



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

MAÍRA GONÇALVES DA MOTA LIMA

**OCORRÊNCIA DE HEMOPLASMAS EM GATOS DO DISTRITO FEDERAL E
SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS**

BRASÍLIA
2013

MAÍRA GONÇALVES DA MOTA LIMA

**OCORRÊNCIA DE HEMOPLASMAS EM GATOS DO DISTRITO FEDERAL E
SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS**

**Monografia apresentada para a
conclusão do Curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Giane Regina
Paludo**

**Brasília
2013**

Lima, Maira Gonçalves da Mota

Ocorrência de hemoplasmas em gatos do Distrito Federal e suas alterações laboratoriais. / Maira Gonçalves da Mota Lima; orientação de Giane Regina Paludo – Brasília, 2013.

36f. : il.

Monografia – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Micoplasmas 2. Felinos 3. Diagnóstico 4. Hemograma

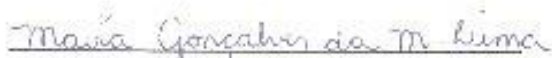
Cessão de Direitos

Nome do autor: Maira Gonçalves da Mota Lima

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Ocorrência de hemoplasmas em gatos do Distrito Federal e suas alterações laboratoriais.

Ano: 2013

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.



Maira Gonçalves da Mota Lima

Nome do autor: LIMA, Maíra Gonçalves da Mota

Título: Ocorrência de hemoplasmas em gatos do Distrito Federal e suas alterações laboratoriais.

Monografia de Conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Aprovado em: 25 de julho de 2013

Banca examinadora

Profª Drª Giane Regina Paludo

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: aprovado

Assinatura: Giane Regina Paludo

Profª Dr. Jair Duarte da Costa Junior

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: aprovado

Assinatura: Jair Duarte da Costa Junior

Profª Msc. Larissa Campos Aquino

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADA

Assinatura: Larissa Campos Aquino

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos a mim concedidas, por aliviar meu coração nos momentos difíceis e enchê-lo de alegria nos momentos felizes.

Aos meus pais Ribamar e Magna pela educação, dedicação e amor durante a minha criação, e em especial a minha mãe por despertar em mim o amor aos animais.

Aos meus irmãos Liliane e José pelo carinho e por me fazerem rir das coisas mais bobas.

Ao meu namorado Fernando pela paciência, amizade, carinho e por me dar forças para acreditar que tudo vai dar certo.

Aos meus amigos, em especial Rafaela e Anderson, por me proporcionarem momentos divertidos ao longo da graduação e espero que esses momentos perdurem por toda a vida!

À minha orientadora professora Giane pela orientação e apoio.

À banca por enriquecer meu trabalho.

Às colegas Marcela e Larissa pela ajuda durante o trabalho e aos residentes do laboratório que, além de me ensinarem, me contagiam com o bom humor diário.

Finalmente agradeço àqueles que me fazem sorrir todos os dias com suas brincadeiras e fofuras, cada um com sua particularidade, que abanam seus rabinhos e me lambem mesmo quando estou impaciente ou não dou a atenção que eles merecem, aos meus sempre 'cachorrinhos' Zandara, Holda, Laila, Perseu, Puchuca, Pequeninha, Miudinha, Bravinho, Blanch e Safira. Samantha, Castilho e Djali vocês fazem muita falta!

“Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar.
A coragem contém em si mesma, o poder, o gênio e a magia.”
Goethe

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS	2
2.1. PATOGENIA	5
2.2. SINAIS CLÍNICOS	6
2.3. ACHADOS LABORATORIAIS	7
2.4. DIAGNÓSTICO	8
2.5. TRATAMENTO	10
2.6. HEMOPLASMAS COMO ZONOSSES	10
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	14
6. DISCUSSÃO	18
7. CONCLUSÃO	23
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR – Reação em cadeia da polimerase
qPCR – PCR quantitativa
UnB – Universidade de Brasília
DF – Distrito Federal
RNA – Ácido ribonucleico
16S rRNA – Subunidade 16S do RNA ribossômico
DNA – Ácido desoxirribonucleico
CPDA-1 – Citrato-fosfato-dextrose-adenina-1
FeLV – Vírus da leucemia felina
FIV – Vírus da imunodeficiência felina
HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
IgG – Imunoglobulina da classe G
IgM – Imunoglobulina da classe M
ALT – Enzima alanina amino transferase
AST – Enzima aspartato amino transferase
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
VG – Volume globular
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
VCM – Volume corpuscular médio
PPT – Proteínas plasmáticas totais
GAPDH – Enzima gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase

RESUMO

LIMA, M. G. M. Ocorrência de hemoplasmas em gatos do Distrito Federal e suas alterações laboratoriais (Occurrence of hemoplasma in cats of Distrito Federal and their clinical pathologic alterations). 2013. 36p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) infectam os eritrócitos de gatos podendo levar à anemia. A transmissão ocorre através de vetores hematófagos, transfusão sanguínea e contato direto com secreções. Este estudo teve como objetivo verificar a ocorrência e distribuição da infecção em gatos do Distrito Federal utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) como ferramenta diagnóstica. Foram analisadas 160 amostras obtidas durante a campanha de vacinação pública e de animais atendidos no setor de Clínica Médica do Hospital Veterinário da UnB. Os animais estavam distribuídos em 20 áreas do DF. A PCR detectou a infecção por *Mycoplasma* spp. em 8,75% (14/160) dos felinos distribuídos nas áreas de Asa Norte (7%), Ceilândia (21%), Núcleo Bandeirante (7%), Planaltina (7%), Sobradinho (14%), São Sebastião (7%), Taguatinga (14%), Vicente Pires (7%) e Vila Planalto (14%). Foram encontradas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) no número total de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e proteínas plasmáticas totais entre animais positivos e negativos. Outros achados hematológicos entre os animais positivos foram monocitose, trombocitopenia e anemia. As alterações hematológicas encontradas são compatíveis com a fase aguda da doença, no entanto, como a maioria dos animais positivos apresentaram poucas alterações, acredita-se que uma espécie pouco patogênica esteja envolvida.

Palavras-chaves: Micoplasmas, felinos, diagnóstico, alterações hematológicas.

ABSTRACT

LIMA, M. G. M. Occurrence of hemoplasma in cats of Distrito Federal and their clinical pathologic alterations (Ocorrência de hemoplasmas em gatos do Distrito Federal e suas alterações laboratoriais). 2013. 36p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas) infect erythrocytes of cats and cause anemia. Transmission occurs through hematophagous vectors, blood transfusion and direct contact with secretions. This study aimed to assess the occurrence and distribution of infection in cats in Distrito Federal using the polymerase chain reaction (PCR) as diagnostic. We analyzed 160 samples obtained during the public vaccination and animals attended at the medical clinical of the Veterinary Hospital of UnB. The animals were divided into 20 areas of the DF. The PCR detected *Mycoplasma* spp. at 8.75% (14/160) of felines distributed in the areas of Asa Norte (7%), Ceilândia (21%), Núcleo Bandeirante (7%), Planaltina (7%), Sobradinho (14%), São Sebastião (7%), Taguatinga (14%), Vicente Pires (7%) e Vila Planalto (14%). Were found statistical differences ($p < 0,05$) in the total number of leukocytes, neutrophils, lymphocytes and total plasma proteins between positive and negative animals. Other hematological alterations among positive animals were monocytosis, thrombocytopenia and anemia. The hematologic alterations are compatible with acute phase of the disease, however, as most positive animals showed little alterations, it is believed that a low pathogenic species involved.

Key – words: Mycoplasmas, felines, diagnostic, hematologic alterations.

