



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Leopoldo Augusto Moraes**

**OCORRÊNCIA DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM CANINOS E  
FELINOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE BELÉM, PA**

**Belém**  
**2014**

**Leopoldo Augusto Moraes**

**OCORRÊNCIA DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM CANINOS E  
FELINOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE BELÉM, PA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Pará – UFPA, Embrapa Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Área: Sanidade Animal).

**Orientador:** Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira

**Co-orientador:** Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves

**Belém  
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –  
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém-PA

---

Moraes, Leopoldo Augusto

Ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em caninos e felinos domésticos na Região de Belém, PA / Leopoldo Augusto Moraes; orientador, Washington Luiz Assunção Pereira; co-orientador, Evonnildo Costa Gonçalves – Belém, PA, 2014.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

1. Bacteriologia veterinária – Belém (PA). 2. Mícoplasma. 3. Cão – Doenças - Belém (PA). 4 Felídeo – Doenças - Belém. I. Título

CDD – 22.ed. 636.089692

---

**Leopoldo Augusto Moraes**

**OCORRÊNCIA DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM CANINOS E  
FELINOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE BELÉM, PA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Pará – UFPA, Embrapa Amazônia Oriental e Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Área: Sanidade Animal).

Data da aprovação. Belém - PA: 07/02/2014.

Banca Examinadora

---

**Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira** (Orientador)  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hilma Lúcia Tavares Dias** (Membro Titular)  
Universidade Federal do Pará

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Délia Cristina Figueira Aguiar** (Membro Titular)  
Universidade Federal do Pará

**Belém**

A minha querida Mãe, por todo amor, carinho e compreensão,  
que me fizeram ser tão grande quanto a gratidão que sinto por você.

Dedico!

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e oportunidade profissional e aos animais que me fizeram escolher essa profissão, possibilitam e possibilitaram meu aprendizado e a realização desse trabalho.

A minha amada mãe, Beatriz, meus irmãos, Lienne e João e meus cães, Joselito e Dexter, pelo apoio nos momentos difíceis, pelos conselhos e pelas horas de diversão.

Ao meu orientador/professor Washington Luiz Assunção Pereira, pelas orientações, confiança, idéias, correções, críticas sempre construtivas, suporte, por ser um modelo de competência e profissionalismo a ser seguido e principalmente por ter acreditado em mim quando ninguém mais acreditou.

Ao meu co-orientador/professor Evonnildo Costa Gonçalves, uma pessoa que confiou em mim de graça, e possibilitou a execução dessa pesquisa. Agradeço todos os dias à honra de ter conhecido pessoas como o senhor.

A família que me foi permitido escolher, meus amigos: Abraão, Antônio, Bernard, Dionney, Elton, Jessica, Mayra, Uliara, Raylene, Rosa, Alex e Marcela, pelo apoio, ajuda e companheirismo, e por permanecerem ao meu lado desde a graduação.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Animal: Suellen, Roberta (Beta), Paulo (Pê), Carol, Ana, Fernanda, Andréa, Leonardo, Alex e Sara; pela amizade ao longo dos últimos quatro anos, ou menos. Em especial a Kelly, que ajudou a elaborar um abstract excelente.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Biomolecular, Pablo, Ruan, Monique Fábio, Rafaella, Laíse, Renata, Sanclayver, Bruno, Andrei, Michele, Claudia, Bruna, Tayna, Luiz, Mayque, Fabrisia e Manu, por toda ajuda e companheirismo ao longo desses dois anos. Em especial a Cássia e a Thais, que mesmo não estando envolvidas diretamente nessa pesquisa jamais negaram ajuda.

Ao amigo Dennis Lima, pelas dicas e principalmente pela ajuda durante boa parte das coletas desse trabalho.

A professora Adriana Maciel que mesmo não estando diretamente envolvida nessa pesquisa, representa uma peça fundamental na minha vida profissional principalmente durante a realização de docência. Se um dia me tornar professor, a senhora será responsável direta.

Aos alunos de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural da Amazônia, por compartilharem os modestos conhecimentos repassados durante o estágio de docência.

Ao professor Sebastião Rolim pela ajuda na análise estatística e por toda a cordialidade na hora de tirar dúvidas sobre a tabulação dos dados.

Aos professores da graduação Ana Silvia, Alexandre Casseb e Raimundo Nelson, pelas ajudas durante a graduação e pelos subsídios necessários para minha formação profissional, em especial ao professor Andre Marcelo responsável por indicar essa pesquisa ao meu co-orientador.

Aos membros da banca, professoras Délia Cristina e Hilma Dias, pela oportunidade de contar com a vossa experiência.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e a todo o corpo docente pelos ensinamentos que recebi.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro ao longo da realização dessa pesquisa.

Now I think I'm able to carry on  
It's been a long, long time coming  
But I know a change is gonna come'  
(Sam Cooke)



## RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos compreendem um grupo de bactérias que podem causar anemia hemolítica e diversas doenças crônicas em animais. Em felinos três espécies infectantes de hemoplasmas são relatadas: *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’, sendo o primeiro considerado mais patogênico, enquanto que os caninos são normalmente infectados por pelo menos duas espécies de micoplasmas: *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. Com o objetivo de avaliar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em população canina e felina da cidade de Belém, Estado do Pará, foi analisado através de PCR o material genético oriundo de 299 amostras sanguíneas de animais domiciliados e errantes. Em 8,03% (24/299) das amostras foi amplificado o DNA de micoplasmas hemotrópicos, sendo 1,78% (3/169) de cães e 16,15% (21/130) de gatos infectados. Entre os felinos as maiores taxas de infecção foram encontradas nos animais domiciliados 22,86% (16/70) e em animais machos 29,51% (18/61), sendo a espécie ‘*Candidatus M. haemominutum*’ 8,46% (11/130) a de maior ocorrência quando comparada a espécie *M. haemofelis* 6,92% (9/130). A infecção em caninos foi observada somente no grupo de animais errantes, sendo o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ a única espécie identificada com taxa de 1,78% (3/169). Foi possível avaliar que micoplasmas hemotrópicos circulam nas duas espécies estudadas, felinos domiciliados e machos formaram o grupo com maior risco para a infecção e que o bioagente ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ parece ser o único em circulação na população canina.

**Palavras-chave:** *Mycoplasma* sp. Hemoplasmas. Reação em Cadeia da Polimerase. Felinos. Caninos.

## ABSTRACT

Hemotrophic mycoplasmas comprise a group of bacteria that can cause hemolytic anemia and several chronic diseases in animals. In cats three infecting species of hemoplasmas are reported: *M. haemofelis*, 'Candidatus *M. haemominutum*' and 'Candidatus *M. turicensis*', the first being considered the most pathogenic, whereas the dogs are normally infected by at least two mycoplasma species *M. haemocanis* and 'Candidatus *M. haematoparvum*'. In order to assess the occurrence of hemotrophic mycoplasmas in feline and canine populations of Belém city were analyzed, by PCR, the genetic material from blood samples of 299 domiciled and stray animals. In 8.03% (24/299) of DNA samples of hemotrophic mycoplasmas was amplified, 1.78 % (3 /169) from infected dogs and 16.15% (21 /130) from infected cats. Among the cats the highest rates of infection were found in domiciled animals 22.86% (16/70) and in males 29.51% (18/61), the species 'Candidatus *M. haemominutum*' 8.46 % (11/130) get the higher incidence when compared to species *Mycoplasma haemofelis* 6.92 % (9/130). The infection in dogs was only identified among stray animals, with the 'Candidatus *M. haematoparvum*' being the only species identified with a rate of 1.78 % (3/169). It was possible to assess that hemotrophic mycoplasmas circulate in both species in the present report, domiciled felines and males formed the group at highest risk for infection and the agent 'Candidatus *M. haematoparvum*' seems to be the only one in circulation in the canine population.

**Keywords:** *Mycoplasma* sp. Hemoplasma. Polymerase Chain Reaction. Felines. Canines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - (a,b) Microscopia eletrônica de varredura de hemácias coletadas do sangue de um gato após 10 dias de infecção experimental por *M. haemofelis*. Os organismos apresentam formato discóide, medindo aproximadamente 0.5 µm, e estão aderidos a superfície eritrocitária. Um organismo em fissão binária é observado (seta). Barras representam 1 µm ..... 16

**Figura 2** - (a) Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a presença de uma cadeia de hemoplasmas na superfície de um eritrócito de carneiro. Notar a presença de fibrilas conectando a bactéria a membrana da célula hospedeira (seta). Barra representa 0,5 µm. (b) Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a presença de *M. haemofelis* dentro de depressão na superfície eritrocitária (seta) após 10 dias de infecção experimental em um gato. Barra representa 1 µm. .... 16

**Figura 3** - Detecção de *Mycoplasma* sp. através de PCR, em amostras de sangue total de cães e gatos. Linha 2 corresponde a amostra de felino doméstico positiva para ‘*Candidatus M. haemominutum*’; Linha 3 corresponde a amostra de felino doméstico positiva para *Mycoplasma haemofelis*; Linha 4 corresponde a amostra de canino doméstico positiva para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’; Linhas 5 e 6: controles positivos para ‘*C.M. haemominutum*’ e *M. haemofelis*; Linha 7 corresponde ao controle negativo da reação; Linha 1 corresponde ao Ladder 100 pb (O’GeneRuler). A seta corresponde ao fragmento de 600 pb do ladder..... 29

**Figura 4** - Árvore filogenética para *Mycoplasma* sp. utilizando o método Neighbor-Joining, modelo Kimura-2-parâmetros construída a partir do programa PAUP. A inscrição ‘Canino’ representa amostra de ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, a inscrição ‘Felino 1’ representa amostra de *Mycoplasma haemofelis* e as inscrições ‘Felino 2 e 3’ representas amostras de ‘*Candidatus M. haemominutum*’. *Escherichia coli* XJALT-127 foi utilizada como grupo externo..... 34

