

**ANA MARCIA DE SÁ GUIMARÃES**

**DETECÇÃO DE MICOPLASMAS, BARTONELAS E VÍRUS DA LEUCEMIA  
FELINA EM PEQUENOS FELÍDEOS NEOTROPICAIS MANTIDOS EM  
CATIVEIRO NO REFÚGIO BELA VISTA, FOZ DO IGUAÇU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Medicina Veterinária

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental e Aplicada às  
Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Jorge Timenetsky

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1980  
FMVZ

Guimarães, Ana Marcia de Sá

Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio BelaVista, Foz do Iguaçu / Ana Marcia de Sá Guimarães. -- São Paulo: A. M. S. Guimarães, 2008.

129 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

1. Felídeos neotropicais. 2. Micoplasma. 3. Bartonela. 4. FeLV. 5. Hemoplasma. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

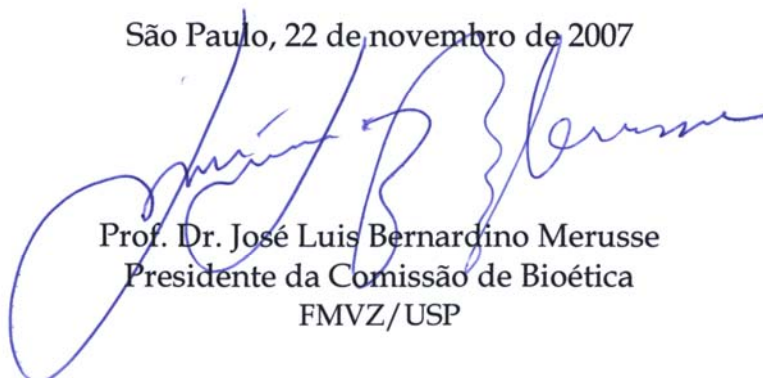
*Comissão Bioética*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de micoplasmas e vírus da imunodeficiência e leucemia felinas em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu", protocolado sob o nº1220/2007, utilizando 57 (cinquenta e sete) animais (jaguaririca, gato maracajá, gato do mato pequeno, jaguarundi e gato do mato grande), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Jorge Timenetsky, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/11/07.

We certify that the Research "Mycoplasma and feline immunodeficiency and leukemia viruses detection in captive small neotropical felids from Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu", protocol number 1220/2007, utilizing 57 (fifty seven) animals, under the responsibility Prof. Dr. Jorge Timenetsky, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GUIMARÃES, Ana Marcia de Sá

Título: Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof Dr \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof Dr \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

Prof Dr \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Julgamento \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

AOS MEUS EXEMPLOS DE VIDA, MEUS PAIS,  
NEY E MARCIA. AO MEU AMIGO E IRMÃO,  
FELICIANO. AO MEU AMOR E CARINHO,  
RICARDO. E AOS MEUS COMPANHEIROS  
LEAIS, BOB, TIBU, MOLLY,  
PETITA E PEQUENA.

AOS ANIMAIS.

## AGRADECIMENTOS

Aos animais do Refúgio Bela Vista que, literalmente, deram o sangue por esse trabalho.

Ao meu orientador Professor Jorge Timenetsky, por toda ajuda dispensada à realização deste trabalho, por abrir as portas da ciência e por me indicar o gratificante caminho da micoplasmologia.

À Capes, pelo mestrado e pelo futuro doutorado.

À minha família, por todo apoio na vinda para São Paulo e pelos incentivos na vida.

Aos meus pais, por me darem a vida e por me orientarem a vivê-la da melhor maneira possível. Amo muito vocês!

Ao meu irmão Feliciano. Sem ele São Paulo seria mil vezes mais difícil.

Ao meu marido Ricardo, imprescindível em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo seu amor e carinho.

Ao meu co-orientador Professor Alexander Biondo, por me apresentar à pesquisa, por todo auxílio na empreitada de Foz do Iguaçu e processos seletivos, pelas horas de conversa, pelas risadas e pela amizade. Afinal, agora ele faz parte da família.

À minha co-orientadora Professora Joanne Messick, por todo esforço nos “dolorosos” processos seletivos de mestrado e doutorado e por me ensinar a amar a ciência.

Ao Professor Paulo Brandão, pelo auxílio com coronavírus e bartonelas.

À minha “mãe paulistana” Celminha, por todas as horas de conversa, pelo auxílio indispensável no laboratório e pela imensa amizade. Vou sentir muita saudades dessa baixinha quando eu estiver longe.

Aos colegas do Refúgio Bela Vista, por todo auxílio e ensinamentos. Todos são exemplos profissionais para minha vida.

Aos meus amigos curitibanos e alagoanos de São Paulo, Chris, Simone, Franklin, Demetrius, Fábio e Alberto, por todos os momentos de bobeira e conversa.

Ao meu roommate Demetrius, pela amizade conquistada e apoio constante.

Aos meus amigos Lucas e Renata, pela amizade e pelos conselhos profissionais e da vida.

À Nany, Mau e Melissa pela amizade e imprescindível auxílio no laboratório.

À minha amiga Regina, pelas horas tentando seqüenciar e clonar e pela amizade conquistada.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de micoplasma, Lucas, Renata, Nany, Mau, Melissa, Júnior, Priscila, Elena, Marcos e Rafael pela ajuda e paciência.

Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II.

Às funcionárias da secretaria do ICB II.

À Dayse, Claudia , Joana e Tânia da Pós Graduação da FMVZ.

À Samara Kihll por toda ajuda estatística.

À Claudia Filoni, pesquisadora da medicina da conservação, colaboradora, exemplo.

Aos alunos, funcionários e professores do Laboratório de Virologia Comparada da UFMG.