1. INTRODUÇÃO

Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias Gram negativas que parasitam a superfície dos eritrócitos de várias espécies mamíferas (BIONDO et al., 2009; MESSICK, 2004). Nos gatos podem induzir Anemia Infecciosa Felina, doença cujo agente envolvido é o *Mycoplasma haemofelis* (MESSICK & HARVEY, 2011; SYKES, 2010). Anteriormente identificado como *Haemobartonella felis*, este organismo recebeu nova nomenclatura após estudos com métodos moleculares do gene 16S rRNA e foi reclassificado como pertencente à classe Mollicutes e ao gênero *Mycoplasma* (NEIMARK et al., 2001).

Além do *M. haemofelis*, outras espécies como *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* infectam os gatos, levando ao aparecimento de sinais clínicos e alterações laboratoriais brandas (MESSICK & HARVEY, 2011).

Hemoplasmas podem ser transmitidos por vetores hematófagos tais como pulgas e carrapatos e, também por fluidos corporais como sangue e saliva contaminados, além da via iatrogênica durante transfusões sanguíneas. A transmissão vertical pode ocorrer no período de gestação (TASKER, 2010).

A patogenia da infecção abrange as fases pré parasitêmica, aguda, de recuperação e crônica. Na fase aguda alguns sinais clínicos estão presentes como apatia, anorexia, letargia, desidratação e palidez de mucosas. A recuperação do animal depende de fatores como imunidade, tratamento e espécie de hemoplasma envolvida, sendo que o mesmo pode tornar-se cronicamente infectado por anos ou até mesmo por toda a vida (MESSICK, 2004; MESSICK & HARVEY, 2011;).

Através de técnicas parasitológicas diretas, como o esfregaço sanguíneo, é possível detectar organismos na superfície dos eritrócitos. Entretanto, algumas estruturas como corpúsculos de Howell-Jolly ou mesmo artefatos podem dificultar o diagnóstico, levando a resultados falso-positivos (TASKER, 2010). A técnica de PCR tem se mostrado um bom método diagnóstico, na qual se pode amplificar um fragmento específico de DNA do agente infeccioso desta forma permitindo sua identificação (MESSICK, 2004).

2. MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS

Micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas são agentes que causam anemia em felinos e outros mamíferos, diferenciando-se dos demais micoplasmas por apresentarem tropismo por eritrócitos (MACIEIRA, 2008; MESSICK, 2004; NEIMARK et al., 2001).

O primeiro hemoplasma felino foi identificado na África do Sul, denominado *Eperithroozoon felis*. Passados dez anos, nos Estados Unidos, foi identificado organismo similar que causava anemia infecciosa em gatos e após estudos sobre a morfologia e multiplicação esse organismo foi alocado à Família Anaplasmataceae, Ordem Rickettsiales e ao gênero *Haemobartonella* (MACIEIRA, 2008; SYKES, 2010). À época haviam duas formas de *Haemobartonella felis*: uma grande, isolada de Ohio, e uma pequena isolada da Califórnia (SANTOS, 2008).

Posteriormente, com auxílio de ferramentas moleculares aplicadas sobre a sequência do gene 16S rRNA, os gêneros *Haemobartonella* e *Eperithroozoon* foram reclassificados e passaram a pertencer à classe Mollicutes e ao gênero *Mycoplasma* (BIONDO et al., 2009; MESSICK, 2004; NEIMARK et al., 2001). Consequentemente a forma grande e patogênica de *H. felis* foi designada *Mycoplasma haemofelis* enquanto a forma pequena e menos patogênica de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (NEIMARK et al., 2001; SANTOS, 2008). Uma terceira espécie de hemoplasma felino foi identificada por Willi et al. em 2005 e nomeada *Candidatus Mycoplasma turicensis* (SYKES, 2010; WILLI et al., 2005), sendo que as espécies que recebem “Candidatus” à sua nomenclatura são novas e com caracterização incompleta (MESSICK, 2004).

Os hemoplasmas são bactérias Gram negativas, pleomórficas, pequenas e com formas que variam de hastes, esferas ou correntes. Esses organismos não invadem o eritrócito permanecendo apenas em sua superfície, porém são dependentes da célula hospedeira para aquisição de nutrientes (ácidos graxos, aminoácidos e vitaminas). À semelhança dos demais membros da classe Mollicutes são desprovidos de parede celular e flagelos, resistentes à penicilina e susceptíveis à tetraciclina e não crescem em meios de cultura. (MESSICK, 2004; SANTOS, 2008).

Hemoplasmas já foram descritos em todos os continentes, exceto na Antártica. No Brasil além de hemoplasmas felino foram descritas outras espécies

que acometem animais domésticos e silvestres, dentre elas os hemoplasmas de suínos (*M. suis*) e camundongos (*M. coccoides*) (BIONDO et al., 2009). Dentre os hemoplasmas que infectam cães foram primeiramente identificados *Mycoplasma haemocanis* e *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Baseado em estudos filogenéticos do gene rRNA 16S notou-se alta similaridade entre *M. haemocanis* e *M. haemofelis* levantando a suspeita de se tratarem da mesma espécie, porém mais tarde, estudos genéticos detalhados verificaram menor similaridade, confirmando se tratarem de espécies diferentes. Os hemoplasmas felinos *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* já foram identificados através de diagnóstico molecular em cães (VALLE, 2011).

A respeito de animais silvestres, estudos em felídeos de vida livre ou mantidos em cativeiro submetidos a testes de PCR, revelaram a presença de hemoplasmas de espécies conhecidas, os mesmos que acometem felinos domésticos (BIONDO et al., 2009).

O modo de transmissão dos hemoplasmas felinos ainda não está totalmente elucidado (SYKES, 2010). Sugere-se que a pulga *Ctenocephalides felis* e algumas espécies de carrapatos sejam potenciais vetores, em virtude de sua atividade hematófaga (MACIEIRA, 2008; SYKES, 2010; TASKER, 2010). Entretanto, sabe-se que animais são infectados mesmo na ausência destes, o que implica na possibilidade de outras formas de transmissão (SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Transfusões sanguíneas representam fontes de transmissão de agentes infecciosos, dentre eles os hemoplasmas. Um estudo avaliou a presença de *M. haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* em sangue armazenado a 4°C com anticoagulante CPDA-1 por um período de um hora, uma semana e um mês. Resultados refletiram a sobrevivência de *M. haemofelis* por até uma hora de armazenamento e de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* por até uma semana. Portanto, recomenda-se a triagem de doadores, excluindo os animais que se mostrarem positivos em exame de PCR (GARY et al., 2006; MACIEIRA, 2008; TASKER, 2010).

A incidência mais alta de hemoplasmas em machos adultos, com acesso a rua sugere que a principal forma de transmissão horizontal aconteça por mordeduras durante brigas, através de sangue e saliva infectada, sendo que a presença de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* na saliva e glândula salivar de gatos infectados já foi verificada experimentalmente (DEAN et al., 2008). A possibilidade

de transmissão vertical da mãe para os filhotes tem sido proposta, contudo faltam estudos se o evento acontece por via transplacentária, no momento do parto ou pela lactação (MESSICK & HARVEY, 2011; TASKER, 2010).

A seguir serão listadas características mais particulares dos principais tipos de hemoplasmas:

Mycoplasma haemofelis pode ser encontrado em esfregaços de sangue na superfície de eritrócitos com tamanho de aproximadamente 0,6 µm com formato de anéis ou hastes e até mesmo formando correntes de três a seis organismos (SYKES, 2010). É dos três hemoplasmas felinos o mais patogênico e associado à doença clínica (TASKER, 2010), provocando anemia hemolítica aguda por destruição de eritrócitos seja por ação direta ou imunomediada (SANTOS et al., 2011). Desencadeia diversos sinais clínicos como febre, letargia, esplenomegalia podendo levar o animal a óbito (SANTOS et al., 2011). Além disso, *M. haemofelis* é um fator agravante nos casos de animais portadores de retrovíroses (MACIEIRA, 2008).