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Totalidade de animais estudados em função da espécie, sexo e grupo de estudo..... 25
- Tabela 2** - Comparação das frequências globais de animais infectados por hemoplasmas em função das espécies estudadas. .... 30
- Tabela 3** - Frequência de distribuição dos resultados para micoplasmas hemotrópicos em felinos e caninos em função do grupo de estudo dos animais. .... 30
- Tabela 4** - Frequência de distribuição dos resultados para micoplasmas hemotrópicos em amostras de felinos e caninos em função do sexo dos animais. .... 30
- Tabela 5** - Comparação da frequência de felinos infectados por hemoplasmas em função da frequência global de felinos acometidos por outras hemoparasitoses. .... 31
- Tabela 6** - Comparação da frequência de caninos infectados por hemoplasmas em função da frequência global de caninos acometidos por outras hemoparasitoses..... 31
- Tabela 7** - Identificação das espécies de hemoplasmas depositadas nos GenBank e referidas no presente estudo para construção filogenética. .... 32
- Tabela 8** - Distância 'P' obtidas utilizando as sequências do presente estudo em comparação a sequencias de micoplasmas hemotrópicos disponíveis no GenBank. .... 35
- Tabela 9** - Distância 'P' obtidas utilizando as sequências do presente estudo em comparação a sequencias de micoplasmas hemotrópicos disponíveis no GenBank. .... 36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
3.1 MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS .....	14
<b>3.1.1 Histórico e Taxonomia</b> .....	14
<b>3.1.2 Agente Etiológico</b> .....	15
<b>3.1.3 Transmissão</b> .....	17
<b>3.1.4 Fatores de Risco</b> .....	18
<b>3.1.5 Patogenia e Sinais Clínicos</b> .....	18
3.1.5.1 Doença Aguda .....	18
3.1.5.2 Doença Crônica .....	20
<b>3.1.6 Diagnóstico</b> .....	21
<b>3.1.7 Aspectos Epidemiológicos</b> .....	22
3.1.7.1 Felinos .....	22
3.1.7.2 Caninos .....	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
4.1 AMOSTRAGEM.....	25
4.2 ANÁLISES MOLECULARES .....	26
<b>4.2.1 Detecção de <i>Mycoplasma sp.</i></b> .....	26
<b>4.2.2 Detecção de <i>Ehrlichia sp.</i> e <i>Anaplasma sp.</i></b> .....	26
<b>4.2.3 Detecção de <i>Babesia sp.</i></b> .....	26
4.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS .....	27
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PARASITOS .....	27
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>5 RESULTADOS</b> .....	29
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

Hemoparasitoses compreendem o conjunto de doenças, de ordem parasitária ou bacteriana, transmitidas por vetores com grande importância na Medicina Veterinária, acometendo não somente cães e gatos domésticos, mas diversas outras espécies animais (STANNECK, 2006; MUNDIM et al., 2008).

Estão representadas por uma grande variabilidade de agentes que possuem caráter global sendo veiculados principalmente através da picada de vetores artrópodes, dos quais se destacam: carrapatos, pulgas e mosquitos; que além de atuarem na transmissão, participam do ciclo biológico de algumas dessas doenças (PAROLA et al., 2005a; PAROLA et al., 2005b; BEUGNET; MARIÉ, 2009).

A distribuição dessas enfermidades transmitidas por vetores resulta não somente no transporte de animais domésticos, como também a maior dispersão de agentes e vetores em consequência das alterações climáticas globais além do uso desenfreado de fármacos sem o correto estabelecimento profilático e/ou diagnóstico contribuindo para o aumento da resistência ao tratamento e controle das hemoparasitoses (SHAW et al., 2001; OTRANTO et al., 2009; CAPRARIIS et al., 2011; CAEIROS, 2012).

Dentre os hemoparasitos mais estudados nos animais de companhia destacam-se os pertencentes aos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Mycoplasma*, cujas manifestações clínicas podem variar desde imperceptíveis até quadros clínicos graves, sendo letais em alguns casos.

As hemoparasitoses têm sido identificadas como causas crescentes de morbidade e mortalidade de animais e, em alguns países, inclusive do homem (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Aliado a esse fator, o contato cada vez maior com os hospedeiros reservatórios (cães e gatos) de vários hemoparasitos zoonóticos contribui para que as questões relativas à saúde coletiva sejam cada vez mais estudadas (SHAW et al., 2001; CAEIROS, 2012).

Existem poucos relatos acerca da distribuição dos hemoplasmas em animais domésticos e os existentes, em geral, são reportados nas espécies de ocorrência natural em felinos. Na região norte somente um trabalho com hemoplasmas foi realizado utilizando apenas felinos (ARAGÃO DE SOUSA et al., 2013), logo os dados não são suficientes para determinar a prevalência, fatores de risco ou o potencial patogênico das espécies de micoplasmas circulantes no Pará.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em população canina e felina da cidade de Belém, Estado do Pará.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e identificar a(s) linhagem(s) de *Mycoplasma* sp. predominante(s) na área de estudo;
- Identificar grupos de risco para a infecção por *Mycoplasma* sp.;
- Caracterizar as relações filogenéticas da(s) linhagem(s) na área de estudo em comparação com táxons de outras regiões mundiais;
- Avaliar se a presença de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis* nas amostras, atua como fator de risco para a infecção por hemoplasmas.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS

##### 3.1.1 Histórico e Taxonomia

Micoplasmas hemotrópicos, também denominados hemoplasmas, compreendem um grupo de bactérias que podem causar anemia hemolítica e diversas doenças crônicas em animais vertebrados (MESSICK, 2004).

A infecção natural pelo agente causal da Anemia Infecciosa Felina (AIF) foi descrita inicialmente no Estado do Colorado, EUA em um felino doméstico que se apresentava debilitado, anorético e com sintomas de anemia acentuada. Flint e Moss (1953) encontraram organismos aderidos à superfície eritrocitária, semelhantes aos do gênero *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*. Posteriormente, Flint e McKelvie (1955), após reprodução experimental da doença em gatos hípidos, propuseram para o agente a classificação de *Haemobartonella felis*.

Em virtude de suas características microbiológicas como a ausência de membrana externa e flagelo, associadas à transmissão por vetores artrópodes e incapacidade de cultivo, os gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram taxonomicamente agrupados no Reino Procariota, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales e na Família Anaplasmataceae, assim como organismos do gênero *Anaplasma* sp., que compartilham características microbiológicas semelhantes (RISTIC; KREIER, 1984).

Utilizando esfregaços sanguíneos foi observado a presença desses microorganismos aderidos a membrana eritrocitária, sendo classificados de acordo com a forma, sendo a anelar mais comum para o gênero *Eperythrozoon* sp. e de acordo com a localização no plasma sanguíneo, onde os classificados como *Haemobartonella* sp. raramente circulam no plasma diferente dos classificados como *Eperythrozoon* sp. que ocorrem de maneira equivalente no plasma e aderidos á eritrócitos (DEMAREE; NESSMITH, 1972; RISTIC; KREIER, 1984).

Após o desenvolvimento da engenharia genética, a partir da análise do gene 16S rRNA, foi possível perceber que o gênero *Haemobartonella* e a espécie *Eperythrozoon suis* possuíam 79 a 83% de similaridade genética com organismos classificados como



*Mycoplasma* sp., e apenas 72 a 75% com o *Anaplasma marginale* (RIKIHISA et al., 1997).

Neimark et al. (2001) em estudo semelhante, propuseram que as espécies descritas como *Haemobartonella* sp. e *Eperythrozoon* sp. fossem reclassificadas, passando então a integrar a classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales e família Mycoplasmataceae. As espécies transferidas adotaram os nomes: ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’ (*H. felis*), ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’ (*H. muris*), *Mycoplasma suis* (*E. suis*), ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’ (*H. wenyonii*) (NEIMARK et al., 2001; NEIMARK et al., 2002).

Em relato de Neimark et al. (2002) a terminologia ‘*Candidatus*’ utilizada para novos e ainda não descritos táxons, foi retirada das espécies previamente conhecidas sendo adotada a nomenclatura: *M. haemofelis*, *M. haemomuris* e *M. wenyonii*. A terminologia foi então adotada para classificar uma nova variante da espécie anteriormente descrita como *H. felis*, cepas Califórnia e Birmingham, que receberam a denominação ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (FOLEY; PEDERSEN, 2001).

### 3.1.2 Agente Etiológico

Micoplasmas hemotrópicos, são bactérias *gram* negativas, pleomórficas, não cultiváveis, com parede celular delgada ou ausente e que infectam a superfície eritrocitária de uma ampla gama de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (MESSICK, 2004; SYKES et al., 2005; MAGGI et al., 2013).

Apesar da mudança taxonômica, esses microorganismos são nomeados com o prefixo “*haemo*” uma vez que possuem íntima relação com a superfície de células vermelhas do sangue (NEIMARK et al., 2002; MESSICK, 2004).

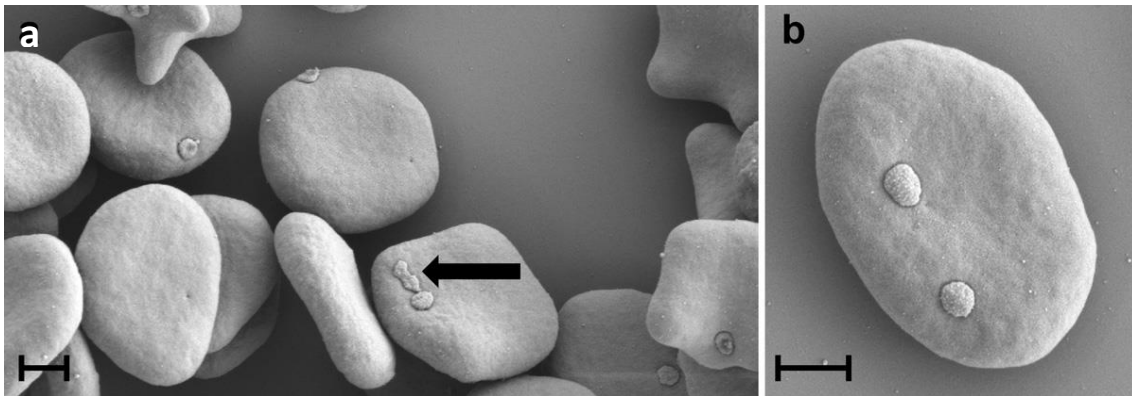
Os microorganismos são relativamente pequenos, 0,3 a 3 µm de diâmetro, anucleados, em formato discóide (Figura 1) ou anelar, em pares ou em cadeias e que possuem pequenos grânulos e estruturas filamentosas distribuídas no citosol (MESSICK, 2004; MESSICK; HARVEY, 2012). Como não penetram na superfície celular são encontrados em pequenas depressões ‘conectados’ à celular hospedeira através de pequenas fibrilas (Figura 2) que se projetam do parasito (MESSICK, 2004).

Em função de seu tamanho reduzido Barker et al. (2011) atestam que o genoma de microorganismos do gênero *Mycoplasma* varia de 745 kb para *M. suis* até 1245 kb em *M. haemofelis*. Messick et al. (2011) demonstram que essas espécies apresentam

genoma reduzido para rotas metabólicas e adaptação sanguínea, logo, podem causar doença através da remoção de nutrientes da célula parasitada diminuindo sua meia-vida.