Ao Professor Silvio Arruda Vasconcellos da FMVZ-USP.

Aos meus cães Bob, Tibu, Molly, Petita e Pequena, pelos olhares de carinho, pelas lambidas e pelo amor inabalável.



## **EPÍGRAFES**

"A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana"

**Charles Darwin**

"Não, nossa ciência não é uma ilusão. Ilusão seria imaginar que aquilo que a ciência não nos pode dar, podemos conseguir em outro lugar"

**Sigmund Freud**

“A natureza é exatamente simples, se conseguirmos encará-la de modo apropriado. Essa crença tem-me auxiliado, durante toda a minha vida, a não perder as esperanças quando surgem grandes dificuldades de investigação”

**Albert Einstein**

“Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino de nossa civilização. E consideramos nossa tarefa explicar incansavelmente essa verdade, ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo, e trabalhar, não para contemporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista”

**Albert Einstein**

“Uma pessoa inteligente resolve um problema, um sábio previne-o”

**Albert Einstein**

## RESUMO

GUIMARÃES, A. M. S. **Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu.** [Detection of mycoplasmas, bartonellas and feline leukemia virus in small neotropical felids maintained in captivity at Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu]. 2008. 129 f. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Amostras de sangue total e suabes de orofaringe e conjuntiva foram coletadas de 57 felídeos Neotropicais (1 *Leopardus geoffroyi*, 17 *L. wiedii*, 22 *L. tigrinus*, 14 *L. pardalis* e 3 *Puma yagouaroundi*) mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu. Dados clínicos, hemograma e histórico dos animais foram disponibilizados. Materiais clínicos obtidos a partir dos suabes de orofaringe e conjuntiva foram submetidos ao cultivo para *Mycoplasma* spp em meio específico. DNA do sangue e suabes foram extraídos por meio de um kit comercial e pelo método de fervura, respectivamente. DNA extraído de amostras de sangue foram submetidos à PCR para detecção de *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), “*Candidatus* M. haemominutum” (CMhm), DNA proviral do vírus da leucemia felina (FeLV) e *Bartonella* spp. DNA extraído dos suabes foram submetidos à PCR para detecção de *Mollicutes* e *M. felis*. Foi realizada uma análise de associação entre alterações clínicas e a infecção por *Bartonella* spp e um estudo de fator de risco da infecção por esse microrganismo. Apenas 1 (1,75%) animal foi positivo a reação para Mhf e nenhum foi positivo a reação para CMhm. Dois (3,5%) animais foram positivos a reação para FeLV e 6 (10,52%) foram positivos para *Bartonella* spp. Não houve co-infecção entre os agentes pesquisados nas amostras de sangue. Foram obtidos 5 (8,77%) isolados de *Mycoplasma* spp da orofaringe e nenhum de conjuntiva. DNA de *Mollicutes* foi detectado em 53 (93%) e 27 (47,36%) amostras de orofaringe e conjuntiva, respectivamente. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo na detecção de DNA alvo de *M. felis*. Não houve associação entre as alterações hematológicas (anemia, desidratação, leucocitose, leucopenia, histórico de anemia) e a infecção por *Bartonella* spp. Machos apresentam maior risco de adquirir bartonelose do que fêmeas. Este é o primeiro relato da presença de DNA proviral de FeLV em *L. tigrinus* e *L. pardalis* no sul do

país, de DNA de *B. henselae* em *L. tigrinus*, *L. pardalis*, *L. geoffroyii* e *P. yagouaroundi*, e de um estudo de fator de risco associado a infecção por *Bartonella* spp em felídeos neotropicais.

Palavras-chave: Felídeos neotropicais. Micoplasma. Bartonela. FeLV. Hemoplasma.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, A. M. S. **Detection of mycoplasmas, bartonellas and feline leukemia virus in small neotropical felids maintained in captivity at Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu** [Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu]. 2008. 129 f. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Total blood samples and oropharinx and conjunctival swabs were collected from 57 neotropical felids (1 *Leopardus geoffroyi*, 17 *L. wiedii*, 22 *L. tigrinus*, 14 *L. pardalis* and 3 *Puma yagouaroundi*) maintained in captivity at Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu. Clinical data, hemogram and clinical history of these animals were available. Clinical materials obtained from oropharinx and conjunctiva were cultured in specific media for *Mycoplasma* spp isolation. DNA of blood and swabs were extracted using a commercially available kit and a boiling method, respectively. DNA samples from swabs were submitted to a PCR for the detection of *Mollicutes* and *M. felis*. DNA samples from blood were submitted to a PCR for detection of *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), “*Candidatus M. haemominutum*” (CMhm), feline leukemia virus (FeLV) proviral DNA, and *Bartonella* spp. The association between hematological alterations and bartonella infection was evaluated and a risk factor analysis was performed. Only 1 (1.75%) animal was positive for Mhf reaction, whereas all animals were negative for CMhm detection. Two (3.5%) animals were positives for FeLV and 6 (10.52%) animals were positive for *Bartonella* spp, by PCR. Co-infections among these agents were not observed. Five (8.77%) mycoplasma isolates were obtained from oropharinx samples and none was obtained from conjunctival samples. *Mollicutes* DNA was detected in 53 (93%) and 27 (47.36%) samples from oropharinx and conjunctiva, respectively. All samples were negative for *M. felis* detection. Hematological alterations (anemia, dehydration, leukocytosis, leucopenia, history of anemia) were not associated to *Bartonella* spp infection. Males are more likely to be infected than females. This is the first report of FeLV proviral DNA in *L. tigrinus* and *L. pardalis* in Southern

Brazil, of *B. henselae* DNA in *L. trigrinus*, *L. pardalis*, *L. geoffroyi* and *P. yagouaroundi*, and the first study of risk factors for *Bartonella* spp infection in neotropical felids.