Candidatus Mycoplasma haemominutum é um pequeno hemoplasma com aproximadamente 0,3 µm de diâmetro que causa sinais clínicos brandos ou mesmo ausentes e não está associado à letalidade. Alterações hematológicas são menos frequentes se comparada as de *M. haemofelis* e a redução de eritrócitos é mais grave quando há associação do vírus da imunodeficiência felina ou o vírus da leucemia felina (FOLEY & PEDERSEN, 2001).

Candidatus Mycoplasma turicensis foi descoberto mais recentemente, na Suíça, em um gato doméstico portador de anemia hemolítica severa. Através de amostras de sangue deste animal foram feitas inoculações experimentais em outros dois gatos, sendo que um deles foi imunossuprimido e o outro não. O primeiro demonstrou anemia severa enquanto o outro teve apenas um decréscimo no volume globular e não apresentou sinais clínicos, sugerindo a importância do sistema imune no combate ao organismo, pois o animal imunossuprimido parece estar menos apto a debelar a infecção (WILLI et al., 2005). Além disso, estudos posteriores sugeriram

a correlação do desenvolvimento da anemia e sinais clínicos em coinfectados com *M. haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (WILLI et al., 2006).

2.1 Patogenia

Hemoplasmas podem causar doença aguda ou crônica. A infecção aguda pode ser influenciada por vários fatores tais como idade, doença concomitante, imunossupressão e esplenectomia. A infecção crônica geralmente está presente em animais visivelmente saudáveis e imunocompetentes. A patogenicidade da doença pode variar conforme a espécie envolvida, por exemplo, *M. haemofelis* pode causar anemia hemolítica aguda mesmo em animais não esplenectomizados, enquanto *Candidatus Mycoplasma haemominutum* desenvolve sinais clínicos brandos na doença aguda (MESSICK, 2004).

A doença pode ser dividida em quatro fases: pré-parasitêmica, aguda, de recuperação e de portador. A primeira varia de 1 a 3 semanas após a inoculação. A fase aguda abrange um mês ou mais, sendo caracterizada pela maior carga parasitária. Nessa fase os animais que não recebem tratamento adequado morrem decorrente da anemia severa (MESSICK & HARVEY, 2011).

A anemia nessas infecções é resultante de hemólise extravascular, que ocorre principalmente em fígado e baço, porém hemólise intravascular já foi descrita. O teste de Coombs positivo indica a presença de anticorpos ligados às hemácias e pode explicar a destruição imunomediada, apesar de esses anticorpos aparecerem após o desenvolvimento da anemia sugerindo insensibilidade do teste no início da doença ou o dano ao eritrócito pelo próprio organismo antes mesmo da formação de anticorpos (SYKES, 2010; TASKER, 2010).

A fase de recuperação ocorre após os episódios parasitêmicos, sendo caracterizada pela recuperação do hematócrito a valores normais e pode durar mais de um mês. Gatos que respondem imunologicamente contra o parasita e obtêm resposta regenerativa da medula óssea conseguem debelar a infecção. Outros animais permanecem clinicamente saudáveis, porém cronicamente infectados durante meses ou anos. Relatos de parasitas dentro de vacúolos em macrófagos do baço e pulmão podem explicar o estado de portadores, que permanecem clinicamente sadios e apresentam valores de hematócrito normais ou com leve

anemia regenerativa, mantendo equilíbrio entre a replicação de organismos e a remoção destes por fagocitose (MESSICK & HARVEY, 2011).

Diversos mecanismos de patogenicidade são propostos para hemoplasmas como a produção de radicais livres que causam dano oxidativo às membranas celulares do hospedeiro, enzimas que podem levar à destruição tecidual, depleção de nutrientes e desenvolvimento de auto anticorpos que causam desordens imunológicas. Entretanto, esses mecanismos ainda não estão totalmente descritos. Diferente dos demais micoplasmas, hemoplasmas colonizam e crescem em hemácias, estando associados a elas através de adesinas e proteínas acessórias produzidas por grande quantidade de genes específicos para tal função (MESSICK, 2004).

A gravidade na co-infecção de hemoplasmas com o vírus da leucemia felina e o vírus da imunodeficiência felina já foi citada em estudos anteriores. Co-infecções de *M. haemofelis* e FeLV aumentam a gravidade da anemia (MESSICK & HARVEY, 2011). Por outro lado, o mesmo hemoplasma em conjunto com FIV não causa anemia mais grave do que causando a infecção sozinho (MESSICK & HARVEY, 2011). O mesmo ocorre nas infecções de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* com FeLV que cursam em valores mais baixos no número de eritrócitos (FOLEY & PEDERSEN, 2001).

2.2 Sinais Clínicos

Os achados clínicos nas infecções por hemoplasmas variam conforme a espécie envolvida, além da fase da doença e das outras enfermidades que podem estar envolvidas (TASKER, 2010). Geralmente *M. haemofelis* é o agente da Anemia Infecciosa Felina caracterizada por sinais clínicos mais visíveis como apatia, anorexia, letargia, desidratação e palidez de mucosas decorrente da anemia (MESSICK & HARVEY, 2011; SYKES, 2010) que pode atingir valores de hematócrito abaixo de 20% na alta parasitemia (MESSICK, 2003). Ocasionalmente pode ser observado taquicardia, taquipneia e desenvolvimento de sopro cardíaco resultante de anemia severa (SYKES, 2010). Na fase aguda pode haver febre intermitente, contudo gatos moribundos podem estar hipotérmicos (SYKES, 2010; TASKER, 2010). Esplenomegalia e icterícia podem ser vistos como resultado de hemólise e hematopoiese extramedular, respectivamente, sendo a icterícia menos

comum (MESSICK & HARVEY, 2011; MESSICK, 2003, 2004; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

As infecções por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* cursam em sinais clínicos mínimos ou ausentes (FOLEY & PEDERSEN, 2001), podendo estar presente febre branda (MESSICK & HARVEY, 2011). Frequentemente a infecção por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* acomete animais já doentes (MESSICK & HARVEY, 2011), na maioria das vezes co-infectados com retrovírus, principalmente FeLV, podendo induzir desordens na medula óssea (TASKER, 2010).

Infecções experimentais por *Candidatus Mycoplasma turicensis* demonstraram que a anemia pode variar de moderada à severa (WILLI et al., 2005). A co-infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e imunossupressão por corticoides podem estar envolvidos no desenvolvimento dos sinais clínicos (MESSICK & HARVEY, 2011; TASKER, 2010; WILLI et al., 2006).

2.3 Achados laboratoriais

A anemia nas infecções por *M. haemofelis* geralmente são regenerativas, onde nota-se policromasia, anisocitose, presença de reticulócitos e corpúsculos de Howell-Jolly (SYKES, 2010). O volume corpuscular médio pode estar falsamente aumentado se há aglutinação de hemácias que são contadas como células grandes ou quando há reticulocitose (THRALL, 2012). Em alguns casos quando não houve tempo suficiente para resposta ou quando há infecção concomitante por FeLV a anemia pode ser arregenerativa pela inibição da eritropoiese (SYKES, 2010; THRALL, 2012). Valores de hematócrito podem estar dentro do normal em razão do baço remover as hemácias da circulação para retirada dos organismos da superfície das células retornando-as para a circulação (MESSICK & HARVEY, 2011). A visualização de hemácias aglutinadas pode ocorrer nas infecções por *M. haemofelis* em razão desse agente causar anemia hemolítica imunomediada. Anticorpos geralmente das classes IgG e IgM se ligam nas glicoproteínas da membrana das hemácias e essas são removidas no baço, medula óssea ou fígado por macrófagos, sendo dificilmente encontrado em esfregaço sanguíneo hemácias fagocitadas por monócito (THRALL, 2012).

