no controle, menores no Grupo 1 e ainda mais baixos no Grupo 2, sustentando os dados da literatura que colocam a trombocitopenia entre as principais alterações hematológicas causadas pelo vírus da FeLV (GLEICH & HARTMANN, 2009). Biezus et al. (2019b) cita a trombocitopenia, como a segunda alteração hematológica mais observada, em gatos positivos para FeLV provenientes de uma população hospitalar. Apesar de relatada associação entre a trombocitopenia e a infecção por *M. haemofelis* em gatos amostrados por Hora (2008), alterações em contagens de plaquetas e leucócitos não são consistentes com infecções por hemoplasmas (SYKES, 2003; TASKER, 2004). A trombocitopenia observada em 20% dos gatos no Grupo 1, não apresentou diferença estatística do Grupo controle e não demonstra ter correlação com a infecção por *M. haemofelis*. A trombocitopenia identificada nestes animais pode ser devido à intensa pulicose em um dos gatos e o outro estava em estado extremamente debilitado, caquético e desidratação de 8%. O mesmo foi relatado por Raimundo et al. (2016), em que afirma que a trombocitopenia deve ser relacionada a outras causas, sendo que a bactéria não afeta plaquetas e sim eritrócitos (TASKER, 2004).

Não se tem um padrão definido para alterações em leucograma e infecção por micoplasmas hemotrópicos, este pode variar de leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo à leucopenia (MESSICK, 2004), quando os felinos ficam muito debilitados em decorrência da infecção, ainda que observado em apenas um dos felinos positivos deste estudo, a presença de monócitos ativados em alguns animais é relatada (MESSICK, 2004). No leucograma, as medianas da contagem de linfócitos foram menores no Grupo 2, que também é citada como uma alteração frequente nos felinos FeLV positivos

(HOFMANN-LEHMANN, 1997), em especial devido ao processo de replicação viral ativo ou mesmo de forma secundária, em decorrência do ato de colheita propriamente dito que é muitas vezes dificultoso (GLEICH & HARTMANN, 2009). Apesar de não observar diferença estatística na análise das médias, Biezus et al. (2019b) ao avaliar cada felino de forma individual, observou a linfopenia como alteração leucocitária mais prevalente para os grupos de animais saudáveis e doentes positivos para FeLV. Já na contagem de eosinófilos, o Grupo 1 teve a menor mediana, porém o resultado permaneceu dentro do intervalo de referência. Este dado pode corroborar com a hipótese que os animais deste Grupo apresentavam infecção de caráter crônico (RAIMUNDO et al., 2016; PETRY et al., 2020). Os valores de mediana para as demais variáveis permaneceram dentro do intervalo de referência.

O diagnóstico molecular das micoplasmoses vem sendo cada vez mais difundido na rotina clínica, e a análise citológica do esfregaço sanguíneo, um método pouco sensível e específico para esta finalidade, é o método de primeira escolha (SYKES, 2010). Para nenhum dos animais que compunham o presente estudo foi solicitado pelo clínico a pesquisa de hemoparasitas de uma forma específica, o que pode ser explicado pela baixa bacteremia encontrada nos animais em fase de portador da infecção. Se presente em maior quantidade poderia se observar a bactéria durante os processos rotineiros de contagem diferencial de leucócitos, reticulócitos e estimativa de plaquetas, porém o mais indicado para o sucesso da técnica seria a realização do esfregaço a partir de amostra de sangue de ponta de orelha (TASKER, 2010). Entretanto, em 40% dos gatos positivos para *M. haemofelis* foram observados corpúsculos de Howell-Jolly, que é uma alteração que pode ser confundida com a estrutura bacteriana, além disso, as amostras de rotina foram colhidas com o anticoagulante EDTA, que pode ter promovido o desprendimento dos hemoplasmas na superfície dos eritrócitos, contribuindo para resultados falso-negativos (SYKES et al, 2010; TASKER, 2010).

A PCR apresenta alta sensibilidade na identificação de gatos positivos para *M. haemofelis*, no entanto não é possível diferenciar animais doentes de portadores. Portanto o resultado da PCR deve sempre ser respaldada pela análise clínica e hematológica (TASKER & LAPPIN, 2002). Neste trabalho, dentre os animais do Grupo 1, apenas um gato teve alterações que justificariam o tratamento clínico.

#### 4.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho a prevalência de *M. haemofelis* foi a maior encontrada entre os estudos realizados no país. Gênero e idade foram os únicos fatores associados à infecção, possibilitando maior risco de infecção aos machos adultos.

Metade dos gatos positivos para *M. haemofelis* estava coinfestado por Retrovírus, este dado associado ao livre acesso à rua da grande maioria dos animais revelando a necessidade da implementação de campanhas de controle e prevenção, focadas na conscientização dos tutores.

As alterações clínicas mais encontradas nos gatos positivos para *M. haemofelis* foram em decorrência de causas não correlacionadas com a micoplasmose, tornando a infecção um achado diagnóstico para a maioria dos animais positivos.