Key words: Neotropical felids. Mycoplasma. Bartonella. FeLV. Haemoplasma.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Espécime de *L. tigrinus* com arrancamento de pêlos em flanco e dorso durante coleta de amostras - Foz do Iguaçu – 2006 ..... 68
- Figura 2 - Colônias de mycoplasma spp em ágar SP4 obtidas dos felídeos selvagens (10X). Isolados de suabe de orofaringe de: (A) *Leopardus geoffroyi* - espécime 01. (B) *Puma yagouarundi* – espécime 02. (C) *L. weidii* – espécime 05. (D) *L. pardalis* – espécime 16. (E) *P. yagouarundi* – espécime 36 - São Paulo – 2008 ..... 69
- Figura 3 - Gel de agarose com brometo de etídeo apresentando ampliações parciais do gene 16S ribossomal RNA para (A) *M. haemofelis* - 393 pb e (B) “*Candidatus M. haemominutum*” - 192 pb, indicando o limite de detecção de cada técnica. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle negativo – água. Cópias de plasmídeos: 3) 500 mil 4) 50 mil 5) 5 mil 6) 500 7) 50 cópias 8) 5 cópias 9) 0,5 - São Paulo - 2008 ..... 70
- Figura 4 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando ampliações de 299 pb do gene 16S ribossomal RNA do *Mycoplasma felis* em diferentes temperaturas de anelamento. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle negativo – água. Temperatura de anelamento: 3) 55°C 4) 55,9°C 5) 56,8°C 6) 57,9°C 7) 59,2°C 8) 60,5°C 9) 61,9°C - São Paulo - 2008 ..... 72
- Figura 5 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando ampliações de 299 pb do gene 16S ribossomal RNA do *Mycoplasma felis*. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle positivo 3) controle negativo - água 4 a 12) amostras de orofaringe de pequenos felídeos neotropicais - São Paulo – 2008 ..... 72
- Figura 6 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando ampliações de 393 pb do gene 16S ribossomal RNA do *Mycoplasma haemofelis*. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle positivo 3) controle negativo - água 4) amostra de *Leopardus geoffroyi* 5) amostra de *P. yagouarundi* 6) amostra de *L. wiedii* 7) amostra de *L. weidii* (animal 03) - São Paulo – 2008 ..... 73
- Figura 7 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando ampliações do espaço intergênico dos genes 16SrRNA e 23SrRNA de *Bartonella* spp. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle negativo - água 3) controle positivo (*Bartonella henselae*) 4) amostra 01 (*Leopardus geoffroyi*) 5) amostra 02 (*Puma yagouarundi*) 6) amostra 03 (*L. wiedii*) 7) amostra 04 (*L. weidii*) 8) amostra 05 (*L. weidii*) - São Paulo - 2008 ..... 75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de animais estudados separados por espécie, sexo e origem - São Paulo -2008 .....	48
Tabela 2 -	Relação do número de animais com arrancamento de pêlos, histórico de anemia e histórico de infestação por pulgas de acordo com a espécie de felídeos do Refúgio Bela Vista - Foz do Iguaçu -2006 .....	68
Tabela 3 -	Resultado da associação entre positividade para <i>Bartonella</i> spp e sinais clínicos dos felídeos selvagens do Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu, utilizando o teste de Fisher - São Paulo - 2008 .....	76
Tabela 4 -	Resultados da regressão logística multivariada exata para análise de fatores de risco para infecção por <i>Bartonella</i> spp - São Paulo - 2008 .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMhm	“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ”
CMt	“ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ”
dL	decilitro
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTP	desoxiribonucleotídeos fosfatados
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> - ácido etilendiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FeLV	<i>feline leukemia virus</i> – Vírus da leucemia felina
FIV	<i>feline immunodeficiency virus</i> – Vírus da imunodeficiência felina
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
gp70	glicoproteína de peso molecular 70
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> – vírus da imunodeficiência humana
IC	intervalo de confiança
IFA	<i>indirect immunofluorescent antibody</i> – imunofluorescência indireta
LB	Luria Bertani
M	molar
Mhf	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
NC	nascido em cativeiro
nm	nanometro
ng	nanogramas
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> – solução tampão de fosfato
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
ρg	picograma



p27	proteína de peso molecular 27
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SPF	specific- pathogen-free
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TSB	<i>tryptic soy broth</i> - caldo tripticase e soja
U	unidade
µg	micrograma
µL	microlitros
V	volts
VL	vida livre

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
=	igual
°C	graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
3.1	BIODIVERSIDADE E DOENÇAS INFECCIOSAS .....	24
3.2	AGENTES INFECCIOSOS .....	26
<b>3.2.1</b>	<b>Micoplasmas</b> .....	27
<b>3.2.2</b>	<b><i>Mycoplasma felis</i></b> .....	29
<b>3.2.3</b>	<b>Hemoplasmas</b> .....	32
<b>3.2.4</b>	<b>Retrovírus em felídeos</b> .....	37
<b>3.2.5</b>	<b>Vírus da Leucemia Felina</b> .....	38
<b>3.2.6</b>	<b><i>Bartonella spp</i></b> .....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
4.1	AMOSTRAS DE REFERÊNCIA .....	46
4.2	ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	47
4.3	CULTIVO DE MICOPLASMAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS .....	48
4.4	CULTIVO DE CEPAS BACTERIANAS DE REFERÊNCIA .....	49
<b>4.4.1</b>	<b>Cultivo de <i>Bartonella henselae</i></b> .....	49
<b>4.4.2</b>	<b>Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Proteus mirabilis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	50
4.5	EXTRAÇÕES DE DNA .....	50
<b>4.5.1</b>	<b>Extração pelo método de fervura</b> .....	50
<b>4.5.2</b>	<b>Extração de DNA de sangue total</b> .....	51
<b>4.5.3</b>	<b>Extração pelo método de Boom</b> .....	51
<b>4.5.4</b>	<b>Espectrofotometria</b> .....	52
4.6	REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE .....	52
<b>4.6.1</b>	<b>PCR para detecção de <i>Mollicutes</i></b> .....	52
<b>4.6.2</b>	<b>Desenvolvimento e padronização da PCR para detecção de DNA de <i>Mycoplasma felis</i></b> .....	53