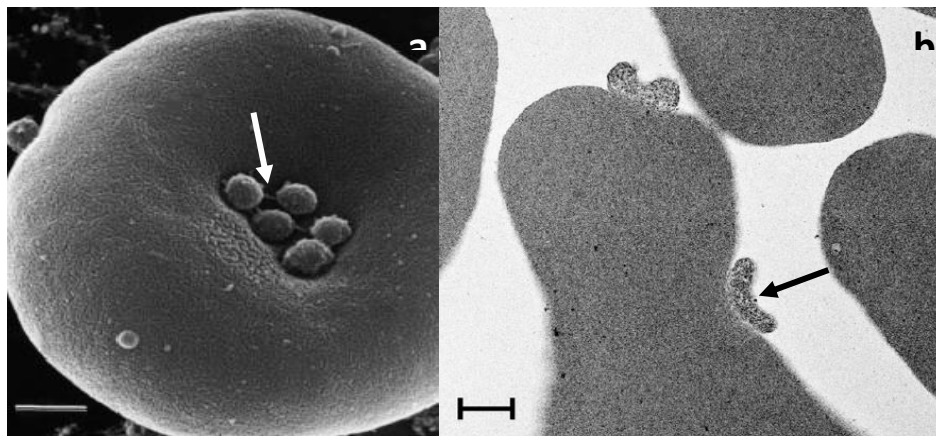
Segundo Kirchhoff et al. (1984) e Razin (1992), micoplasmas patogênicos possuem apêndices contendo uma organela especializada na aderência a célula hospedeira, adotando um modo de vida parasitário. Hemoplasmas não são encontrados em vida livre, por isso necessitam da célula hospedeira, para garantir nutrientes essenciais para a manutenção da infecção (MESSICK, 2004).

**Figura 1** - (a,b) Microscopia eletrônica de varredura de hemácias coletadas do sangue de um gato após 10 dias de infecção experimental por *M. haemofelis*. Os organismos apresentam formato discoide, medindo aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , e estão aderidos a superfície eritrocitária. Um organismo em fissão binária é observado (seta). Barras representam 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: WILLI et al., 2011.

**Figura 2** - (a) Microscopia eletrônica de varredura evidenciando a presença de uma cadeia de hemoplasmas na superfície de um eritrócito de carneiro. Notar a presença de fibrilas conectando a bactéria a membrana da célula hospedeira (seta). Barra representa 0,5  $\mu\text{m}$ . (b) Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a presença de *M. haemofelis* dentro de depressão na superfície eritrocitária (seta) após 10 dias de infecção experimental em um gato. Barra representa 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: (a) NEIMARK et al., 2004; (b) WILLI et al., 2011.

### 3.1.3 Transmissão

A transmissão da micoplasmose ocorre principalmente através de vetores hematófagos. Estudos demonstraram que artrópodes infectados podem transmitir experimentalmente a doença, dentre eles destaca-se a pulga (*Ctenocephalides felis*) para os felinos e o carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) para os caninos (SENEVIRATNA et al., 1973; LAPPIN et al., 2003; WOODS et al., 2005).

Outras pesquisas sugerem que micoplasmas possam ser transmitidos por outros artrópodes hematófagos tais como piolhos da espécie *Polyplax serrata* e *P. spinulosa*, mosquitos da espécie *Aedes aegypti* e moscas do gênero *Stomoxys* (PRULLAGE et al., 1993; MESSICK, 2003; WOODS et al., 2005; BIONDO et al., 2009)

Estudos moleculares demonstraram que o DNA (Ácido Desoxirribonucleico) de *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi detectado em pulgas adultas, ovos e até fezes de gatos, porém em cães o papel da *C. felis* na transmissão de hemoplasmas ainda não está totalmente elucidado (WOODS et al., 2005; HORNOK et al., 2010).

Pesquisa conduzida por Lappin et al. (2003) demonstraram que a pulga infectada por *M. haemofelis* pode transmitir o microorganismo para um felino susceptível, porém o mecanismo e/ou condições necessárias para a transmissão não são conclusivas. A tentativa de transmissão a gatos saudáveis a partir de pulgas infectadas mostrou que apenas um de seis animais estudados foi positivo para *M. haemofelis* mesmo que assintomático (WOODS et al., 2006).

‘*Candidatus M. turicensis*’ e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ já foram identificados, através de técnicas moleculares na saliva e glândulas salivares de gatos infectados experimentalmente, o que sugere que lambeduras ou até mesmo a ocorrência de brigas entre animais pode facilitar a transmissão da doença, porém, como a carga parasitária na saliva é baixa, a interação entre os animais deve ser agressiva para permitir a infecção (WILLI et al., 2007; DEAN et al., 2008).

A transmissão iatrogênica já foi sugerida em um canino por Sykes et al., (2004). Assim, devido à possibilidade de transmissão de doença a animais receptores de sangue o American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) determinou, dentre diversos testes a identificação de *M. haemocanis* em cães doadores, uma vez que esses podem não apresentar evidência clínica da doença (WARDROP et al., 2005).

A transmissão vertical de *M. haemofelis* é possível, no entanto é infrequente, desconhecendo se a transmissão ocorre intrauterina, durante o parto e/ou no aleitamento (TASKER, 2006a).

O potencial zoonótico dos hemoplasmas já foi relatado a partir da identificação do DNA do parasita em humanos, porém a via de transmissão que propicia tais infecções não está completamente elucidada (DOS SANTOS et al. 2008; MAGGI et al., 2013).

### **3.1.4 Fatores de Risco**

Vários fatores de risco estão relacionados com a infecção por microorganismos do gênero *Mycoplasma*, dentre os quais se destaca: sexo, idade e estado imune, presença de animais contaminantes, ectoparasitos além de estresse e co-infecções (GRINDEM et al., 1990; TASKER et al., 2003).

Pesquisas relatam que animais jovens são mais acometidos (SYKES et al., 2008; NOVACCO et al., 2010) outras, que animais adultos são mais predispostos (TASKER et al., 2003; BAUER et al., 2008). Kenny et al. (2004) e Wengi et al. (2008) no entanto, ressaltam que a idade e a raça parecem não exercer risco para a infecção. Quanto ao sexo, autores referem que em felinos, os machos são mais frequentemente acometidos (TASKER et al., 2003; LURIA et al., 2004; WILLI et al., 2006b; SYKES et al., 2008).

Em animais domésticos a co-infecção e o estado imune parecem exercer importância na infecção hemotrópica (TASKER, 2006a). Co-infecções com retrovírus já foram descritas no Brasil em felinos domésticos (BORTOLI et al., 2012) e selvagens (RIVETTI JÚNIOR, 2006), enquanto que em cães domésticos, Trapp et al. (2006) e Ramos et al. (2010) observaram co-infecção com *Babesia gibsoni* e *Hepatozoon canis*, respectivamente.

### **3.1.5 Patogenia e Sinais Clínicos**

#### **3.1.5.1 Doença Aguda**

A sintomatologia da doença aguda em animais domésticos é alvo de várias pesquisas na medicina veterinária. Em gatos a fase aguda está relacionada principalmente a infecção por *M. haemofelis*, associada com massiva parasitemia

eritrocitária relacionada com a intensa anemia hemolítica (MESSICK, 2004; SANTOS, 2008). Pesquisas envolvendo animais infectados natural e experimentalmente incluem como sintomas: febre, letargia, anorexia, esplenomegalia e icterícia (TASKER et al., 2003; MESSICK, 2004).

A infecção por '*Candidatus M. haemominutum*' produz pouca ou nenhuma sintomatologia, normalmente não associada com a letalidade em gatos domésticos (FOLEY; PEDERSEN, 2001; MESSICK, 2004). O potencial patogênico desta espécie assim como do '*Candidatus M. turicensis*' depende, segundo Willi et al. (2007) e Hora (2008) das condições de imunossupressão ou co-infecção com outra espécie de hemoplasmas ou até mesmo outro agente patogênico.

A anemia induzida pela infecção hemotrópica é do tipo regenerativa e macrocítica exibindo ainda policromasia, anisocitose, além de reticulocitose (FOLEY et al., 1998; TASKER; LAPPIN, 2006). Alguns animais podem desenvolver anemia hemolítica imunomediada, caracterizada pela hemólise intravascular e consequente hemoglobinúria (FIGHERA, 2001).

Os principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da anemia em animais infectados são: lesão eritrocitária direta, hemólise imunomediada, sequestro de reticulócitos – que por serem imaturos são sequestrados pelo sistema fagocítico mononuclear, além da eritrofagocitose de células parasitadas que são destruídas no baço, fígado e na medula óssea quando em episódios de intensa parasitemia – podendo nesses casos, ocasionar a hiperplasia linfóide desses tecidos (MESSICK; HARVEY, 2012).

Segundo Messick e Harvey (2012), antes de exibir sinais clínicos característicos da doença, os felinos frequentemente apresentam hematócrito abaixo de 20%, porém, tal parâmetro não é um bom indicador clínico de gatos infectados, uma vez que os eritrócitos parasitados primariamente podem ser sequestrados pelo baço, fígado e/ou medula óssea e após remoção do microorganismo da superfície celular, estes retornarem a corrente sanguínea.

Em gatos as alterações leucométricas, referentes à contagem total ou diferencial são variáveis e por isso de pouco valor diagnóstico, embora possam ser comumente notados um aumento na atividade monocítica, neutrofilia na fase aguda e neutropenia em casos crônicos (FOLEY et al., 1998; MESSICK; HARVEY, 2012). De acordo com Messick e Harvey (2012), normalmente não são observadas alterações no número de plaquetas em felinos infectados.

A infecção hemotrópica em cães, principalmente causadas por *M. haemocanis*, pode cursar de duas formas: forma aguda caracterizada por intensa parasitemia polissintomática e a infecção latente em cães saudáveis, normalmente assintomática (MESSICK, 2003).

Em cães a infecção aguda é normalmente observada em animais esplenectomizados e/ou imunossuprimidos (KEMMING et al., 2004). Porém infecções concomitantes com outros hemoparasitos ou até mesmo bacteremias inespecíficas favorecem a fase aguda nesses animais (KRAJE, 2001; INOKUMA et al., 2006; TRAPP et al., 2006).

O espectro clínico é variável e pouco específico podendo ser observados sintomas como: anorexia, letargia, perda de peso, febre (KEMMING et al., 2004; MESSICK, 2004) ou até mesmo prostração e anemia acompanhados de normorexia e temperatura retal normal (MESSICK; HARVEY, 2012). Em casos graves anemia hemolítica severa também pode ser observada (WENGI et al. 2008).

Barker et al. (2010) referem que a infecção hemotrópica em cães parece induzir anemia grave somente em cães esplenectomizados. Kemming et al. (2004) descrevem que os sinais clínicos aparecem no período de 1-2 semanas após infecção e, além de anemia, observa-se leucopenia ou leucocitose e trombocitopenia principalmente em cães infectados por *M. haemocanis*.

Sykes et al. (2004) afirmam que em cães imunossuprimidos e/ou esplenectomizados a infecção causada pelo ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ apresenta sinais clínicos mais severos.