O número de leucócitos pode variar de normal a alterado (MESSICK & HARVEY, 2011; SYKES, 2010). Plaquetas encontram-se na maioria das vezes dentro dos valores de referência (MESSICK & HARVEY, 2011).

Na bioquímica sanguínea as alterações mais comuns são hiperproteinemia por desidratação, ALT e AST aumentadas provavelmente por hipóxia hepática devido a anemia ou por esteatose hepática secundária à anorexia (MESSICK & HARVEY, 2011; TASKER, 2010) e hiperbilirrubinemia por hemólise (TASKER, 2010).

Alterações hematológicas por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* são mínimas ou não estão presentes. Em um estudo mesmo com o declínio no volume globular este não reduziu a valores abaixo da referência (FOLEY & PEDERSEN, 2001).

Pode haver anemia branda de caráter regenerativo (MESSICK & HARVEY, 2011). Valores baixos no volume globular também estão presentes em infecções do *Candidatus Mycoplasma turicensis* associado aos demais hemoplasmas felinos (TASKER, 2010; WILLI et al., 2006).

2.4 Diagnóstico

Pelo fato de hemoplasmas não serem cultiváveis em meios artificiais (MESSICK & HARVEY, 2011) a reprodução da infecção tem sido feita através de passagens *in vivo* (FOLEY & PEDERSEN, 2001).

Classicamente, o diagnóstico é feito por meio de visualização do parasita em esfregaço sanguíneo (BIONDO et al., 2009). Os organismos aparecem na superfície dos eritrócitos como pontos arredondados que podem estar isolados ou em conjunto formando cadeias. Contudo, a avaliação citológica tem baixa sensibilidade e especificidade (TASKER, 2010) em consequência de fatores como o ciclo parasitêmico e infecção crônica, na qual a ausência do parasita pode ter valor falso negativo, sendo que na realidade isso não exclui o seu diagnóstico (BIONDO et al., 2009; MESSICK & HARVEY, 2011). A realização do exame deve ser feita o quanto antes após a coleta devido o anticoagulante EDTA favorecer o desprendimento do parasito das hemácias dificultando a sua visualização (MESSICK & HARVEY, 2011; SYKES, 2010).

Outra limitação do diagnóstico citológico é a impossibilidade de diferenciar as espécies (SYKES, 2010; TASKER, 2010). Dificilmente *Candidatus Mycoplasma haemominutum* é visto em esfregaço sanguíneo por ser pequeno (MESSICK & HARVEY, 2011) e não pode ser diferenciado de *M. haemofelis* baseado apenas pelo tamanho (SYKES, 2010). Até o momento *Candidatus Mycoplasma turicensis* não foi identificado em esfregaços, provavelmente pela baixa quantidade de organismos circulantes em animais infectados com essa espécie (MESSICK & HARVEY, 2011; WILLI et al., 2006).

O examinador do esfregaço deve ter experiência para distinguir os organismos de artefatos causados por secagem ou precipitação do corante, além de outras estruturas como corpúsculos de Howell-Jolly, pontilhados basofílicos e o parasita *Cytauxzoon sp.* que podem gerar resultados falso positivos (MESSICK & HARVEY, 2011; TASKER, 2010).

A PCR possibilitou um incremento na eficiência da detecção de infecção por hemoplasmas (MESSICK, 2004), mesmo na presença de poucos organismos (MESSICK & HARVEY, 2011). É uma técnica molecular sensível que possibilita a síntese de um fragmento de sequência gênica específica para um organismo, no caso de hemoplasmas, a subunidade 16S do rRNA foi eleita como alvo para amplificação e estudo. É uma metodologia que pode ser realizada totalmente *in vitro* e consiste em ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (ALBERTS, 2011; MULLIS, 1990). Dois tipos de ensaios podem ser realizados: no primeiro, tido como convencional, os resultados positivos são vistos através de bandas em gel de agarose; o segundo, chamado de PCR quantitativo (qPCR), monitora, em tempo real, a emissão de sinal fluorescente (Rn) resultante da amplificação da sequência alvo, mensurando assim a carga de organismos da amostra (SYKES, 2010; WATSON, 2009). A PCR é uma ferramenta de diagnóstico com sensibilidade e especificidade melhor do que métodos parasitológicos diretos, como esfregaços sanguíneos (TASKER, 2010). Com o emprego de técnicas moleculares, resultados positivos passaram a ser detectados já com 4 a 15 dias após infecções experimentais e as amostras apresentam resultado negativo após o uso de antimicrobianos (MESSICK & HARVEY, 2011). O emprego da terapia antimicrobiana antes da PCR pode gerar resultados falso negativos, devendo ser iniciada após a coleta da amostra de sangue a ser testada (MESSICK & HARVEY, 2011; SYKES, 2010). Apesar dos resultados promissores, a técnica de PCR deve fazer uso de

controles positivo e negativo e boa padronização, afim de normalizar os resultados e identificar contaminações ou outros artefatos experimentais (TASKER, 2010).

2.5 Tratamento

O tratamento é feito a base de antibióticos da classe das Tetraciclina e das Fluorquinolonas (TASKER, 2010). A Doxiciclina é a tetraciclina de eleição, utilizada na dose de 10 mg/Kg a cada 24 horas (MESSICK & HARVEY, 2011; SYKES, 2010; TASKER, 2010) ou 5 mg/Kg a cada 12 horas (TASKER, 2010) por via oral, por no mínimo 2 semanas de uso (SYKES, 2010), podendo atingir 8 semanas (TASKER, 2010). O uso de comprimidos de Doxiciclina em gatos está associada à estenose esofágica devendo, portanto, ser administrados com água, ou preferencialmente, formulada em veículo de suspensão (SYKES, 2010).

A Enrofloxacin pode substituir a Doxiciclina, sendo utilizada na dose de 5mg/Kg por 24 horas, mas pode desenvolver degeneração retiniana em gatos, sendo a Doxiciclina a primeira escolha (SYKES, 2010). Outras fluorquinolonas são citadas como eficazes como a marbofloxacin (TASKER, 2010) e a pradofloxacin (MESSICK & HARVEY, 2011). O uso de Dipropionato de imidocarb pode ser utilizado em casos crônicos e refratários ao uso das tetraciclina e fluorquinolonas (TASKER, 2010). Casos de anemia severa com valores de hematócrito abaixo de 12% requerem transfusão sanguínea, realizando-se previamente a tipagem e a prova cruzada entre doador e receptor. Outros aparatos de suporte podem ser essenciais, como fluidoterapia e suporte nutricional (TASKER, 2010).

2.6 Hemoplasmas como zoonoses

Casos de hemoplasmosose em humanos foram relatados em alguns países, frequentemente associados à outras doenças como o lúpus eritematoso sistêmico, neoplasias e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SANTOS et al., 2008; TASKER et al., 2010), com diagnósticos baseados principalmente em citologia (TASKER et al., 2010). Suspeita-se que essas infecções acometam geralmente pacientes imunodeprimidos (SANTOS et al., 2008).

No Brasil, Santos et al. relataram o caso de um paciente humano portador do vírus HIV infectado por *Mycoplasma haemofelis* e *Bartonella henselae* diagnosticado através de PCR (SANTOS et al., 2008).