4.6.3	PCR para detecção de gene interno .....	54
4.6.4	PCR para detecção de hemoplasmas .....	55
4.6.5	PCR para detecção de DNA proviral de FeLV .....	56
4.6.6	PCR para detecção de <i>Bartonella</i> spp .....	57
4.6.7	Detecção dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose .....	58
4.6.8	Limite de detecção das Reações em Cadeia da Polimerase .....	58
4.6.9	Especificidade das Reações em Cadeia da Polimerase .....	59
4.6.10	Transformações dos plasmídeos de CMhm e Mhf .....	60
4.7	SEQUENCIAMENTOS .....	60
4.7.1	Sequenciamento dos produtos da PCR de FeLV e <i>Bartonella</i> spp .....	61
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	62
5	<b>RESULTADOS</b> .....	64
5.1	HEMOGRAMAS, AVALIAÇÃO GERAL E HISTÓRICO .....	64
5.1.1	<b>Hemogramas</b> .....	64
5.1.1.1	Anemia .....	64
5.1.1.2	Hemograma sugestivo de estresse de captura durante a coleta .....	65
5.1.1.3	Desidratação .....	65
5.1.1.4	Leucopenia .....	65
5.1.1.5	Leucocitose .....	66
5.1.2	<b>Avaliação geral e histórico</b> .....	67
5.1.2.1	Peso e arrancamento de pêlos .....	67
5.1.2.2	Histórico de anemia e presença de pulgas .....	67
5.2	CULTIVO DE MICOPLASMAS .....	68
5.3	LIMITE DE DETECÇÃO DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE .....	69
5.4	ESPECIFICIDADE DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE .....	70
5.5	REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE .....	71
5.5.1	<b>PCR para detecção de <i>Mollicutes</i></b> .....	71
5.5.2	<b>Desenvolvimento e padronização da PCR para <i>M. felis</i></b> .....	71
5.5.3	<b>PCR para gene interno</b> .....	73
5.5.4	<b>PCR para detecção de Hemoplasmas</b> .....	73
5.5.5	<b>PCR para detecção de FeLV</b> .....	74

<b>5.5.6</b>	<b>PCR para detecção de <i>Bartonella</i> spp</b> .....	74
5.6	SEQUENCIAMENTO DE FELV E <i>Bartonella</i> spp .....	75
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA INFECÇÃO POR <i>Bartonella</i> spp .....	75
<b>5.7.1</b>	<b>Alterações hematológicas e <i>Bartonella</i> spp</b> .....	76
<b>5.7.2</b>	<b>Análise univariada dos fatores de risco</b> .....	77
<b>5.7.3</b>	<b>Análise multivariada dos fatores de risco</b> .....	77
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	79
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	93
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
	<b>APÊNDICES</b> .....	120
	<b>ANEXOS</b> .....	127

## 1 INTRODUÇÃO

Os felídeos selvagens são encontrados em todos os continentes, à exceção da Austrália e Antártida, e praticamente todas as espécies estão ameaçadas de extinção (SILVA; ADANIA, 2006). O continente Americano possui doze espécies de felídeos, sendo que dez ocorrem na América Tropical (sul do México a extremo sul da Argentina e Chile), incluindo: a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), gato maracajá (*L. weidii*), gato do mato pequeno (*L. tigrinus*), gato do mato grande (*L. geoffroyi*), gato palheiro (*L. colocolo*), gato preto dos Andes (*L. jacobitus*), gato “kodkod” (*L. guigna*), jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), puma (*P. concolor*) e a onça (*Panthera onca*). De acordo com a CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção), com exceção do *P. yagouaroundi* da América do Sul e do *L. colocolo*, todas as espécies estão listadas no anexo I, como ameaçadas de extinção; e as populações de *P. yagouaroundi* e *L. colocolo* estão classificadas no anexo II. Todas as espécies da América Tropical ocorrem no Brasil, exceto pelo gato “kodkod” e o gato preto dos Andes.

As principais causas do declínio populacional de felídeos de vida livre são a perda do habitat natural, a caça e o abate ilegal. Conseqüentemente, populações selvagens declinantes ficam mais suscetíveis a microrganismos emergentes e re-emergentes, favorecendo a ocorrência de epidemias e pandemias (MAILLARD; GONZALEZ, 2006). Em populações que se tornam pequenas e localizadas, processos infecciosos que em outras circunstâncias seriam considerados normais podem ter graves conseqüências (SILVA; ADANIA, 2006). Portanto, o estudo das doenças infecciosas é primordial na conservação de populações de carnívoros que se encontram ameaçados e susceptíveis a um grande número de agentes infecciosos letais e/ou debilitantes (MURRAY et al., 1999).