### 3.1.5.2 Doença Crônica

A infecção crônica em felinos está associada à ausência de sinais clínicos, porém, não está estabelecida a consequência da infecção em longo prazo, uma vez que animais cronicamente infectados podem tornar-se anêmicos e/ou apresentarem episódios de imunossupressão (MESSICK, 2004).

O animal que permanece portador apresenta pequenas diminuições no hematócrito, variando de 25-35%, porém, nunca menor que 20%, além disso, a detecção direta do parasita em lâmina torna-se mais difícil. Berent (2002) comprovou que felinos experimentalmente infectados tornam-se portadores mesmo após administração antimicrobiana.

Shelton e Linerberger (1995) sugerem que a infecção crônica por *M. haemofelis* pode induzir a transformação neoplásica de células hematopoiéticas em animais positivos para o vírus da leucemia felina (FeLV).

Além do estado imune e presença de co-infecções a infecção canina por *M. haemocanis* também é favorecida, de forma bem significativa, pela esplenectomia (LESTER et al., 1995; KEMMING et al., 2004).

Em caninos domésticos, a infecção crônica é comumente observada em casos onde há imunossupressão ou esplenectomia sendo os sinais clínicos inespecíficos (MESSICK, 2004) ou até mesmo inaparentes (MESSICK; HARVEY, 2012). Segundo Chalker (2005), anorexia, letargia e febre já foram identificadas em animais com infecção crônica.

Na fase crônica a bacteremia é discreta, logo, o número de microorganismos circulantes estará diminuído, o que dificulta o estabelecimento do diagnóstico através da avaliação direta por microscopia óptica (KEMMING et al., 2004; MESSICK, 2004)

### **3.1.6 Diagnóstico**

O diagnóstico da micoplasmose pode ser realizado através da confecção de esfregaços sanguíneos, realizados durante a fase bacterêmica, porém com baixa sensibilidade e especificidade (BRINSON; MESSICK, 2001, CHALKER, 2005). O microorganismo é comumente encontrado na superfície eritrocitária podendo estar isolado ou formando cadeias, nos casos de infecções graves (WANDER, 2009).

Devido aos episódios cíclicos de parasitemia – infecções por *M. haemofelis* podem chegar a níveis indetectáveis em até uma hora em animais sadios e/ou esplenectomizados (BERENT et al., 1998) – aliados a possibilidade de confundir o parasita com precipitados de corantes, corpúsculos de *Howell-Jolly* ou até mesmo protozoários do gênero *Cytauxzoon*, tornam a microscopia óptica um método limitado e de baixo diagnóstico (KEMMING et al., 2004; MESSICK; HARVEY, 2012).

A confecção de esfregaços sanguíneos imediatamente após a coleta sanguínea ajuda a minimizar as chances de diagnóstico falso-positivo, uma vez que *M. haemocanis* pode ser removido da superfície eritrocitária pela ação do EDTA ou quando há tempo prolongado entre a coleta e a análise (JAIN et al., 1993; KEMMING et al., 2004; VALLE, 2011).

Técnicas moleculares se fizeram necessárias para o diagnóstico da infecção hemotrópica. A PCR e suas variantes são técnicas altamente sensíveis e específicas que partindo de sequências alvo – principalmente da subunidade 16S rRNA – promove a amplificação exponencial *in vitro* de um fragmento de DNA do parasito, permitindo o diagnóstico em infecções agudas e crônicas servindo ainda como método de identificação de animais portadores impedindo assim o uso desses como doadores sanguíneos (FOLEY; PEDERSEN, 2001; JENSEN et al., 2001; SANTOS, 2008).

A extração de DNA de amostras oriundas de cães, gatos e até de vetores artrópodes, e a análise molecular tem tido mais sucesso como método diagnóstico, principalmente pela rapidez de testar amostras sanguíneas, mesmo que congeladas, ou até fragmentos oriundos de biópsias recentes (CHOMEL et al., 2004).

O gene ribossomal 16S rRNA serve como base para a pesquisa hemotrópica (WILLI et al, 2007), a partir do qual diversos pares de primers são desenhados e validados como importantes ferramentas de diagnóstico (MESSICK, 2004).

Em virtude da similaridade genética do 16S rRNA entre hemoplasmas de caninos e felinos, para amplificação desses bioagentes em cães são usados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas pesquisas em gatos, onde *M. haemofelis* está relacionado com *M. haemocanis* enquanto que ‘*Candidatus M. haemominutum*’ relaciona-se com ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ (BRINSON E MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002; MESSICK et al., 2002).

Segundo Berent et al., (1998) e Foley et al. (1998), microorganismos do gênero *Mycoplasma* não se multiplicam em cultura e são insensíveis a testes sorológicos.

### **3.1.7 Aspectos Epidemiológicos**

#### **3.1.7.1 Felinos**

Em felinos três espécies infectantes de hemoplasmas são relatadas: *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’, sendo o primeiro considerado mais patogênico (TASKER, 2010).

Na última década estudos vêm demonstrando a distribuição mundial da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos e silvestres (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; LAPPIN et al., 2006; WILLI et al., 2006a; WILLI et al., 2007; KAMRANI et al., 2008; ZHUANG et al., 2009; ROURA et al., 2010; MARTINS, 2011).



No Brasil, Rivetti Júnior (2006) evidenciou em esfregaços sanguíneos por microscopia óptica, a ocorrência de hemoplasmas em gatos errantes de Belo Horizonte – Minas Gerais, com uma frequência de 22,2% (10/45) de animais positivos.

Braga (2010) avaliou os principais hemoparasitos de gatos peridomiciliados na cidade de São Luís – Maranhão e detectou através de técnica molecular (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR) 2,5% (5/200), 2% (4/200) e 10% (20/200) de positividade para *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. turicensis*’ e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, respectivamente.

Em Porto Alegre – Rio Grande do Sul, a pesquisa de hemoplasmas em felinos domésticos foi realizada através de PCR convencional por Santos (2008). De um total de 371 amostras, 13,48% (50) apresentaram infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’, 2,69% (10) por ‘*Candidatus M. turicensis*’ e 2,16% (8) por *M. haemofelis*. Co-infecção com *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi detectada em 1,08% (4), e com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ em 1,35% (5) dos animais estudados. Nesse mesmo estudo foi evidenciado o primeiro relato da infecção tripla em 0,54% (2/371) dos animais.

Hora (2008), avaliou através da técnica de *nested*-PCR a magnitude da infecção por micoplasmas em gatos anêmicos em São Paulo, encontrou 25 animais positivos. Dentre as amostras, 8,5% (23/270) eram *M. haemofelis*, 0,4% (1/270) ‘*Candidatus M. turicensis*’ e 0,4% (1/270) *M. haemocanis*, sendo o primeiro relato da infecção por tal espécie em felino doméstico.

García Leal (2009), através da amplificação do gene 16S rRNA (Ácido Ribonucléico Ribossômico) por meio da técnica de *nested*-PCR, buscando avaliar o impacto da infecção hemotrófica em felinos com linfoma, encontrou 7,14% (1/14) dos animais positivos para *M. haemofelis*. O animal em questão não apresentava anemia apesar de infecção concomitante com FeLV.

Bortoli et al. (2012) analisaram amostras sanguíneas de gatos domésticos saudáveis oriundos de um programa de castração gratuita em Jaboticabal - São Paulo, e identificaram através da PCR a ocorrência das espécies de micoplasmas felinos com frequências de 4,3% (2/46) para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 2,2% (1/46) dos animais apresentaram co-infecção com *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. turicensis*’.

Rivetti Júnior (2006) avaliando esfregaços sanguíneos de felinos selvagens cativos do Zoológico de Belo Horizonte – Minas Gerais encontrou 31,6% (6/19) dos animais positivos para micoplasmas hemotróficos. A presença de ‘*Candidatus M.*

haemominutum' também já foi relatada em uma amostra sanguínea de *Panthera leo* submetida a análise molecular (PCR). Como o animal não apresentava sinais clínicos nem alterações hematológicas foi suposto tratar-se de uma infecção crônica (Guimarães et al, 2007).

### 3.1.7.2 Caninos

Cães são normalmente infectados por pelo menos duas espécies de micoplasmas: *M. haemocanis* e 'Candidatus *M. haematoparvum*' (BIONDO et al., 2009). Porém, já foram descritas infecções por outras duas espécies, 'Candidatus *M. haemominutum*' e 'Candidatus *M. turicensis*' (WILLI et al., 2006a; ZHUANG et al., 2009).

Apesar de serem realizados estudos mais pontuais quando comparados aos hemoplasmas felinos, as duas principais espécies parasitas de caninos apresentam distribuição mundial já sendo identificadas, por meio de técnicas moleculares (PCR e PCR em tempo real) infecções em diversos países como, França (KENNY et al., 2004), Suíça (WENGI et al., 2008), Espanha (ROURA et al., 2010), Tanzânia (BARKER et al., 2010), China (ZHUANG et al., 2009) e Japão (OBARA et al., 2011).

No Brasil estudos estão sendo realizados no intuito de avaliar a ocorrência de hemoplasmas em animais domésticos e selvagens. Mundim et al. (2008) pesquisando hemoparasitos em esfregaços sanguíneos de cães capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses em Anápolis – Goiás, observaram frequência de 33,96% (18/53) de positividade entre os animais. Destes, 27,78% (5/18) apresentavam-se infectados por microorganismos do gênero *Mycoplasma* sp.

Braz et al. (2012), relataram a presença de *M. haemocanis* em esfregaço sanguíneo, após pesquisa em microscopia óptica direta. O animal apresentava apatia, perda de peso e diarreia sanguinolenta e no exame hematológico foi evidenciada leucopenia e trombocitopenia.

Valle (2011) avaliou um total de 313 amostras de sangue canino por PCR convencional, em Passo Fundo – Rio Grande do Sul, onde 5,1% (17/313) foram positivos para *M. haemocanis* e 1,8% (6/313) para um microorganismo com semelhança genética ao 'Candidatus *M. haemominutum*'.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas um total de 299 amostras sanguíneas de cães e gatos, de diferentes faixas etárias, obtidas no período de agosto de 2012 a maio de 2013. Os animais foram divididos, de acordo com a procedência, em dois grupos: o grupo A representou os animais domiciliados e o grupo B os animais de abrigos, conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Totalidade de animais estudados em função da espécie, sexo e grupo de estudo.

Grupo	Caninos		Felinos		Total
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	
A <sup>1</sup>	44	51	39	31	165
B <sup>2</sup>	33	41	22	38	134
Total	77	92	61	69	299

<sup>1</sup>Amostras oriundas de animais atendidos em ambulatórios de serviços veterinários e/ou recebidas pelo serviço de extensão do Laboratório de Tecnologia Biomolecular da Universidade Federal do Pará (LTB-UFPA).