3 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos determinar a ocorrência de hemoplasmas em gatos domésticos do Distrito Federal utilizando o método convencional da PCR e avaliar o perfil hematológico por meio do hemograma dos animais infectados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram colhidas amostras de sangue de 160 gatos domésticos provenientes da região do Distrito Federal, sendo que 57 amostras foram obtidas durante a campanha de vacinação antirrábica ocorrida durante o mês de maio de 2012 e 103 amostras oriundas do serviço de clínica médica do Hospital Veterinário de pequenos animais da Universidade de Brasília - UnB, durante o período de setembro a outubro de 2012. As amostras foram colhidas por punção das veias jugular ou cefálica e acondicionadas em tubos com anticoagulante EDTA, mantidas sob refrigeração até o momento do processamento, realizado no mesmo dia da colheita.

O estudo analisou animais distribuídos em 20 áreas, sendo elas: Águas Claras, Asa Norte, Asa Sul, Ceilândia, Cruzeiro, Gama, Guará, Lago Norte, Lago Sul, Núcleo Bandeirante, Octogonal, Park Way, Planaltina, Samambaia, Sobradinho, São Sebastião, Sudoeste, Taguatinga, Vicente Pires e Vila Planalto. Os animais foram selecionados aleatoriamente, independente de sexo e idade. O presente estudo teve aprovação do conselho de experimentação animal e seguiu suas normas.

Etapa I – Hematologia

As amostras de sangue, devidamente identificadas, foram processadas para a realização de hemograma. Tais procedimentos seguiram o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UnB.

Os valores de hemácias, leucócitos, plaquetas e concentração de hemoglobina foram determinados em contador semiautomático de células de uso veterinário (ABC Vet – Horiba ABX diagnostics, Brasil). O volume globular (VG) foi determinado pela técnica de microhematócrito. Os índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média

(CHCM) foram determinados por cálculo padrão. O diferencial de leucócitos foi obtido através de esfregaço sanguíneo corado por panótico (NewProv®) e visualizado por microscopia óptica em objetiva de 100 vezes, contando-se 100 células. Além disso, a morfologia celular foi avaliada. A dosagem de proteína plasmática total (PPT) foi determinada com uso do refratômetro.

Etapa II – Extração do DNA

O restante da amostra de sangue não utilizada nos exames hematológicos foi separado por centrifugação obtendo-se o plasma e a fração de sangue contendo a capa leucocitária e armazenado a - 20 °C para que houvesse a extração de DNA, sendo esta etapa realizada no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular – UnB. Para o procedimento de extração de DNA utilizou-se kits comerciais específicos (*QIAamp DNA blood mini kit – Qiagen e Illustra blood genomicPrep Mini Spin kit – GE healthcare* ®) seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O material extraído foi armazenado à - 20°C.

Etapa III – Testagem pela técnica da PCR convencional

A PCR teve como objetivo identificar o gênero *Mycoplasma* spp através da amplificação do gene 16S do RNA ribossômico. Para isso, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* HBT-F (ATACGGCCCATATCCCTACG) e HBT-R (TCGCTCCACCACTTGTTCA) (CRIADO-FORNELIO et al., 2003). Todas as amostras foram testadas previamente para o controle endógeno GAPDH, com a finalidade de confirmar a presença de DNA.

As reações tinham como volume final 25 µL, contendo 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA amostra, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP), 1 µM de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de Taq DNA polimerase. O equipamento utilizado para amplificação do gene foi o termociclador C1000™ *Thermal Cycler (Bio-Rad®)* e seguiram o seguinte protocolo: uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos) e extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Vivantis®) a 1,5 % e corados com brometo de etídeo. Os resultados foram visualizados através de fotodocumentador de luz ultravioleta (UVP®), sendo consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas correspondentes a aproximadamente 600 pb comparadas com marcador de peso molecular (*EasyPath*®). A água foi utilizada como controle negativo para detectar possíveis contaminações, além de uma amostra de DNA de gato sabidamente positiva para *Mycoplasma* spp que serviu como controle positivo.

5 RESULTADOS

Foram testados 160 gatos domésticos provenientes de diversas áreas do Distrito Federal (Figura 1). Dentre estes, 84 (52,50%) eram machos, 72 (45,00%) fêmeas e quatro sem identificação sexual (2,50%) (Figura 2).

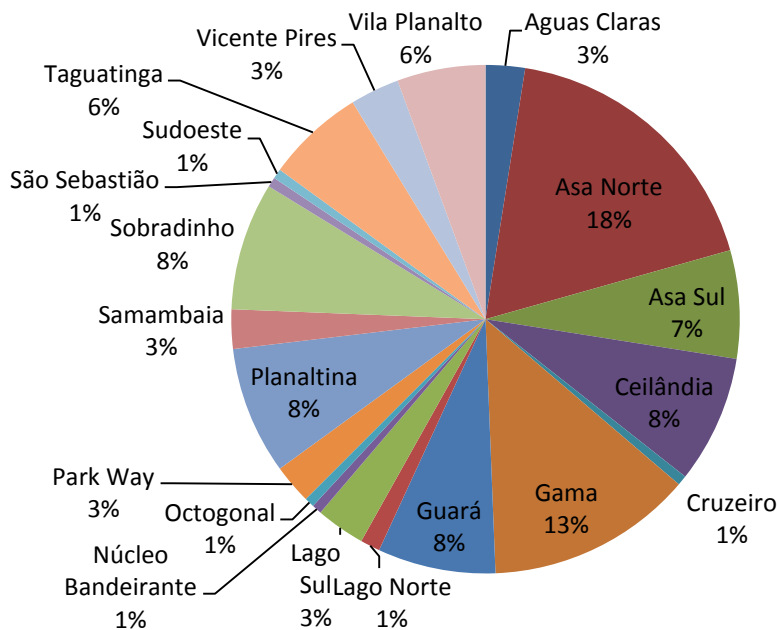


Figura 1. Porcentagem de amostras analisadas por área do Distrito Federal.

A idade dos animais incluídos no estudo variou de 6 meses a 20 anos. Na figura 3 observa-se a distribuição de frequência das idades de todos os animais.

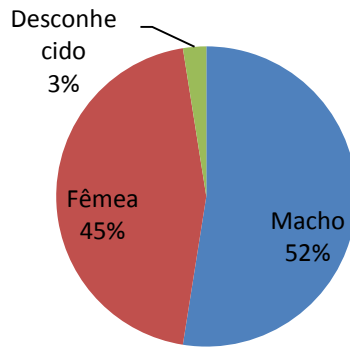


Figura 2. Proporção entre machos e fêmeas testados durante o estudo.