Entre as alterações hematológicas foram constatadas baixas concentrações de hemoglobina e valor de volume globular. A baixa correlação entre as alterações hematológicas e sinais clínicos com casos positivos, leva à compreensão de que *M. haemofelis*, por vezes passa despercebido, evidenciando a circulação do agente na população estudada.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

ABINPET- **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação.**

Disponível em: < [http://abinpet.org.br/infos\\_gerais/](http://abinpet.org.br/infos_gerais/)>. Acesso em: 26 de jun. 2021.

ALLEMAN, A. R. et al. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1474-1479, 1999.

ALLISON, R. W.; HOOVER, E. A. Covert vertical transmission of feline immunodeficiency virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 19, n. 5, p. 421-434, 2003.

ALMEIDA, N. R. et al. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v.14, n. 8, p. 583-586, ago. 2012.

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

AUGUST, J. R. Moléstias virais felinas. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, cap. 48. p. 340-346, 1992.

AZEVEDO, P, S, M. **Avaliação da ocorrência de coinfeção de FIV, FeLV e micoplasmas hemotrópicos (*Mycoplasma haemofelis* e *M. haemominutum*) em gatos domésticos na zona norte de Portugal.** 2017. 45 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade do Porto, 2017.

BARKER, E. N. et al. Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2011.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 3657-3662, jun. 2003.

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**, v. 59, p. 1215-1220, 1998.

BEUGNET, F.; MARIÉ, J. L. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 298-305, 2009.

BEUGNET, F.; HALOS, L. Parasitoses & Vector Borne Diseases of Cats, **Vector Borne Diseases of Cats**. 1. Ed, Merial, Lyon, France. p. 250-257, 2015.

BIEZUS, G. et al. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil.

**Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, p. 17-21, 2019a.

BIEZUS, G. et al. Alterações clínicas e hematológicas em gatos com infecção natural e progressiva pelo vírus da leucemia felina (FeLV). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, p. 1629, 2019b.

BIONDO, A. W.; SANTOS A. P.; GUIMARÃES A. M; et al. A review of the occurrence of hemoplasmas (*Hemotropic mycoplasmas*) in Brazil. **Veterinary Brazilian Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 1-7, 2009.

BJOMVAD, C. R. et al. Evaluation of a nine-point body condition scoring system in physically inactive pet cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 433-437, 2011.

BOBADE, P. A.; NASH, A. S. A comparative study of the efficiency of acridine orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. **Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 1-2, p. 169-172, 1987.

BRASIL. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saúde: 2019: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde: Brasil, grandes regiões e unidades da federação** / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 85 p.

CARNEY, H. C.; ENGLAND, J. J. Feline hemobartonellosis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 79-90, 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(93\)50005-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(93)50005-0)> Acesso em: 20 jun. 2021.

CENTONZE, L. A.; LEVY, J. K. Characteristics of free-roaming cats and their caretakers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 11, p. 1627-1633, 2002.

CRISTO, T. G. et al. Feline leukaemia virus associated with leukaemia in cats in Santa Catarina, Brazil. **Journal of comparative pathology**, v. 170, p. 10-21, 2019a.

CRISTO, T. G. et al. Feline lymphoma and a high correlation with feline leukaemia virus infection in Brazil. **Journal of comparative pathology**, v. 166, p. 20-28, 2019b.

DUARTE, A. et al. Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, p. 516-522, 2015.

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

GLEICH, S. E; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 985-992, 2009.

GUIMARAES, A. M. S. et al. Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas. **PLoS ONE**, v. 3, p. 9, 2014.

HAEFNER, M. et al. Identification of *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) in Captive Nondomestic Cats Published by: **American Association of Zoo Veterinarians**, v. 34, n. 2, p. 139-143, 2015.

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

HARVEY, J. W. Hemotrophic Mycoplasmoses. In: Greene, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. Missouri: Elsevier, p. 252-260, 2006.

HICKS, C. A. E. et al. Protective immunity against infection with *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 1, p. 108-118, 2015.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, n. 1, p. 33-42, 1997.

HORA, A. S. **Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

JENKINS, K. S.; DITTMER, K. E.; MARSHALL, J. C.; TASKER, S. Prevalence and risk factor 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.

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

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

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

LURIA, B. J. et al. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 5, p. 287-296, 2004.

MACIEIRA, D. B. **Hemoplasmas em gatos domésticos: prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus da imunodeficiência e/ou leucemia felinas**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

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

MARCONDES, M. et al. Infection by *Mycoplasma spp.*, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2018.

MARTÍNEZ-DÍAZ, V. L. et al. Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 10, p. 879-885, 2013.

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

MUNHOZ, A. D. et al. Hemotropic mycoplasmas in naturally infected cats in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 4, p. 446-454, 2018.

NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and “*Candidatus Mycoplasma wenyonii*”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 891-899, 2001.