<sup>2</sup>Amostras de animais errantes recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Belém e/ou instituições mantenedoras.

Após contenção física dos animais, foi realizada a coleta asséptica de 2-5 mL de sangue total, através de venipunção jugular ou cefálica. O sangue foi acondicionado em tubo estéril contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) e armazenado a 4°C até a extração do DNA, realizada no Laboratório de Tecnologia Biomolecular da Universidade Federal do Pará (LTB-UFPA).

O DNA genômico de cada amostra foi extraído através do método fenol-clorofórmio seguindo procedimentos padrões descritos por Sambrook et al. (1989) e armazenado a uma temperatura de -20°C até a realização dos procedimentos moleculares para detecção dos hemoparasitos.

## 4.2 ANÁLISES MOLECULARES

### 4.2.1 Detecção de *Mycoplasma* sp.

O diagnóstico da infecção por microorganismos do gênero *Mycoplasma* foi realizado com base na amplificação de um fragmento do RNA ribossomal (16S rRNA) de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus* M. haemominutum' através de uma (PCR), utilizando os iniciadores HBT-F [5'ATACGGCCCATATTCCTACG 3'] e HBT-R [5' TGCTCCACCACTTGTTCA 3'], os quais produzem um fragmento de 595 pares de base (pb) para *M. haemofelis* e 618 pb para *Candidatus* M. haemominutum (CRIADO-FORNELIO et al., 2003).

As reações foram realizadas em um volume total de 25 µL contendo 10 – 20 ng de DNA molde, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM de cada um dos dNTPs, 5 mM de cada iniciador e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e água purificada para completar o volume final da reação. O perfil de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial de 10 min a 94°C, 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C e 30 seg a 72°C, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C.

### 4.2.2 Detecção de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp.

O diagnóstico da infecção por microorganismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* foi realizado com base na amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA de *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* através de uma multiplex PCR.

A amplificação foi realizada em reações com volume final de 25 µL, seguindo protocolo descrito por Rufino et al. (2013), e produziram fragmentos de 478 pb na primeira reação e 389 pb e 212 pb na segunda reação, respectivamente para *E. canis* e *A. platys*.

### 4.2.3 Detecção de *Babesia* sp.

O diagnóstico da infecção por microorganismos do gênero *Babesia* foi realizado com base na amplificação de um fragmento do gene 18S rDNA de *Babesia canis* através de uma semi-nested PCR, a partir de otimização de protocolo de PCR simples, realizado por Moraes et al. (2014). Todas as reações foram realizadas em volume final

de 25 µL, e produziam fragmentos de 394 pb na primeira reação e 208 pb na segunda reação (MORAES et al. (2014)

#### 4.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Para a detecção dos fragmentos amplificados, 4 µl de cada uma das reações foram misturados a 1 µl de *GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid stain* (Biotium), e então submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) e visualização em fotodocumentador E-BOX VX2 (Vilber Lourmat<sup>®</sup>). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado comparando-se com os marcadores de peso molecular 100 pb e/ou 1 Kb (DNA ladder Invitrogen<sup>®</sup>).

Como controle positivo foi utilizado em cada reação uma amostra previamente identificada como positiva para cada um dos hemoparasitos e como controle negativo foi utilizado água bidestilada estéril.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS PARASITOS

Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, excisado e purificado com auxílio do *GFX PCR DNA e Gel Purification kit* (GE Healthcare). Uma alíquota de cada produto purificado foi ligada ao plasmídeo *pGEM-T vector* (Promega) *overnight* e, então, inserido em *Escherichia coli* JM 109 (Promega).

O inserto de DNA de clones recombinantes foi obtido por PCR diretamente das colônias usando os primers M13F/M13R e sequenciado automaticamente em um 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), de acordo com as especificações do fabricante. O programa BioEdit (HALL, 1999) foi usado para o alinhamento e edição manual das sequências.

Comparações com sequências depositadas no GenBank foram feitas usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). O programa PAUP (SWOFFORD, 2002) foi utilizado para análise filogenética, baseada no método de distância Neighbor-Joining usando o modelo Kimura-2-parâmetros. O teste de *Bootstrap* com 1000 pseudoréplicas foi feito para estimar a confiança do padrão de agrupamento da árvore Neighbor-Joining. A distância ‘P’ foi avaliada também pelo programa PAUP (SWOFFORD, 2002).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

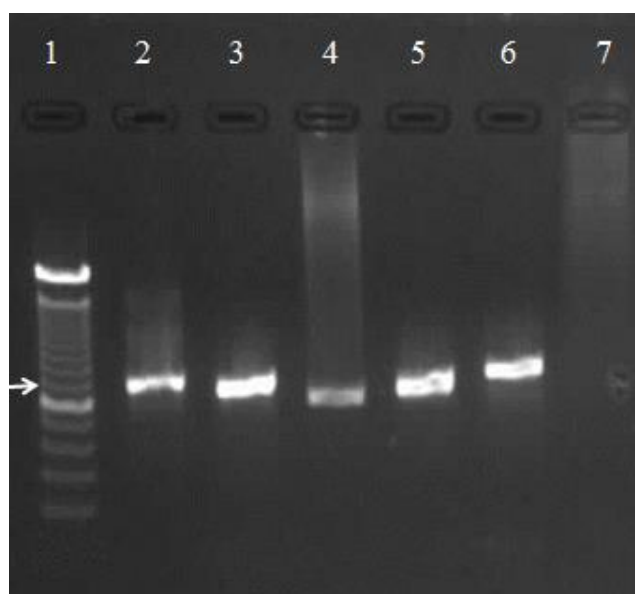
Os dados foram avaliados através de software estatístico *Statistical Analysis System* - SAS (SAS, 2001), utilizando-se o teste estatístico qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com nível de significância de 5%. Em felinos foram comparadas as frequências das variáveis positivo e negativo para hemoplasmas e outros hemoparasitos, de acordo com, sexo e grupo de estudo.

Em caninos, em virtude no da baixa frequência foram comparadas através de estatística descritiva as variáveis positivo e negativo para hemoplasmas e outros hemoparasitos, de acordo com, sexo e grupo de estudo. Quanto a variável caracterização molecular dos hemoplasmas encontrados, foi realizada estatística descritiva.

## 5 RESULTADOS

O produto das análises moleculares, gerou amplicons dentro dos tamanhos esperados, variando entre 595 e 618 pb, tanto para a pesquisa de hemoplasmas em felinos quanto em caninos, conforme demonstrado na Figura 3.

**Figura 3** - Detecção de *Mycoplasma* sp. através de PCR, em amostras de sangue total de cães e gatos. Linha 2 corresponde a amostra de felino doméstico positiva para '*Candidatus M. haemominutum*'; Linha 3 corresponde a amostra de felino doméstico positiva para *Mycoplasma haemofelis*; Linha 4 corresponde a amostra de canino doméstico positiva para '*Candidatus M. haematoparvum*'; Linhas 5 e 6: controles positivos para '*C.M. haemominutum*' e *M. haemofelis*'; Linha 7 corresponde ao controle negativo da reação; Linha 1 corresponde ao Ladder 100 pb (O'GeneRuler). A seta corresponde ao fragmento de 600 pb do ladder.



Das 299 amostras de cães e gatos analisadas, em 8,03% (24/299) foi amplificado o DNA de micoplasmas hemotrópicos, sendo 1,78% (3/169) de cães e 16,15% (21/130) de gatos infectados (Tabela 2). A análise interespecie mostrou que há diferença estatística quanto à prevalência de micoplasmas hemotrópicos entre as espécies estudadas ( $p = < 0001$ ).

**Tabela 2** - Comparação das frequências globais de animais infectados por hemoplasmas em função das espécies estudadas.

Resultado	Espécie		Total
	Caninos	Felinos	
Negativos	98,22% (166/169)	83,85% (109/130)	91,97% (275/299)
Positivos	1,78% (3/169)	16,15% (21/130)	8,03% (24/299)

$$\chi^2 = 20,5777; p = <0001$$

As distribuições dos casos positivos e negativos em função da espécie, grupo e sexo estão dispostas nas Tabelas 3 e 4.

**Tabela 3** - Frequência de distribuição dos resultados para micoplasmas hemotrópicos em felinos e caninos em função do grupo de estudo dos animais.

Resultado	Felino		Canino	
	Abrigo	Domiciliado	Abrigo	Domiciliado
Negativo	91,67% (55/60)	77,14% (54/70)	95,95% (71/74)	100% (95/95)
Positivo	8,33% (5/60) <sup>a</sup>	22,86% (16/70) <sup>b</sup>	4,05% (3/74) <sup>a</sup>	NA*(0/95) <sup>b</sup>

\*NA: Não Amplificado em nenhuma amostra.

<sup>a,b</sup> Letras diferentes em colunas diferentes indicam diferença estatística significativa.

Felinos ( $\chi^2=5.0316/ p=0.0249$ )

**Tabela 4** - Frequência de distribuição dos resultados para micoplasmas hemotrópicos em amostras de felinos e caninos em função do sexo dos animais.

Resultado	Felinos		Caninos	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Negativo	70,49% (43/61)	95,65% (66/69)	97,40% (75/77)	98,91% (91/92)
Positivo	29,51% (18/61) <sup>a</sup>	4,35% (3/69) <sup>b</sup>	2,60% (2/77) <sup>a</sup>	1,09% (1/92) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes em colunas diferentes indicam diferença estatística significativa.

Felinos ( $\chi^2= 15.1325 p=0.0001$ )

O sequenciamento genético das amostras provenientes de cães e gatos foi realizado em 23 das 24 amostras positivas, sendo uma amostra de felino excluída da análise interespecífica. A análise das sequências dos hemoplasmas mostrou que os felinos estão parasitados exclusivamente por espécies de microorganismos de ocorrência em gatos enquanto que os cães estão infectados por espécies de ocorrência



exclusiva em cães. Entre as amostras de felinos, 6,92% (9/130) foram positivas para *Mycoplasma haemofelis* e 8,46% (11/130) para ‘*Candidatus M. haemominutum*’, entre os cães todos os animais positivos 1,78% (3/169) são portadores da espécie ‘*Candidatus M. haematoparvum*’.

As amostras sanguíneas também foram testadas para avaliar a incidência de outras hemoparasitoses sendo realizados testes moleculares para detecção de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis*, com o intuito de comparar a frequência global dessas hemoparasitoses com a frequência de infecção por hemoplasmas e assim verificar se há relação entre essas duas infecções, tais resultados estão expressos de acordo com a espécie nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** - Comparação da frequência de felinos infectados por hemoplasmas em função da frequência global de felinos acometidos por outras hemoparasitoses.