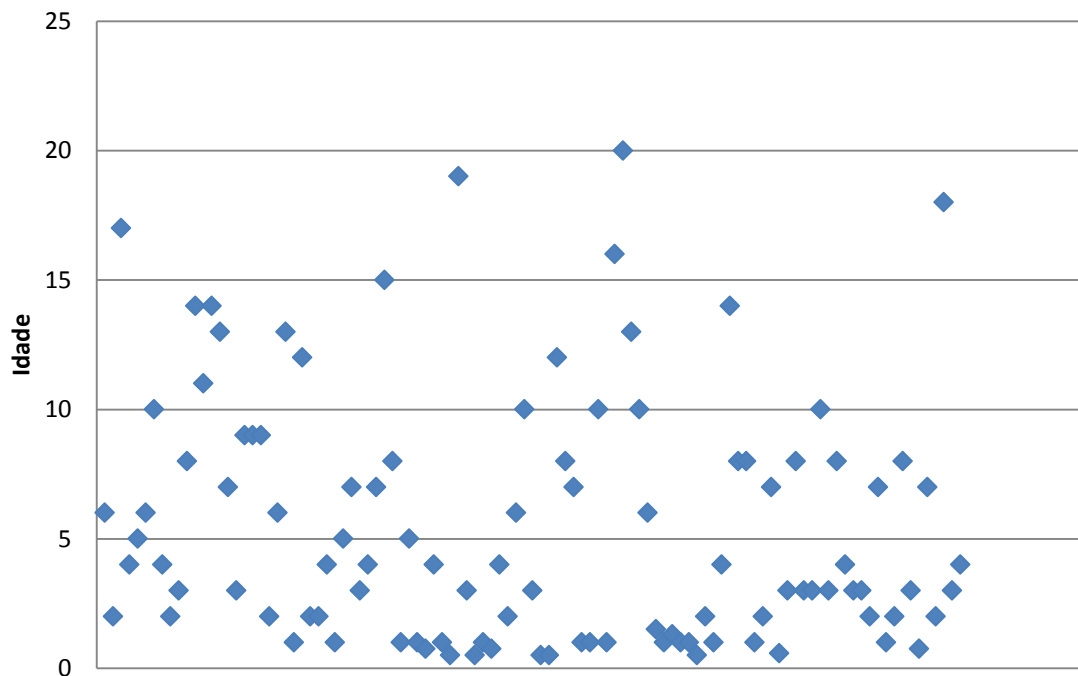


Figura 3. Distribuição da frequência de idade de todos os animais testados durante o estudo.

Dentre os animais testados na PCR para *Mycoplasma* spp 14 (8,75%) mostraram-se positivos e 146 (91,25%) negativos. Na tabela 1 observa-se o número de animais positivos em cada área e a respectiva quantidade de animais positivos.

Tabela 1. Quantidade total de animais testados e animais positivos para *Mycoplasma* spp por área do Distrito Federal

Área	Positivos	Total
------	-----------	-------

Águas Claras	0	4
Asa Norte	1	29
Asa Sul	0	11
Ceilândia	3	13
Cruzeiro	0	1
Gama	0	21
Guará	0	12
Lago Norte	0	2
Lago Sul	0	5
Núcleo Bandeirante	1	1
Octogonal	0	1
Parkway	0	4
Planaltina	1	13
Samambaia	0	4
São Sebastião	1	1
Sobradinho	2	13
Sudoeste	0	1
Taguatinga	2	10
Vicente Pires	1	5
Vila Planalto	2	9

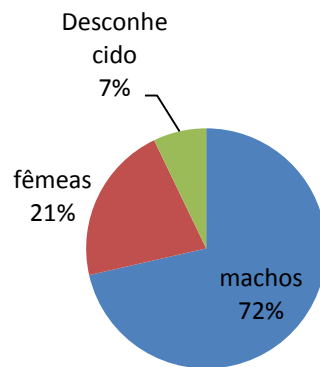


Figura 4. Porcentagem de machos e fêmeas positivos no estudo.

Em relação ao sexo dos animais positivos 10 (71,43%) eram machos, 3 (21,43%) fêmeas e 1 (7,14%) não avaliado, conforme ilustrado no figura 4.

Em relação à faixa etária da população de gatos amostrada, a média de idade de animais positivos foi de 6,5 anos e nenhum animal tinha idade inferior a um ano.

Os dados hematológicos dos animais estudados estão demonstrados na tabela 2 através de média, desvio padrão e diferença estatística ($p < 0,05$) entre os

grupos positivo e negativo. Alguns animais amostrados na cidade de Gama não tiveram os resultados de hemograma inseridos no estudo devido a impossibilidades técnicas.

Tabela 2: Média, desvio padrão e comparação entre parâmetros hematológicos de animais positivos e negativos na PCR para *Mycoplasma* spp através do Teste t de Student onde valores de $p < 0,05$ são significantes.

Parâmetro	Positivos		Negativos		Valores de referência	Pos/Neg Valor p
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão		
VG (%)	28.79	4.96	31.28	6.15	24-45	0,14
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	8.25	2.11	8.57	1.97	5,0-10	0,56
Hemoglobina (g/dL)	12.06	2.95	12.18	2.73	8,0-15	0,88
VCM (fl)	36.10	6.29	37.58	6.84	39-55	0,44
CHCM (%)	41.73	7.09	38.68	5.76	30-36	0,07
Leucócitos (x10 ³ /μl)	16.52	8.61	10.88	5.39	5.500-19.500	<0,01
Segmentados (x10 ³ /μl)	11381.93	8791.87	7289.32	4242.87	2.500-12.500	<0,01
Linfócitos (x10 ³ /μl)	3732.71	1447.53	2417.30	2464.09	1.500-7.000	0,05
Monócitos (x10 ³ /μl)	587.14	683.13	414.71	613.64	0-850	0,32
Eosinófilos (x10 ³ /μl)	848.83	459.77	909.16	1370.52	0-1500	0,87
PPT (g/dL)	7.91	1.12	7.43	0.80	6,0-8,0	0,04
Plaquetas (x10 ³ /μL)	315000	162834	398430.8	178081.5	195.000 - 624.000	0,09

Valores de referência: (JAIN, 1993). VG=volume globular, VCM= volume corpuscular médio, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteínas plasmáticas totais.

Tabela 3. Frequência de alterações hematológicas nos animais positivos

Alteração	número de animais/ total de positivos	%
Anemia Normocítica Normocrômica	1 / 14	7,14
Leucocitose	5 / 14	35,71
Neutrofilia	4 / 14	28,57
Monocitose	2 / 14	14,29
Hiperproteinemia	7 / 14	50
Trombocitopenia	4 / 14	28,57

6 DISCUSSÃO

O presente estudo testou 160 gatos domésticos de 20 áreas do Distrito Federal independente de sexo, idade e condição clínica, dos quais 14 (8,75%) mostraram-se positivos. Esse resultado está abaixo do que foi encontrado por Macieira et al. (2008) no Rio de Janeiro, onde 12,1% (18/149) de uma população de animais submetidos ao diagnóstico de retrovíroses felinas foram positivos. Em um estudo realizado por Firmino (2008) no DF 100 animais foram divididos em dois grupos, o primeiro com sinais clínicos relacionados à doença e o segundo sem sintomatologia, porém, em condições propícias à infecção, obtendo porcentagens de 33% e 32,6%, respectivamente. Em Porto Alegre, Santos (2008) encontrou 21,3% (79/371) de infectados diferenciando gatos por grupos de saudáveis e doentes enquanto que em São Paulo, Hora (2008) detectou 25 positivos em uma população de 270 gatos anêmicos. Apesar do número de animais utilizados em cada estudo poder contribuir para diferenças entre os resultados, o direcionamento do estudo através da sintomatologia e possibilidade de infecção desses animais resultou em percentuais acima dos encontrados neste estudo, que apesar de testar animais atendidos pelo serviço de clínica médica, não foram classificados quanto ao estado clínico ou alterações hematológicas, englobando provavelmente animais que buscavam apenas serviços preventivos como vacinação e castração.