NEVES, A. C. **Prevalência de base hospitalar de *Mycoplasma haemofelis* tendo por base um hospital veterinário na Cova da Piedade - Almada**. 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

NOVACCO, M. et al. Chronic ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ infection. **Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, n. 1, p. 59, 2011.

PAGE, R. L. Hematologia/oncologia: hemácias, leucócitos e plaquetas. In: Bichard S.J. & Sherding R.G. (Eds.), **Manual Saunders, Clínica de Pequenos Animais**, 2. ed., Philadelphia: SAUNDERS, W. B. p. 165-183, 2003.

PEREIRA, D. A. **Prevalência de hemoparasitos em felinos domésticos da micro região de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil e correlação com variáveis epidemiológicas**. 2018. Dissertação (Mestrado em imunologia e parasitologia aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

PETERS, I. R. et al. RNase P RNA gene (rnpB) phylogeny of hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1873-1877, 2008.

PETRY, L. S. *et al.* Hemotropic mycoplasma in domestic cats from the central region of Rio Grande do Sul state, Brazil. **Ciência Animal**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2020.

QUINN P. et al. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 1. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. p. 373-634.

RAIMUNDO, J. M et al. Hematological changes associated with hemoplasma infection in cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 441-449, 2016.

RAMSEY I. K.; TENNANT B. J. Sistema linfopoético e linforeticular. In: RAMSEY I. K.; TENNANT B. J. (Eds.). **BSAVA - Manual de Doenças Infeciosas em Cães e Gatos**, 2. Ed. São Paulo: Roca, 2010. p. 7-70.

RAVAGNAN, S. et al. Prevalence and molecular characterization of canine and feline hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in northern Italy. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2017.

RIKIHISA, Y. et al. 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, n. 4, p. 823–829, 1997.

RIVETTI-JÚNIOR, A. V. **Retrovíroses, *Toxoplasma gondii* e *Mycoplasma haemofelis* em gatos errantes e felinos selvagens do zoológico de Belo Horizonte-MG**. 2006. p. 38. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais ,2006.

ROURA, X. et al. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 270-274, 2010.

SANTOS, A. P. et al., Hemoplasma prevalence and hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations from southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 428-434, 2014.

SPADA, E. et al. Prevalence of Hemoplasma Infections in stray cats in northern Italy.

**Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 6, p. 483-490, 2014.

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

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1157-70, 2010.

SYKES, J. E.; TERRY, J. C.; LINDSAY, L. L.; OWENS, S. D. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 3, p. 372-379, 2008.

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

TASKER, S. Hemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medical Surgery.**, v. 12, n. 5, p. 369-381, 2010.

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

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

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd.,p. 229. 2007.

WEISS, D. J.; WARDROP K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2010. p. 1206.

WILLI, B. et al. Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: Transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v. 152, n. 5, p. 237-244, 2010.

WILLI, B. et al. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3798–3802, 2007.

WITHOEFT, J. A. et al. Causes of death and euthanasia in domestic cats in the Santa Catarina plateau (1995-2015). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 192-200, 2019.

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* infections. **Clinical and vaccine immunology**, v. 17, p. 1917-1925, 2010.

WOODS, J. E. et al. Evaluation of experimental transmission of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 66, n. 6, p. 1008-1012, 2005.

**APÊNDICE A** - Sinais clínicos observadas no exame físico dos gatos oriundos de uma população hospitalar infectada por *Mycoplasma haemofelis* (grupo 1) e com coinfeção por *Mycoplasma haemofelis* e FeLV.

<b>Sinais clínicos</b>		<b><i>M. haemofelis</i> positivos; (n=10)</b>	<b><i>M. haemofelis</i> e FeLV; (n=6)</b>
<b>Alteração comportamental</b>	Apatia		3
<b>Cardiovascular</b>	Desidratação	5	4
	Sopro		1
<b>Gastrointestinal</b>	Anorexia ou hiporexia		3
	Cálculo dentário	3	
	Constipação		1
	Diarreia		2
	Emese		1
<b>Geniturinário</b>	Vesícula urinária distendida	2	
	Anúria	2	1
<b>Linfoadenomegalia</b>	Submandibular		1
<b>Musculoesquelético</b>	Claudicação		
<b>Neurológico</b>	Paresia de membros pélvicos		1
<b>Pele e mucosas</b>	Feridas cutâneas	2	
	Prurido	1	1
	Pulicose	1	1
	Hipotricose		1
	Mucosas ictéricas		2
	Mucosas pálidas	1	1
	Massa ou nódulo em pele	1	
	Secreção ocular		1
<b>Respiratório</b>	Aumento e assimetria nasal		1
	Secreção nasal		1
	Dispneia		1
	Taquipneia		1
<b>Temperatura corporal</b>	Hipotermia	4	
<b>Escore corporal</b>	Caquético	1	
	Magro	3	1
<b>Outros</b>	Desconforto abdominal	1	1