Resultado	Infecção	
	<i>Mycoplasma sp.</i>	Hemoparasitoses*
Negativos	83,85% (109/130)	87,69% (114/169)
Positivos	16,15% (21/130)	12,31% (16/169)

\* *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis*.  
 $\chi^2 = 10,2588$ ;  $p = 0,0014$

**Tabela 6** - Comparação da frequência de caninos infectados por hemoplasmas em função da frequência global de caninos acometidos por outras hemoparasitoses.

Resultado	Infecção	
	<i>Mycoplasma sp.</i>	Hemoparasitoses
Negativos	98,22% (166/169)	42,01% (71/169)
Positivos	1,78% (3/169)	56,21% (95/169)

\* *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis*.  
 $\chi^2 = 3,9210$ ;  $p = 0,0477$

A análise global mostrou que não há diferença estatística das taxas, de infecção por hemoplasmas e por outras hemoparasitoses nos animais do estudo ( $p = 0,4002$ ), sendo 8,03% (24/299) da totalidade de animais estudados positivos para *Mycoplasma sp.* enquanto que 37,12% (111/299) dos animais apresentavam pelo menos uma das outras hemoparasitoses testadas.

Para a análise filogenética das amostras positivas foram obtidos entre 590 e 620 nucleotídeos da subunidade 16S rRNA dos hemoplasmas encontrados. Esses

nucleotídeos foram blastados e alinhados com as sequências de hemoplasmas previamente depositadas no GenBank conforme refere a Tabela 7. Após a comparação das sequências através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) foi possível evidenciar similaridade entre o hemoplasmas parasitos de cães dessa pesquisa (*Candidatus M. haematoparvum*), e os hemoplasmas encontrados em gatos (*Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus M. haemominutum*), apresentando cobertura e identidade iguais ou superiores a 90% e 95%, respectivamente.

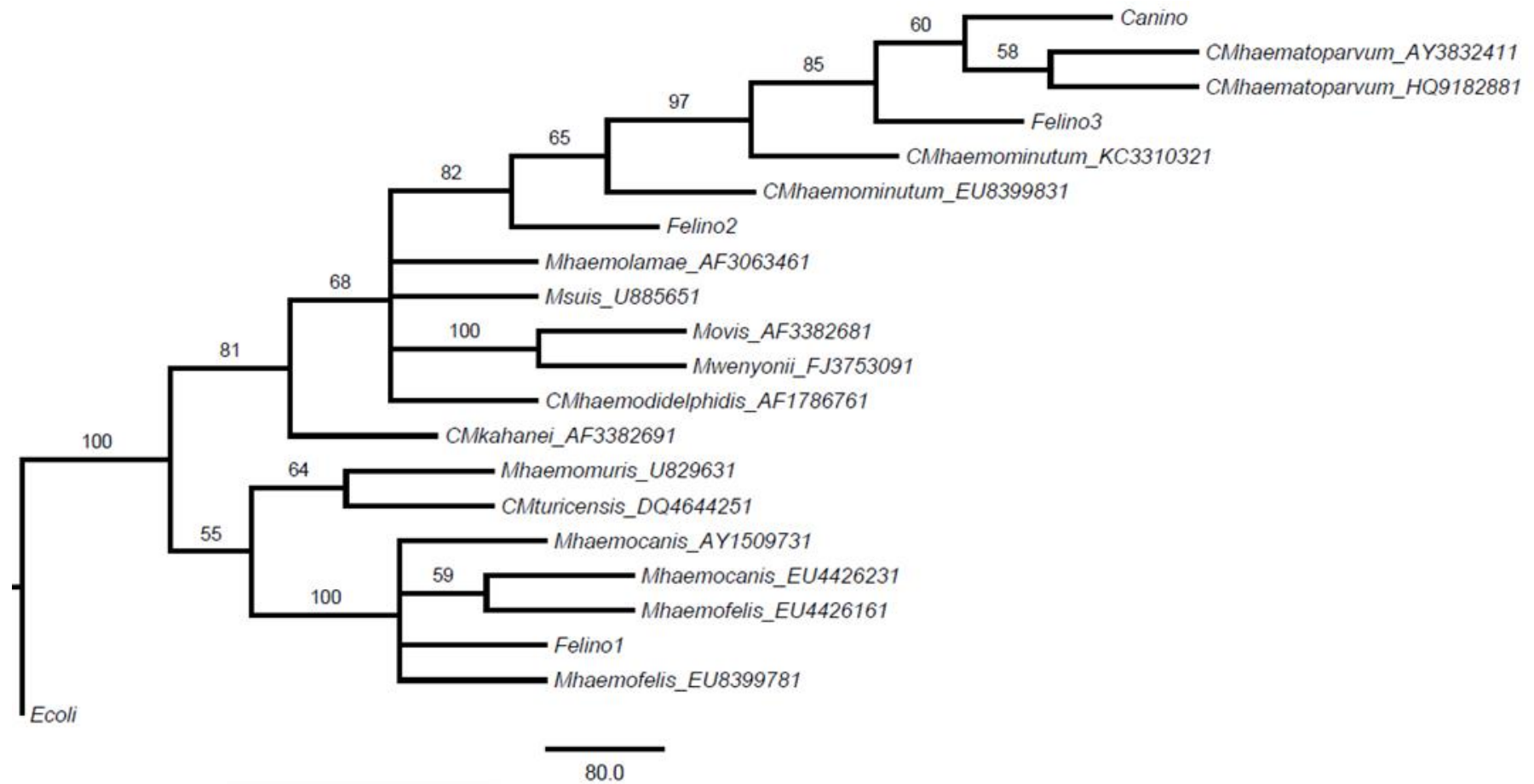
**Tabela 7** – Identificação das espécies de hemoplasmas depositadas nos GenBank e referidas no presente estudo para construção filogenética.

Hemoplasma	Identificação	Origem	GenBank
<i>Candidatus M. haematoparvum</i>	Canino 1	Pará - Brasil	-
<i>Candidatus M. haematoparvum</i>	CMhparv 1	EUA*	AY3832411
<i>Candidatus M. haematoparvum</i>	CMhparv 2	Brasil	HQ9182881
<i>Mycoplasma haemolamae</i>	Mhamla	EUA	AF3063461
<i>Mycoplasma suis</i>	Msuis	EUA	U885651
<i>Mycoplasma ovis</i>	Movis	EUA	AF3382681
<i>Candidatus Mycoplasma wenyonii</i>	CMwen	China	FJ3753091
<i>Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis</i>	CMhadi	EUA	AF1786761
<i>Candidatus Mycoplasma kahanei</i>	CMkah	EUA	AF3382691
<i>Mycoplasma haemomuris</i>	Mham	EUA	U829631
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Mhac 1	Alemanha	AY1509731
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Mhac 2	Brasil	EU4426231
<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>	CMturis	Alemanha	DQ4644251
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Felino 1	Pará - Brasil	-
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Mhaf 1	Brasil	EU4426161
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Mhaf 2	Itália	EU8399781
<i>Candidatus M. haemominutum</i>	CMhaem 1	Itália	EU8399831
<i>Candidatus M. haemominutum</i>	Felino 2	Pará - Brasil	-
<i>Candidatus M. haemominutum</i>	Felino 3	Pará - Brasil	-
<i>Candidatus M. haemominutum</i>	CMhaem 2	Brasil	KC3310321
<i>Escherichia coli</i> (Grupo Externo)	<i>E.coli</i>	-	XJALT127

\* EUA – Estados Unidos

As análises filogenética (Figura 4) e de distância (Tabelas 8 e 9) pelo método Neighbor-Joining permitiu inferir com base na sequência do gene 16s rRNA dos micoplasmas encontrados no presente estudo, que o hemoplasma parasito de cães pertence a espécie '*Candidatus M. haematoparvum*' e que os parasitos observados em felinos pertencem as espécies '*Candidatus M. haemominutum*' e *Mycoplasma haemofelis*. Adicionalmente foi possível observar a estreita relação filogenética entre as espécies '*Candidatus M. haematoparvum*' e '*Candidatus M. haemominutum*'

**Figura 4** - Árvore filogenética para *Mycoplasma* sp. utilizando o método Neighbor-Joining, modelo Kimura-2-parâmetros construída a partir do programa PAUP (SWOFFORD, 2002). A inscrição ‘Canino’ representa amostra de ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, a inscrição ‘Felino 1’ representa amostra de *Mycoplasma haemofelis* e as inscrições ‘Felino 2 e 3’ representas amostras de ‘*Candidatus M. haemominutum*’. *Escherichia coli* XJALT-127 foi utilizada como grupo externo.



**Tabela 8** – Distância ‘P’ obtida utilizando as sequências do presente estudo em comparação a sequências de micoplasmas hemotrópicos disponíveis no *GenBank*.

Cepa	Mham	Mhac 1	Mhac 2	CMturis	Felino 1	Mhaf 1	Mhaf 2	CMhaem 1	Felino 2	Felino 3	CMhaem 2
Mham	0.000										
Mhac 1	0.109	0.000									
Mhac 2	0.112	0.000	0.000								
CMturis	0.092	0.103	0.107	0.000							
Felino 1	0.108	0.001	0.001	0.101	0.000						
Mhaf 1	0.112	0.001	0.001	0.105	0.000	0.000					
Mhaf 2	0.108	0.001	0.001	0.101	0.000	0.000	0.000				
CMhaem 1	0.176	0.170	0.170	0.175	0.169	0.168	0.169	0.000			
Felino 2	0.177	0.172	0.172	0.177	0.170	0.170	0.170	0.001	0.000		
Felino 3	0.199	0.211	0.215	0.202	0.208	0.211	0.208	0.010	0.010	0.000	
CMhaem 2	0.222	0.217	0.208	0.212	0.215	0.206	0.215	0.052	0.053	0.076	0.000
<i>E.coli</i>	0.301	0.310	0.314	0.314	0.312	0.317	0.312	0.322	0.324	0.353	0.359

**Tabela 9** – Distância ‘P’ obtida utilizando as sequências do presente estudo em comparação a sequências de micoplasmas hemotrópicos disponíveis no *GenBank*.

Cepa	Canino 1	CMhparv 1	CMhparv 2	Mhamla	Msuis	Movis	CMwen	CMhadi	CMkah
Canino 1	0.000								
CMhparv 1	0.002	0.000							
CMhparv 2	0.000	0.020	0.000						
Mhamla	0.076	0.090	0.098	0.000					
Msuis	0.100	0.111	0.118	0.075	0.000				
Movis	0.090	0.109	0.111	0.080	0.087	0.000			
CMwen	0.092	0.106	0.114	0.071	0.083	0.022	0.000		
CMhadi	0.092	0.116	0.108	0.110	0.106	0.095	0.100	0.000	
CMkah	0.092	0.109	0.111	0.081	0.095	0.100	0.104	0.100	0.000
<i>E.coli</i>	0.356	0.329	0.369	0.320	0.328	0.315	0.321	0.314	0.308

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a presença de DNA de *Mycoplasma* sp. em felinos e caninos domiciliados e errantes de Belém, Pará. Embora não haja relato científico da ocorrência e prevalência de hemoplasmas em caninos e apenas um em felinos na região norte brasileira (ARAGÃO DE SOUSA et al., 2013) a frequência de animais positivos em Belém, com base em testes moleculares, assemelha-se às descritas para outras regiões do Brasil.