Apesar dos felídeos de vida livre estarem expostos a microrganismos provenientes de seus contactantes (animais domésticos ou não), acredita-se que populações de cativeiro sejam mais atingidas por patógenos; seja devido à alta densidade populacional geradora de estresse ou pelo contato com animais domésticos errantes que tem acesso a instituições de cativeiro (CLUBB; MANSON, 2003). Nessa conjuntura, é consenso que felídeos selvagens em cativeiro geralmente adoecem por causas consideradas “indeterminadas” (FILONI, 2006), e Filoni<sup>1</sup> (2007) sugeriu a

<sup>1</sup> Informação fornecida por Filoni em palestra “Diagnóstico de agentes infecciosos da fauna brasileira” em São Paulo, 2007.

criação de uma rede de laboratórios que identifique agentes infecciosos da fauna nacional (informação verbal). Apesar de diversos microrganismos infectarem felídeos selvagens, somente alguns foram descritos como causa de doença clínica nos mesmos. Nesse contexto, os micoplasmas e alguns vírus requerem diagnóstico especializado. Não obstante, as zoonoses constituem um importante representante das enfermidades a serem pesquisadas e, dentre aquelas que afetam os felídeos, a Bartonelose é de ocorrência mundial.

## 2 OBJETIVOS

- Analisar os hemogramas, sinais clínicos e históricos clínicos fornecidos pelo Refúgio Bela Vista de 57 pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro e escolhidos para este estudo.
- Cultivar *Mycoplasma* spp em meio específico a partir de material clínico obtido de suabes de orofaringe e conjuntiva dos felídeos selvagens.
- Detectar, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), DNA de *Mollicutes* nas amostras de DNA extraídas de suabes de orofaringe e conjuntiva.
- Padronizar a PCR para detecção de DNA de *Mycoplasma felis* nas amostras de DNA extraídas dos suabes de orofaringe e conjuntiva.
- Detectar, por meio da PCR, DNA de *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”, vírus da leucemia felina (FeLV) e de *Bartonella* spp nas amostras de DNA extraídas de sangue total dos felídeos selvagens.
- Identificar a espécie de *Bartonella* amplificada na PCR por meio de sequenciamento.
- Analisar a associação entre alterações hematológicas (anemia, desidratação, leucopenia, leucocitose e histórico de anemia) e a infecção por *Bartonella* spp nos felídeos selvagens.
- Analisar fatores de risco (sexo, origem, espécie, histórico de pulgas) para infecção por *Bartonella* spp nos felídeos selvagens.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 BIODIVERSIDADE E DOENÇAS INFECCIOSAS

Embora a biodiversidade possua uma taxa natural de mudanças ao longo do tempo, a intervenção humana negativa sobre o meio ambiente pode acelerar essas mudanças e contribuir para destruição das espécies, instabilidade dos ecossistemas e para alterações na genética e na evolução natural dos organismos. Fatores econômicos e demográficos, e a crescente demanda por espaço e recursos naturais necessários para manutenção do crescimento da população humana constituem as principais causas da perda da biodiversidade. Atualmente, presencia-se a perda, fragmentação e destruição do habitat natural por meio da super-exploração dos recursos naturais, poluição, introdução de espécies exóticas e aquecimento global (MAILLARD; GONZALEZ, 2006).

De acordo com Maillard e Gonzalez (2006), a perda de habitat leva à diminuição populacional de diferentes espécies, que por sua vez, acarreta em perda na diversidade genética e na capacidade de defesa populacional contra patógenos. Desta forma, facilita-se a ocorrência de doenças emergentes ou re-emergentes com potencial de declínio populacional, que também resultam na perda da diversidade e assim por diante, até a extinção da espécie (MURRAY et al., 1999; MAILLARD; GONZALEZ, 2006). Portanto, a biodiversidade funciona como uma importante barreira contra microrganismos causadores de doença. Quanto maior a diversidade genética de um organismo, maior a probabilidade de neutralização/equilíbrio entre hospedeiro e patógeno. Desta forma, “preservar a biodiversidade significa assegurar seu potencial evolutivo. E o mais importante, a evolução nunca volta atrás no tempo: a irreversibilidade é a causa irrevogável dos mecanismos de extinção das espécies” (traduzido de MAILLARD; GONZALEZ, 2006, p. 8).

Neste contexto, as doenças emergentes dos animais de vida livre podem ser classificadas em três grupos: aquelas transmitidas dos animais domésticos para populações selvagens; aquelas relacionadas à intervenção humana, por translocações de hospedeiro ou patógeno; e aquelas sem envolvimento humano ou de animais domésticos (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000).

Nas duas primeiras categorias, os animais de vida livre poderiam ser resistentes à infecção por determinado microrganismo ou ainda estarem em equilíbrio com o mesmo; mas devido à perda da diversidade genética e conseqüente diminuição da defesa do hospedeiro, a doença clínica evidencia-se. Por outro lado, algumas enfermidades provenientes de animais domésticos poderiam ser completamente desconhecidas à população selvagem, que seria susceptível a introdução do possível patógeno. Nessas circunstâncias, muitos outros fatores ecológicos e epidemiológicos podem influenciar na distribuição das infecções em populações susceptíveis, e esses fatores devem ser identificados para se estabelecer medidas preventivas contra epidemias (MURRAY et al., 1999). Dentre essas ações preventivas cita-se a vigilância epidemiológica de doenças que possam afetar a população de vida livre e de cativeiro por meio de testes diagnósticos.