Este trabalho teve o objetivo de diagnosticar o gênero *Mycoplasma* spp dos felinos mas não identificou as espécies envolvidas. Estudos em vários países têm demonstrado a prevalência das espécies conhecidas *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*. Nos Estados Unidos mais de 400 amostras foram testadas para *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* que resultaram em 12% e 7,2% de gatos anêmicos infectados, respectivamente (MESSICK, 2004). Willi et al. (2006) testaram 642 gatos originários do Reino Unido, Austrália e África do Sul. Nos três países a espécie *Candidatus Mycoplasma haemominutum* estava presente na maior parte dos animais, seguido do *Candidatus Mycoplasma turicensis* e *Mycoplasma haemofelis*. No Brasil há variações na prevalência de espécies quanto ao Estado analisado. Através de trabalhos variados nota-se que, por exemplo, em Curitiba a prevalência de *Mycoplasma haemofelis* foi maior do que em Porto Alegre, que por sua vez apresentou porcentagem mais alta de *Candidatus Mycoplasma*

haemominutum (BAUMANN, 2006; BIONDO et al., 2009; SANTOS, 2008). No Distrito Federal Firmino (2008) observou uma frequência maior de animais infectados por *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

Das 20 áreas estudadas, apenas nove apresentaram animais positivos, entretanto estes dados não são capazes de informar que nas outras regiões não haja a presença do agente em questão, pois o número amostral foi insuficiente para tal inferência.

A área de Ceilândia teve o maior número de positivos (3/13) representando 21% do total de positivos. Em seguida, Sobradinho (2/13), Taguatinga (2/10) e Vila Planalto (2/9) correspondem cada uma a 14% e finalmente Asa Norte (1/29), Núcleo Bandeirante (1/1), Planaltina (1/13), São Sebastião (1/1) e Vicente Pires (1/5) a 7% cada. Em Ceilândia a maior parte das residências é de casas o que facilita o acesso dos animais à rua, que pode ser um fator atribuído ao maior número de animais positivos nessa área.

De acordo com os resultados apresentados, 71,43% (10/14) dos machos testados foram positivos para *Mycoplasma* spp contra apenas 21,43% (3/14) das fêmeas. Segundo estudos anteriores, os machos são frequentemente mais infectados por hemoplasmas do que as fêmeas devido ao acesso a rua e brigas com outros gatos, ocasionando lesões por mordedura ou arranhadura, fatores tidos como fontes de infecção (MESSICK & HARVEY, 2011; TASKER, 2010). Harrus et al. (2002) obtiveram em seu estudo 69,5% de machos positivos sendo que destes 50% não eram castrados. Gentilini et al. (2009) observaram em seu trabalho a tendência dos machos estarem mais aptos à infecção do que as fêmeas, assim como Hora (2008) que também encontrou número maior de machos infectados. Esse fato pode decorrer da questão hormonal influenciar o comportamento agressivo dos machos, que brigam entre si pela disputa por território e fêmeas. Alguns autores relatam ainda que animais adultos são mais acometidos pela hemoplasmosose (TASKER, 2010; WILLI et al., 2006) como pode ser observado nesse estudo, onde a média de idade dos positivos foi de 6,5 anos.

Em relação aos exames hematológicos observou-se diferença estatística de leucócitos entre os grupos positivo e negativo, embora nenhum deles tenha extrapolado o valor de referência (Tabela 2). Segundo Messick e Harvey (2011) a contagem de leucócitos pode variar e a reatividade de monócitos pode ser observada. Na fase aguda da doença os animais podem apresentar leucocitose por

neutrofilia e monocitose (SANTOS,2008). Em um estudo, 24% dos animais positivos apresentaram leucocitose e isto foi relacionado ao fato da medula óssea estar respondendo à anemia através da proliferação celular (HARRUS et al., 2002; HORA, 2008).

Este estudo observou que dentre os positivos 35,71% (5/14) apresentaram leucocitose (Tabela 3). Ocorreu neutrofilia em 35,71% (5/14) do grupo positivo, sendo que em um animal isso não alterou o valor total de leucócitos e em outros quatro animais provocou a leucocitose. Essa neutrofilia reflete a liberação de um maior número de células pela medula óssea frente a um estímulo de citocinas e outras substâncias presentes na infecção aguda (MEYER, 1995).

Monocitose estava presente em 14,29% (2/14) dos positivos, estando isolada em um animal e promovendo a leucocitose no outro. O aumento de monócitos pode estar envolvido em respostas inflamatórias, mas segundo Thrall (2012) pode ser relativamente insignificante. Na hemoplasmosose é um achado comum na fase aguda, assim como presença de monócitos ativados e eritrofagocitose (SANTOS, 2008).

Acredita-se que os gatos que apresentaram leucocitose provavelmente estejam na fase aguda da doença. Como não foi verificado o histórico dos animais não devemos descartar a possibilidade de estarem acometidos por outras doenças que proporcionem o aumento de leucócitos; neste caso o hemoplasma pode atuar ainda como fator agravante (MESSICK & HARVEY, 2011).

O estresse causado pela própria doença e a manipulação durante os cuidados clínicos também podem ser consideradas fatores para o aumento na contagem de leucócitos visto que há migração de neutrófilos e/ou linfócitos do compartimento marginal para o circulante (THRALL, 2012).

Houve diferença significativa também entre os valores de linfócitos de positivos e negativos. Isso ocorreu em consequência do grupo negativo apresentar média inferior ao dos positivos, mas ambos permaneceram na normalidade.

Verificou-se diferença estatística ao comparar a concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) entre positivos e negativos ($p < 0,04$) apesar dos dois grupos estarem com valores dentro da referência para a espécie. A hiperproteinemia foi observada em 50% (7/14) dos animais positivos. Messick e Harvey (2011) citam que apesar das proteínas permanecerem dentro do valor de referência, alguns gatos podem apresentar aumento. Macieira (2008) também encontrou significância em seu estudo e associou o achado ao fato dos animais estarem co-infectados pelo vírus da

leucemia felina (FeLV) que frequentemente eleva a concentração de PPT. Muitas variáveis podem ter influenciado o aumento das proteínas plasmáticas dos animais do presente estudo. A desidratação é um sinal clínico comumente notado em animais infectados (SYKES, 2010; TASKER, 2010; MESSICK & HARVEY, 2011) e pode aumentar a concentração de moléculas de albumina (THRALL, 2012). Por outro lado o estímulo antigênico durante a infecção faz com que as citocinas inflamatórias envolvidas na resposta imunológica estimulem ou influenciem na produção e elevação de proteínas de fase aguda (MEYER, 1995; HORA, 2008) e que podem ter ocasionado a alteração observada no presente estudo.

Apenas um gato do grupo de positivos apresentou anemia classificada como anemia normocítica normocrômica. Esse tipo de anemia não é o esperado em casos de hemoplasmoses, uma vez que os animais geralmente apresentam hemácias macrocíticas e hipocrômicas associados a outras características que indicam regeneração (TASKER, 2010; MESSICK & HARVEY, 2011). Anemia normocítica normocrômica tem caráter arregenerativo por ocorrer depleção na eritrogênese e muitas causas estão associadas a esse evento como inflamações crônicas, doença renal e FeLV (MEYER, 1995). Sabe-se que há associação entre retrovírus felinos e hemoplasmoses (MACIEIRA et al., 2009; SYKES, 2010), levando a crer que esse tipo de anemia pode estar sendo influenciada pela infecção viral concomitante. Hora (2008) em seu estudo não encontrou sinais de regeneração medular em animais anêmicos co-infectados com retrovírus, diferente daqueles não co-infectados que mostraram sinais de regeneração.

A ausência de anemia na maioria dos animais não implica que estes não se encontrem na fase aguda da doença, pois na infecção por espécies menos patogênicas como o *Candidatus Mycoplasma haemominutum* os sinais clínicos desenvolvidos são mínimos ou ausentes (MESSICK, 2004; FOLEY, 2001) e o mesmo geralmente não provoca anemia (SYKES, 2010). Foley (2001) menciona que alterações hematológicas por essa espécie são poucas se estiverem presentes e um estudo realizado pelo mesmo mostrou que ao longo da infecção houve declínio do volume globular, mas que não excedeu o valor de referência. Desta forma, embora não tenha sido identificada a espécie, pode-se postular que, os animais estejam infectados pelo *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ou outra espécie menos patogênica.