A prevalência de 16,15% (21/130) encontrada em felinos no presente estudo está de acordo com a distribuição mundial, cuja ocorrência varia entre 4% e 43,43% (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003; KAMRANI et al., 2008; BARKER et al., 2010; ROURA et al., 2010; MARTINS, 2011; MARTÍNEZ DÍAZ et al., 2013). Contudo esses dados são menores do que os encontrados em algumas regiões Brasileiras. Santos (2008) encontrou prevalência de 21,3% (79/371) em Porto Alegre e Firmino (2008) relatou prevalências de 33% e 32,6% em felinos na cidade de Brasília.

Por outro lado, a prevalência do presente estudo mostrou-se superior a encontrada por Bortoli et al. (2012) 6,5% (3/46) em Jaboticabal (São Paulo), Hora (2008) 9,25% (25/270) na cidade de São Paulo, Maia (2008) 14% (29/207) em diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro e Aragão de Sousa et al. (2013) 9,45% (19/201) em estudo semelhante na cidade de Belém (Pará).

Ao analisar a distribuição das amostras positivas em função dos grupos de estudo observou-se que a prevalência foi maior em animais domiciliados 22,86% (16/70), tais resultados podem ser reflexo da origem da população uma vez que essas amostras procederam de casos atendidos e/ou enviados a hospitais e laboratórios de serviços médico veterinários.

Estudo conduzido por Martins (2011) em uma população de gatos de abrigo em Lisboa (Portugal) registrou prevalência de 4% (2/50) entre os animais, inferior ao encontrado no presente estudo em animais sob mesma condição que foi 8,33% (5/60).

Esse dado, porém difere dos encontrados no Canadá por Kamrani et al. (2008) com prevalência de 4% (30/742) entre amostras de animais domiciliados enviadas a laboratórios de diagnóstico veterinário enquanto que em animais errantes a prevalência foi de 60% (27/45) e Braga et al. (2012) que relataram prevalência de 14,5% (29/200) em gatos errantes na cidade de São Luís, Maranhão.

Aragão de Sousa (2013) avaliando amostras sanguíneas de animais domiciliados atendidos em hospital veterinário e errantes na cidade de Belém encontrou respectivamente prevalências de 2,63% (1/38) e 13,86% (14/101), resultados que diferem do presente estudo que registrou ocorrência superior em grupo de animais domiciliados sob mesma condição que foi de 22,86% (16/70), porém inferior quando comparado aos dados de felinos errantes que representaram 8,33% (5/60) da positividade para hemoplasmas nesse grupo.

No que tange a influência do sexo na infecção hemotrópica foi observado associação estatística entre machos e fêmeas, sendo os machos mais susceptíveis a infecção com 29,51% (18/61) de positividade, corroborando com os dados encontrados por Willi et al. (2006b) que referiram 58 (75,3%) dentre 77 animais infectados como pertencentes ao sexo masculinos e Firmino (2008) que encontrou frequência de 75% (12/16) em felinos machos errantes na cidade de Brasília, DF.

Sykes (2003) e Santos (2008) referem que animais machos e com acesso à rua são mais passíveis a infecção por microorganismos do gênero *Mycoplasma*, tal fato pode ser explicado devido ao hábito de deambulação e brigas entre machos felinos Aragão de Sousa et al. (2013).

A taxa de animais positivos para '*Candidatus M. haemominutum*' 8,46% (11/130), está próxima a encontrada em outras regiões do Brasil por Hora (2008) 8,51% (23/270) em São Paulo, SP; Braga et al. (2012) 10% (20/200) em São Luís, MA; e Aragão de Sousa et al. (2013) que encontrou frequências de 7,96% (16/201) para a referida espécie na cidade de Belém, PA.

Os dados diferem, porém, dos resultados de Santos (2008) e Martínez Díaz et al. (2013) que encontraram respectivamente frequências de 13,48% (50/371) e 41% (133/320) para '*Candidatus M. haemominutum*', fato que pode ser explicado pela diferença amostral entre os estudos.

A frequência de felinos positivos para *Mycoplasma haemofelis* 6,92% (9/130), mostra-se superior à encontrada em outras regiões do Brasil por Hora (2008) 0,37% (1/270) em São Paulo, SP; Braga et al. (2012) 2,5% (5/200) em São Luís, MA; e Aragão de Sousa et al. (2013) 1,49% (3/201) em estudo na cidade de Belém, PA. Apesar de apresentarem espaço amostral superior quando comparados ao presente estudo pode-se evidenciar que a presença de *M. haemofelis* na população felina em Belém está elevada.

O estudo comparativo da ocorrência de micoplasmas hemotrópicos entre animais positivos, no presente estudo, demonstrou uma maior ocorrência de '*Candidatus M.*



haemominutum' em comparação com *M. haemofelis*, porém não foi observada diferença estatística. A proximidade das taxas de infecção pelas espécies de ocorrência em felinos em Belém é um fator importante, devido a espécie *M. haemofelis* ser a mais patogênica (TASKER, 2010).

Desta forma, alguns gatos podem sofrer anemias fatais em decorrência de baixos volumes globulares (TANENO; SACCO, 2007). Esse dado torna-se mais relevante considerando que Dos Santos et al. (2008) relataram a ocorrência no Brasil de um caso humano co-infectado com *M. haemofelis* e *Bartonella henselae*, o que permite inferir o caráter zoonótico da infecção pela referida espécie.

Os relatos acerca da distribuição mundial de hemoplasmas caninos são mais pontuais quando comparados aos estudos conduzidos em gatos, com prevalência variando entre 2,5% e 40% (KENNY et al., 2004; BARKER et al., 2010; NOVACCO et al., 2010; ROURA et al., 2010) e superior ao encontrado no presente estudo.

A prevalência de 1,78% (3/169) relatada nessa pesquisa mostrou-se inferior a referida por Valle (2011) que evidenciou 6,4% (21/331) de cães infectados em uma população de animais atendidos no Hospital Veterinário de Passo Fundo (Rio Grande do Sul), porém, está de acordo com os dados de Costa (2011) que encontrou prevalência de 3,3% (5/150) e 1,3% (2/150) respectivamente em cães, com e sem trombocitopenia, na cidade de Goiânia.

Kemming et al. (2004) avaliaram amostras de cães domiciliados e de canis e observaram que a infecção hemotrópica estava presente apenas nas amostras oriundas de animais de canis com prevalência variando de 30% na Europa a 87% na América do Norte. Esse estudo corrobora, mesmo que diferindo em termos de prevalência, com a presente pesquisa uma vez que hemoplasmas só foram detectados em 4,05% (3/74) das amostras de animais errantes, oriundos de canis e abrigos mantenedores, não sendo observadas amostras positivas no grupo de animais domiciliados.

O sequenciamento genético das amostras de cães positivos 1,78% (3/169) mostrou que os animais estavam infectados com a espécie '*Candidatus M. haematoparvum*'. Resultado semelhante 2% (4/200) foi encontrado por Novacco et al. (2010) na Espanha e Barker et al. (2010) 2,7% (5/184) em Trinidad. Porém, inferior quando comparada aos dados de Kenny et al. (2004) e Novacco et al. (2010) que referem prevalência de 9,6% (44/460) e 5% (30/600), respectivamente na França e Itália e superior aos de Roura et al. (2010) que referiram 0,6% (1/182) de positividade entre cães saudáveis e sintomáticos na Espanha.

No Brasil os estudos conduzidos por Costa (2011) e Vale (2011) em populações de caninos identificaram apenas a espécie *M. haemocanis* enquanto que Vieira (2012) encontrou prevalência de 24,24% (32/132) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ em cães no Paraná, muito superior ao registrado no presente trabalho, que vem a ser o primeiro relato da infecção por essa espécie em caninos domésticos no norte do país.

No presente estudo foi comparada a frequência global de infecção por micoplasmas hemotrópicos frente a outros hemoparasitos, não sendo observada diferença estatística ( $p= 0,4002$ ) para tal análise, nesse caso a presença de hemoparasitos pode ser um fator desencadeante para a infecção por hemoplasmas, corroborando com Tasker (2006b) que refere que microorganismos do gênero *Mycoplasma*, atuam como patógenos oportunistas, e sua manifestação ocorreria em situações de estresse ou imunossupressão.

## 7 CONCLUSÕES

- Hemoplasmas circulam na população felina e canina na cidade de Belém, PA;
- Felinos domiciliados e felinos machos formaram o grupo com maior risco para a infecção por micoplasmas hemotrópicos;
- A espécie '*Candidatus M. haematoparvum*' pode ser o único circulante na população canina em Belém, PA;
- As taxas de infecção por '*Candidatus M. haemominutum*' e *M. haemofelis* foram muito próximas o que sugere uma uniformidade na distribuição desses bioagentes, dado relevante em virtude do maior potencial patogênico da segunda espécie;
- A presença de outros hemoparasitos pode ser um fator de risco para a infecção por hemoplasmas.

## REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F, et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ARAGÃO DE SOUSA, S.K.S. **Ocorrência de *Mycoplasma* spp. e alterações hematológicas em gatos domésticos (*Felis catus*) naturalmente infectados na cidade de Belém, Pará**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal) – Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Pará, 2013.
- 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.
- BARKER, E.N, et al. Complete genome sequence of *Mycoplasma haemofelis*, a hemotropic mycoplasma. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 8, p. 2060-2061, 2011.
- BARKER, E.N, et al. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and ‘*Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum*’ in dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 167-170, 2010.
- BAUER, N, et al. Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 3, p. 252-258, 2008.
- BERENT, L.M. ***Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*): Molecular Diagnosis and Genomic Studies**. 2002. 124 f. Tese (Doutorado) – University of Illinois, Urbana-Champaign, USA, 2002.
- 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, n. 10, 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.
- BIONDO, W.A, et al. A review of the occurrence of hemoplasmas (Hemotropic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.1-7. 2009.
- BIRKENHEUER, A.J, et al. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 10, p. 1385-1388, 2002.
- BORTOLI, C.P, et al. Detection of hemoplasmas and Bartonella species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 219-223, 2012.

BRAGA, M.S.C.O, et al. Molecular detection of hemoplasmas infection among cats from São Luís island, Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 569-575, 2012.