Alguns programas de criação de animais em cativeiro procuram manter populações geneticamente viáveis e saudáveis para re-introdução em habitat natural. A transferência de patógenos para populações de vida livre susceptíveis é um desafio importante para programas de conservação de espécies (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000). Entretanto, os problemas relacionados às doenças infecciosas em um programa de re-introdução não acontecem apenas no sentido animal de cativeiro - animal de vida livre. Em algumas situações, é possível que o animal de cativeiro não exposto a agentes infecciosos nunca sobreviva em seu habitat natural. As populações locais, em condições normais, estão perfeitamente adaptadas ao ambiente em que vivem por meio da seleção natural (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000) e podem ser reservatórios de agentes potencialmente patogênicos aos animais recém-introduzidos. Desta forma, no que se refere às doenças infecciosas, um programa eficaz de re-introdução deve avaliar não somente sua população de cativeiro, mas, principalmente os animais de vida livre. Não obstante, agentes infecciosos compõem apenas a “ponta do *iceberg*”, e de acordo com Moraes<sup>1</sup> (2007) estudos sobre a genética populacional devem ser prioritariamente realizados (informação verbal).

Mesmo que não expostos às mesmas condições dos animais de vida livre, animais mantidos em cativeiro servem de modelos para estudos de doenças infecciosas em determinadas espécies (SILVA; ADANIA, 2006). Tratando-se de felídeos selvagens, a maioria dos animais que morrem por doenças em habitat natural são raramente encontrados para exames laboratoriais, resultando no desconhecimento do real impacto das doenças na dinâmica populacional de

<sup>1</sup> Informação fornecida por Moraes em campanha de coleta de amostras de capivaras, Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu, 2007.

carnívoros (MURRAY et al., 1999). Desta forma, estudos sobre agentes infecciosos atingindo felídeos em cativeiro são importantes em vistas a re-introdução no habitat natural.

Em 2003, observou-se que cerca de 60% das publicações envolvendo espécies de carnívoros neotropicais estão relacionados a estudos de dieta. O restante inclui estudos de distribuição e radiotelemetria, comportamento, agentes infecciosos, dentre outros (IBAMA, 2004). Devido à falta de recursos e falha na integração de ações de conservação no Brasil, está em evidência a escassez de estudos das doenças infecciosas nessas populações. Segundo o Plano de Ação de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros do Brasil, redigido pelo IBAMA (2004), as medidas prioritárias incluem: melhoria da capacidade de diagnóstico, ampliação dos estudos epidemiológicos, aprimoramento de técnicas de controle e intervenção, ampliação das instituições que pesquisem doenças em vida selvagem e a incorporação da medicina da conservação em ações de planejamento e manejo de populações selvagens. Dentro de um contexto de escassez de informações, o estudo de populações de cativeiro nacionais, que estão fortemente ligados a resgate de animais de vida livre submetidos ao tráfico e captura (RENCTAS, 2001), denota o primeiro passo na compreensão das doenças infecciosas dos carnívoros selvagens; auxiliando profissionais a organizar programas de re-introdução de espécimes e manejo populacional no Brasil.

### 3.2 AGENTES INFECCIOSOS

Os agentes infecciosos do presente estudo serão apresentados em seguida de forma a revisar pontos relacionados à sua etiologia, epidemiologia, sinais clínicos, lesões, diagnóstico, tratamento e prevenção. Esses microrganismos foram selecionados pela sua importância clínica e disponibilidade de investimentos laboratoriais; sendo eles: *Mycoplasma* spp, *M. felis*, hemoplasmas, *Bartonella* spp e o Vírus da Leucemia Felina (“Feline Leukemia Vírus” – FeLV).

### 3.2.1. Micoplasmas

*Mycoplasma* sp foi primeiramente isolado por Norcard e Roux em 1898 a partir de amostras provenientes de um caso de Pleuropneumonia Bovina (RAZIN, 1992). Em seguida, patógenos semelhantes isolados de humanos e animais passaram a ser denominados PPLO (“Pleuropneumonia-like organisms”) (RAZIN, 1978, 1992). Em 1929, o gênero *Mycoplasma* foi introduzido para designar estes microrganismos, atualmente classificados como membros da família *Mycoplasmataceae*, ordem *Mycoplasmatales*, da classe dos *Mollicutes*. De acordo com o Comitê Internacional de Sistemática dos Procariotos, esses microrganismos são representados por mais de 200 espécies em oito gêneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma*. Além desses gêneros, cerca de 20 microrganismos não cultiváveis estão em fase de classificação. Dentre eles destacam-se aqueles inicialmente classificados como *Eperythrozoon* e *Haemobartonella* (alguns já incluídos no gênero *Mycoplasma* e outros com nomes propostos - *Candidatus*), o “*Candidatus* M. ravigulomonis” (patógeno respiratório de roedores) e os phytoplasmas (“*Candidatus* Phytoplasma spp”, patógeno de plantas) (TULLY; BRADBURY, 2003).

Os *Mollicutes* se distinguem de outros procariotos pela ausência de parede celular e, portanto, são resistentes a ação de antibióticos que atuam sobre a mesma. Parasitam humanos, animais, insetos, plantas e cultivos celulares. Nos mamíferos colonizam “preferencialmente” as superfícies de mucosas, mas podem infectar diversos órgãos, tecidos e células, incluindo os eritrócitos. Indicam certa especificidade por órgãos e tecidos em indivíduos imunocompetentes (RAZIN, 1992; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998), mas devido à transmissão inter-específica de certas espécies de micoplasmas e parasitismo de tecidos não usuais, existem dúvidas quanto a sua especificidade por espécies de hospedeiros e sítios de infecção (PITCHER; NICHOLAS, 2005). São, em sua maioria, não invasivos, nutricionalmente exigentes e com crescimento *in vitro* lento; o que prejudica o aprimoramento de diagnósticos laboratoriais (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

A capacidade dos micoplasmas de imunomodular a resposta imune do hospedeiro contribui para suas propriedades patogênicas (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Esses microrganismos se caracterizam pela persistência no hospedeiro mesmo com a resposta imune inflamatória, desenvolvendo infecções crônicas. São conhecidos por induzir; em maior ou menor

grau dependendo da espécie; supressão ou estimulação policlonal dos linfócitos T e B; formação e liberação de citocinas; aumento na citotoxicidade de macrófagos, células “natural killers” e linfócitos T; elevada expressão de receptores celulares; e ativação excessiva da cascata do complemento (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). A imunidade específica ativada pela infecção do micoplasma protege parcialmente o hospedeiro, mas pode ser responsável por lesões imunopatológicas.