Trombocitopenia estava presente em quatro animais positivos, inclusive no único anêmico. Na hemoplasiose o número de plaquetas geralmente é normal (MESSICK & HARVEY, 2011). A diminuição pode estar envolvida com outras enfermidades, mas vale ressaltar que as plaquetas dos gatos se aglomeram rapidamente e os agregados podem diminuir falsamente esses valores (THRALL, 2012).

O *Mycoplasma haemofelis* é considerado o hemoplasma mais patogênico e responsável por alterações clínicas e hematológicas, principalmente por causar anemia. Por outro lado, os hemoplasmas *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* não costumam causar essas alterações (FOLEY & PEDERSEN, 2001); WILLI et al., 2006; TASKER, 2010) . Como já foi citado, um estudo anterior encontrou maior prevalência da espécie *Candidatus Mycoplasma haemominutum* em gatos no DF (FIRMINO, 2008). Este trabalho não identificou as espécies envolvidas, mas suspeita-se que os animais sejam portadores das espécies menos patogênicas por que não apresentaram muitas alterações hematológicas. Uma posterior identificação das espécies seria interessante para esclarecer essa relação.

Quanto aos animais que apresentaram as principais alterações hematológicas observadas no estudo estes se encontram na fase aguda da doença.

7 CONCLUSÃO

A infecção por *Mycoplasma* spp está presente entre os felinos domésticos do Distrito Federal. Talvez a maior contribuição deste trabalho esteja em traçar a distribuição do agente infeccioso na área de forma mais precisa, visto que a aleatoriedade na escolha da população amostrada nos permite estimar a incidência com menor erro associado, já que alguns fatores de risco deixam de impactar nos resultados. Outra vantagem é a importância no diagnóstico de animais clinicamente saudáveis, potenciais reservatórios do patógeno na população.

A incidência da infecção no Distrito Federal apresenta maiores taxas em regiões onde o modelo habitacional básico são casas e não apartamentos, como: Ceilândia (21%), Sobradinho (14%), Taguatinga (14%) e Vila Planalto (14%), fato que pode favorecer o acesso dos animais à rua e conseqüentemente maiores riscos de contaminação, entretanto, tal hipótese necessita de mais dados e maior amostragem populacional para sua comprovação.

O perfil hematológico dos animais positivos apresentou leucocitose, neutrofilia e hiperproteinemia como sendo as alterações mais significativas, indicativas da fase aguda da doença. A anemia, comum nas infecções por hemoplasmas não se mostrou relevante dentre os infectados.

O fato da maioria dos animais apresentarem relativamente poucas alterações hematológicas abre a hipótese de participação de uma espécie de hemoplasma pouco patogênica, sendo necessários novos estudos moleculares para tal comprovação.

Os resultados deste estudo comprovam que a técnica da PCR é útil e eficaz no diagnóstico molecular do *Mycoplasma* spp nos felinos, com capacidade de detecção em animais assintomáticos e com pouca ou nenhuma alteração hematológica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. **Fundamentos da Biologia Celular**. 3^o Edição ed. Porto Alegre: Art Med, 2011. p. 864

BAUMANN, A. **Mycoplasma Haemofelis and Candidatus Mycoplasma Haemominutum detection by PCR in anemic domestic cats (Felis catus) from Curitiba, Brazil: A Preliminary Study**American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 41st Annual Meeting. **Anais...**Tucson: 2006

BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H. A.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 03, p. 1–7, 2009.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCO, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of Mycoplasma haemofelis, Mycoplasma haemominutum and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 307–317, jun. 2003.

DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; JONES, T. J. G.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect Mycoplasma haemofelis and “Candidatus Mycoplasma haemominutum” in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 10, n. 4, p. 413–7, ago. 2008.

FIRMINO, F. DE P. **Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos do Distrito Federal**. 2008. 67p. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N. C. “Candidatus Mycoplasma haemominutum”, a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. Pt 3, p. 815–7, maio. 2001.

GARY, A. T.; RICHMOND, H. L.; TASKER, S.; HACKETT, T. B.; LAPPIN, M. R. Survival of Mycoplasma haemofelis and “Candidatus Mycoplasma haemominutum” in blood of cats used for transfusions. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 8, n. 5, p. 321–6, out. 2006.

GENTILINI, F.; NOVACCO, M.; TURBA, M. E.; WILLI, B.; BACCI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R. Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 11, n. 4, p. 277–85, abr. 2009.

HARRUS, S.; KLEMENT, E.; AROCH, I.; STEIN, T.; BARK, H.; LAVY, E.; MAZAKI-TOVI, M.; BANETH, G. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. **The Veterinary record**, v. 151, n. 3, p. 82–5, 20 jul. 2002.

HORA, A. S. DA. **Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos**. 2008. 75f. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Willey, 1993. p. 417

MACIEIRA, D. D. B. **Hemoplasmas em gatos domésticos: Prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus das imunodeficiência e/ou leucemia felinas**. 2008. 90f. Tese de Doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R. C. A. A.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R. P.; McLANE, H. L.; DAGGY, J. K.; MESSICK, J. B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro--Brazil. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 10, n. 2, p. 120–9, abr. 2008.

MESSICK, J. B. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p. 1453–1465, nov. 2003.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2–13, jan. 2004.

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

MEYER, D. J. **Medicina de laboratório veterinária**. 1º Edição ed. São Paulo: Roca, 1995. p. 308

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de biologie clinique**, v. 48, n. 8, p. 579–82, jan. 1990.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera Haemobartonella and Eperythrozoon to the genus Mycoplasma with descriptions of “Candidatus Mycoplasma haemofelis”, “Candidatus Mycoplasma haemomuris”, “Candidatus Mycoplasma haemosuis” and ‘Candidatus Mycopl. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. Pt 3, p. 891–9, maio. 2001.

SANTOS, A. P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2008. 164p. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; BIONDO, A. W.; DORA, J. M.; GOLDANI, L. Z.; OLIVEIRA, S. T.; GUIMARÃES, A. M. S.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H. A.;

GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 12, p. 1922–4, dez. 2008.

SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; NASCIMENTO, N. C.; SANMIGUEL, P. J.; MARTIN, S. W.; MESSICK, J. B. Genome of Mycoplasma haemofelis, unraveling its strategies for survival and persistence. **Veterinary research**, v. 42, n. 1, p. 102, 2011.

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

TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of feline medicine and surgery**, v. 12, n. 5, p. 369–81, maio. 2010.

TASKER, S.; PETERS, I. R.; MUMFORD, A. D.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, S.; PRETORIUS, A. M.; BIRTLES, R. J.; HELPS, C. R.; NEIMARK, H. Investigation of human haemotropic Mycoplasma infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. Pt 11, p. 1285–92, nov. 2010.

THRALL, M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd Editio ed. Ames: Wiley Blackwell, 2012. p. 762

VALLE, S. **Prevalência, fatores de risco e alterações laboratoriais na infecção pelos hemoplasmas canino e felino em cães no hospital veterinário da Universidade de Passo Fundo**. 2011. 91f. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WATSON, J. D. **DNA recombinante - Genes e genomas**. 3º Edição. Porto Alegre: Art Med, 2009. p. 474

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M. L.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2581–5, jun. 2005.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F. S.; DOHERR, M. G.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; LOBETTI, R. G.; MALIK, R.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Phylogenetic analysis of “Candidatus Mycoplasma turicensis” isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4430–5, dez. 2006.