BRAGA, M.S.C.O. **Diagnóstico molecular de hemoparasitas e frequência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii e anti-Neospora caninum, em gatos peridomiciliados na cidade de São Luís, Maranhão**. 2010. 90 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

BRAZ, P.H.; GODOY, K.C.S.; FREITAS, D.O.; BERGAMO, F.M.M. **Diagnóstico hematológico de Mycoplasmas haemocanis em um canino doméstico**. Disponível em: <http://www.petsa.com.br/uploads/TrabalhosAprovados/MedicinaInterna/500.pdf> Acesso em: 24 janeiro 2014.

BRINSON, J.J.; MESSICK, J.B. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 12, p. 1943-1945, 2001.

CAEIROS, A.P.S. **Deteção de Babesia spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal**. 130 f. 2012. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. 2012.

CAPRARIIS, D, et al. Evolution of clinical, hematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. **Veterinary microbiology**, v. 149, n. 1-2, p. 206-212, 2011.

CHALKER, V.J. Canine mycoplasmas. **Research in Veterinary Science**, v. 79, n. 1, p. 1-8, 2005.

CHOMEL. B.B.; BOULOUIS, H.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 8, p. 1270–1279. 2004.

COSTA, H.X. **Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás. 2011.

CRIADO-FORNÉLIO, A, et al. 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, 2003.

DEAN, R.S, et al. 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. 413-417, 2008.

DEMAREE, R.E.; MESSMITH, W.B. Ultrastructure of *Haemobartonella felis* from a naturally infected cat. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 6, p. 1303-1308. 1972.

DOS SANTOS, A.P, et al. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 14, n. 12, p. 1922-1924, 2008.

FIGHERA, R.A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria: Fighera, 2001. p. 63-122.

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

FLINT, J.C.; MCKELVIE, D.H. **Feline Infectious Anemia – Diagnosis and Treatment**. In: PROCEEDINGS OF THE AVMA 92<sup>nd</sup>, 1955. American Veterinary Medical Association, 1955, p. 240-242.

FLINT, J.C.; MOSS, L.C. Infectious Anemia in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 122, n. 910, p. 45-48, 1953.

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**, v. 59, n. 12, p. 1581-1588, 1998.

FOLEY, J.E.; PEDERSEN, N.C. ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, a low virulence epierythrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 815-817, 2001.

GARCÍA LEAL, M.L. **Avaliação da frequência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GRINDEM, C.B.; CORBETT, W.T.; TOMKINS, M.T. Risk factors for *Haemobartonella felis* infection cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 1, p. 96-99, 1990.

GUIMARÃES, A.M.S. **Detecção de Micoplasmas, Bartonelas e Vírus da Leucemia Felina em pequenos felídeos neotropicals mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu**. 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GUIMARAES, A.M.S, et al. Molecular detection of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in a lion (*Panthera leo*) from a Brazilian zoological garden. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 195-196, 2007.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 1, n. 41, p. 95-98, 1999.

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

HORNOK, S, et al. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 98-104, 2010.

INOKUMA, H, et al. Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in eastern Sudan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 461-463, 2006.

JAIN, N.C. Hemolytic anemias associated with some infectious agents. In: \_\_\_Impressão: **Essentials of veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 177-192.

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

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

KEMMING, G, et al. Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: old problem-new insight. **European Surgical Research**, v. 36, n. 4, p. 198-205, 2004.

KENNY, M.J, et al. Demonstration of two distinct Hemotropic Mycoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5397-5399, 2004.

KIRCHHOFF, H, et al. Flask-shaped mycoplasmas: properties and pathogenicity for man and animals. **Israel Journal Medical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 848-853, 1984.

KRAJE, A.C. Canine Haemobartonellosis and Babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, 23, n. 4, p. 310-318, 2001.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, n. 1, p. 24-31, 2001.

LAPPIN, M.R, et al. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 2, p. 85-90, 2006.

LAPPIN, R.M, et al. *Bartonella* spp and *Mycoplasma haemominutum* DNA in blood of cats and their fleas. In: 21st American College of Veterinary Internal Medicine Forum Procedures, 8, 2003, Charlotte, North Carolina. **Anais...** North Carolina: American College of Veterinary Internal Medicine, 2003, v. 4, p. 929–930.

LESTER, S.L.; HUME, J.B.; PHIPPS, B. *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. **Canine Veterinary Journal**, v. 36, n. 7, p. 444-445, 1995.

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.

MAGGI, R.G, et al. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 15, n.6, p. 103-113, 2013.

MAIA, L.M.P. **Avaliação da ocorrência de piroplasmas e hemoplasmas em gatos domésticos no estado do Rio de Janeiro**. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2008.

MARTINS, T.S.O. **Detecção de *Ehrlichia* spp./*Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Mycoplasma haemofelis* e *Leishmania infantum* em felinos errantes e sua relação com a presença de retrovírus e com a sintomatologia manifestada**. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

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

MESSICK, J.B. New perspectives about hemotropic mycoplasma (formely, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dog and cats. **Veterinary Clinic North American Small Animal Practice**, v. 33, n.6, p. 1453-1465, 2003.

MESSICK, J.B.; HARVEY, J.W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: \_\_\_ GREENE, C.E. **Infectious Diseases of Dog and Cat**. 4 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2012. p. 310-319.

MESSICK, J.B.; SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.S. Complete genome sequences of two hemotropic mycoplasmas, *Mycoplasma haemofelis* Strain Ohio2 and *Mycoplasma suis* Strain Illinois. **Journal of Bacteriology**, v. 19, n. 8, p. 2068-2069, 2011.

MESSICK, J.B, et al. ‘*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*’ sp. nov., ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ sp. nov and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*),



alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 693-698, 2002.

MORAES, P.H.G, et al. Optimization of a molecular method for the diagnosis of canine babesiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso)**. No prelo 2014.

MUNDIM, E.C.S, et al. Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiares*) de rua capturados pelo centro de controle de zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n. 3, p. 107-115, 2008.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agente of haemolytic anemia in sheep and goats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 54, v. 2, p. 365-371, 2004.

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.

NEIMARK, H, et al. Revision of hemotropic *Mycoplasma* species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 683, 2002.

NOVACCO, M, et al. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 276-284, 2010.

OBARA, H, et al. Feline hemoplasmas, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', detected in dog in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 6, p. 841-843, 2011.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: Part one. **Trends in Parasitology**, v, 25, n. 4, p. 157-163, 2009.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 469-492, 2005a.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n.4, p. 719-756, 2005b.

PRULLAGE, J.B.; WILLIAMS, R.E.; GAAFAR, S.M. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 125-135, 1993.

RAMOS, R, et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1115-1120, 2010.

RAZIN, S. Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 79, n. 1-3, p. 423-432, 1992.

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.

RITISC, M.; KREIER, J.P. Family III. Anaplasmatacea. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 1 ed., v. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1984. p. 719-729.

RIVETTI JUNIOR, A.V. **Retrovíroses, toxoplasma gondii e Mycoplasma haemofelis em gatos errantes e felinos selvagens do Zoológico de Belo Horizonte-MG**. 2006. 38 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.

RODRIGUES, D.P. **Ocorrência de hemoparasitos em felídeos e canídeos selvagens do zoológico da cidade do Rio de Janeiro, RJ**. 2010. 173 f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. 2010.

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.

RUFINO, C.P, et al. Detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* DNA Using Multiplex PCR. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 12, p. 846-850, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2<sup>a</sup> ed. Nova York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 545.

SANTOS, A.P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos na região de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2008. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **Statistical analysis system user's guide: statistics**. Version 8.2, Cary: SAS Institute, 2001. 1686p.

SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE; ARIYADASA, S.S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 112-114, 1973.

SHAW, S.E, et al. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v. 17, n.2, p. 74-80, 2001.

SHELTON, G.H.; LINENBERGER, M.L. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)**, v. 10, n. 4, p. 220-233, 1995.

STANNECK, D. **Modern approaches to prevent canine vector borne diseases**. Disponível em: [http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2006/stanneck1\\_en.pdf?LA=1](http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2006/stanneck1_en.pdf?LA=1)  
Acesso em: 12 janeiro 2014.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.

SYKES, J.E, et al. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in splenectomized dog with hemic neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 12, p. 1946-1951, 2004.

SYKES, J.E, et al. '*Candidatus Mycoplasmas haematoparvum*', a novel small haemotropic mycoplasmas from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 27-30, 2005.

SYKES, J. E. Feline Hemotropic Mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Veterinary Clinics North America (Small Animal Practice)**, v. 33, n. 4, p. 773-789, 2003.

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

TANENO, J.C.; SACCO, S.R. Micoplasmose felina – Relato de Caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 12, 2009.

TASKER, S. Anemia infecciosa Felina. In: Chandler, E. A.; GASKELL, C. J; GASKELL, R. M. **Clínica e terapêutica em felinos**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2006b. p.545-550.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In practice**, v. 28, n. 3, p. 136-141, 2006a.

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

TASKER, S, et al. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 157, n. 7, p. 193-198, 2003.

TASKER, S.; LAPPIN, M.R. Update on hemoplasmosis. In: AUGUST, J.R. (Ed.): **Consultations in Feline Internal Medicine**. 5 ed. Saint Louis: Elsevier Inc., 2006, cap. 63, p. 605-610.

TRAPP, S.M, et al. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil (Short Communication). **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2, p. 177-180, 2006.

VALLE, S.F. **Prevalência, fatores de risco e alterações clínicas e laboratoriais na infecção pelo hemoplasmas canino e felino em cães no Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo**. 2011. 91 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

VIEIRA, R.F.C. **Avaliação molecular de micoplasmas hemotrópicos e soroprevalência de *Ehrlichia* spp. em uma população de cães, equinos e humanos de assentamento rural na região norte do estado do Paraná**. 2012. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. 2012.

WANDER, A.W. **Hemoplasrose felina: relato de caso**. 2009. 37f. Monografia (Especialização em Clínica Médica de Pequenos Animais) – Instituto de Pós-Graduação, Universidade Castelo Branco, Porto Alegre, 2009.

WARDROP, K.J, et al. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 1, p. 135-142, 2005.

WENGI, N, et al. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasma. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1-3 p. 132-141, 2008.

WILLI, B, et al. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasmas species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 961-069, 2006b.

WILLI, B, et al. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159-1166, 2007.

WILLI, B, et al. First morphological characterization of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ using electron microscopy. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 367-373, 2011.

WILLI, B, et al. Phylogenetic analysis of ‘*Candidatus Mycoplasmas turicensis*’ isolates from pet cat in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4430-4435, 2006a.

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**, v. 66, n. 6, p. 1008-1012, 2005.

WOODS, J.E.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M.R. Attempted transmission of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 3, p.494-497, 2006.

ZHUANG, Q.J, et al. The occurrence of the feline ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 689-692, 2009.