Por possuírem tamanho genômico reduzido em relação aos outros procariotos (580kb-2200kb), os *Mollicutes* são conhecidos como os menores microrganismos capazes de auto-replicação (DYBVIG, 1990). Além disso, alguns utilizam o códon UGA para codificar triptofano, enquanto outras eubactérias o utilizam como códon terminador (YAMAO et al., 1985; INAMINE et al., 1990). Adicionalmente, possuem um número reduzido de genes responsáveis por biosíntese, justificando em parte a sua característica fastidiosa e crescimento lento *in vitro* (FRASER et al., 1995; HINNELREICH et al., 1996). Outra interessante característica é o alto conteúdo de A+T em seu código genético, podendo chegar a 75% do genoma total (MUTO; YAMAO; OSAWA, 1987).

Há cerca de 20 anos, baseado na análise filogenética do gene 16S ribossomal RNA (16S rRNA), o gênero *Mycoplasma* foi classificado em cinco grupos: o grupo *hominis*, o *spiroplasma*, o *anaeroplasmata*, o *pneumoniae* e o *asteroleplasma* (WEISBURG et al., 1989). Atualmente, devido a certas características do 16S rRNA, novas classificações são frequentemente propostas e baseadas em marcadores genéticos alternativos à seqüência do 16SrRNA; como o espaço intergênico 16S rRNA - 23S rRNA, o gene *rpoB*, o gene *gyrB* e o gene *arcA* (KAMLA; HENRICH; HADDING, 1996; WEISBURG et al., 1989; KIM et al., 2003; VOLOKHOV et al., 2007). Essas análises têm permitido corrigir classificações e distinguir melhor as espécies e subespécies. Tem sido possível até mesmo analisar a origem filogenética dos *Mollicutes* e averiguar possíveis explicações para o seu pequeno tamanho genômico.

Nesse contexto, o determinante da inclusão de microrganismos não cultiváveis na classe dos *Mollicutes* é sua posição filogenética de acordo com as análises seqüenciais gênicas. De forma a sustentar a classificação taxonômica, *Mollicutes* não cultiváveis foram também analisados quanto à ausência de parede celular, ausência de flagelos e pequeno tamanho por microscopia eletrônica, bem como quanto à resistência a  $\beta$ -lactâmicos e susceptibilidade a tetraciclina *in vivo* (MESSICK, 2004). Como exemplo, podemos citar os hemoplasmas mais

comumente estudados, os parasitas de eritrócitos de felídeos: *M. haemofelis*, “*Candidatus M. haemominutum*” e “*Candidatus M. turicensis*”.

Em felídeos, os micoplasmas têm sido associados a doenças desde 1954, quando Switzer (1954) isolou uma cepa de *Mycoplasma* sp a partir do pulmão de um felídeo doméstico de seis semanas de idade com pneumonia. Atualmente, pelo menos catorze microrganismos da classe dos *Mollicutes* foram caracterizados nesses animais: *M. felifaucium*, *M. feliminutum*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. leocaptivus*, *M. arginini*, *M. leopharyngis*, *M. simbae*, *M. haemofelis*, “*Candidatus M. haemominutum*”, “*Candidatus M. turicensis*”, *A. laidlawii*, *Ureaplasma felinum* e *U. catti*. (HARASAWA; YAMAMOTO; OGATA, 1977; BROWN; MACLAUGHLIN; BROWN, 1995, RIKIHISA et al., 1997; WILLI et al., 2005). Dentre esses, os hemoplasmas e *M. felis* são aqueles mais descritos como causa de doença em felídeos.

### 3.2.2 *Mycoplasma felis*

*Mycoplasma* sp cepa CO foi primeiramente isolado por Switzer<sup>2</sup> (1967 apud COLE; GOLIGHTLY; WARD, 1967, p. 1451) do pulmão de um felídeo doméstico com pneumonia em 1954, sendo posteriormente isolado da cavidade oral de gatos e estudado por Cole, Golightly e Ward (1967) que sugeriram a denominação *Mycoplasma felis*.

*M. felis* tem sido isolado da cavidade oral, nasal e mucosa genital de gatos doentes e sadios (COLE; GOLIGHTLY; WARD, 1967; HEYWARD; SABRY, DOWDLE, 1969; TAN; MILES, 1972; CAMPBELL et al., 1973; TAN; MILES, 1974). Diversos estudos relatam isolamento ou detecção molecular desse agente em amostras conjuntivais de gatos com alterações oculares (COLE; GOLIGHTLY; WARD, 1967; HEYWARD; SABRY; DOWDLE, 1969; TAN; MARKHAM, 1971; TAN; MILES, 1974; HAESEBROUCK et al., 1991; CHALKER et al., 2004b; GRAY; KETRING; TANG, 2005). Entretanto, os resultados a respeito da presença desse agente na conjuntiva de animais sadios variam consideravelmente. Apesar da maioria dos autores não o isolarem da conjuntiva ocular (HEYWARD; SABRY; DOWDLE, 1969; SHEWEN; POVEY; WILSON, 1980; HAESEBROUCK et al., 1991), Tan, Lim e Ishak (1977) e Blackmore, Hill e Jackson (1971) o isolaram de 3,5% e 5% de animais clinicamente normais,

<sup>2</sup> SWITZER, W. P. The genus mycoplasma. In: MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A. (Ed.) **Veterinary bacteriology and virology**. 7. ed. Ames: Iowa State University Press, 1967, p. 531-548.

respectivamente. Posteriormente, a infecção experimental de filhotes de gato doméstico levou à doença clínica, representada por hiperemia bilateral severa a moderada (TAN, 1974; HAESEBROUCK et al., 1991).

Quando se avalia a presença de *Mycoplasma* spp (sem considerar a espécie de micoplasma) na conjuntiva de animais sadios, os resultados também são variáveis. A frequência de isolados e de detecção molecular varia de zero a 27.4%, sendo que no caso de animais positivos, o principal *Mollicutes* isolado é o *M. gateae* (HEYWARD; SABRY; DOWDLE, 1969; FILHO, 1977; TAN; LIM; ISHAK, 1977; SHEWEN; POVEY; WILSON, 1980; LOW et al., 2007). Por outro lado, a frequência de detecção desses agentes na conjuntiva de animais com conjuntivite mostra-se mais elevada (HEWEN; POVEY; WILSON, 1980; HAESEBROUCK et al., 1991; LOW et al., 2007).

Os micoplasmas colonizam o trato respiratório superior (mucosa oral, mucosa nasal, faringe e laringe), mas não o inferior (traquéia e pulmões) de gatos domésticos sadios (HEYWARD; SABRY; DOWDLE, 1969; JONES; SABINE, 1970; TAN; MILES, 1972; TAN; MILES, 1974; HILL, 1975; TAN; LIM; ISHAK, 1977; FILHO, 1977; RANDOLPH et al., 1993; CHANDLER; LAPPIN, 2002). Isolamentos de *Mycoplasma* spp do trato respiratório inferior estão associados à doença clínica; e esses microrganismos podem ser considerados como causa mais comum de alterações respiratórias em certas populações de felídeos domésticos (TAN; MILES, 1974; CRISP et al., 1987; FOSTER et al., 1998; BARRS et al., 2000; CHANDLER; LAPPIN, 2002; FOSTER et al., 2004).

A falta de identificação das espécies de micoplasmas isolados do trato respiratório e ocular de gatos tem dificultado o entendimento da epidemiologia do *M. felis*. Naqueles estudos com identificação, esse microrganismo é isolado de no máximo 15% das amostras do trato respiratório superior de animais sadios (COLE; GOLIGHTLY; WARD, 1967; HEYWARD; SABRY; DOWDLE, 1969; TAN; LIM; ISHAK, 1977). Por outro lado, esse agente é mais frequentemente isolado de animais com doença respiratória e/ou ocular do que de animais clinicamente normais (TAN; MILES, 1974). Relatos clínicos de doenças do trato respiratório inferior por *M. felis* foram publicados, inclusive em um felídeo Serval (*Felis silvestris*) (TAN; MILES, 1974; JOHNSRUDE et al., 1996; COPES et al., 1997). No Brasil, não existem relatos sobre a frequência de *M. felis* em felídeos selvagens neotropicais ou em gatos domésticos. Dessa forma, o número de publicações relacionadas a esse agente como patógeno é baixo e mais

estudos devem ser realizados para se determinar o real papel do *M. felis* nas enfermidades respiratórias.

Devido às limitações a respeito deste tema na literatura sobre micoplasmologia, a patogenicidade e virulência do *M. felis* são praticamente desconhecidas. Apesar de inoculações experimentais terem levado a doença ocular e pulmonar em filhotes (TAN, 1974; HAESEBROUCK et al., 1991), não é possível afirmar que esse microrganismo é um agente primário de infecção. Desconhece-se também a forma de transmissão do *M. felis*.

A conjuntivite induzida pelo *M. felis* caracteriza-se por um síndrome conjuntival constituída por blefaroespasmos, epífora, formação de pseudo-membranas conjuntivais com exsudato branco, severa hiperemia conjuntival e hipertrofia papilar, unilateral ou bilateral. O tratamento deve ser realizado a base de antibioticoterapia eficiente contra micoplasmas. Animais não tratados podem perder a funcionalidade ocular (GASKIN, 1980; WHITLEY, 2000).

No caso de infecções respiratórias, *Mycoplasma* spp foi associado a rinites, bronquites, pneumonias e abscessos (CRISP et al., 1987; JOHNSRUDE et al., 1996; FOSTER et al., 1998; CHANDLER; LAPPIN, 2002). Animais que não recebem terapia de suporte e antibióticos podem vir a óbito. Casos de poliartrites por *M. felis* em gatos imunossuprimidos e imunocompetentes também já foram descritos (HOOPER; IRELAND; CARTER, 1985; LIEHMAN et al., 2006).

A especificidade de hospedeiros dos micoplasmas é amplamente discutida. De forma geral, esses microrganismos são definidos de acordo com o primoincubamento ou onde são encontrados com maior frequência (PITCHER; NICHOLAS, 2005). *M. felis* foi primeiramente descrito em um gato doméstico (*Felis catus*) e é com mais frequência isolado nessa espécie; mas já foi isolado em casos de doença respiratória em cavalos e cães, artrites em paciente humano imunossuprimido, e pneumonia no felídeo selvagem supracitado (OGILVIE et al., 1983; JOHNSRUDE et al., 1996; BONILLA et al., 1997; CHALKER et al., 2004a).

O diagnóstico do *M. felis* pode ser feito por meio do isolamento em meio SP4 em microaerofilia a 37°C. O crescimento ocorre em 24 horas com produção de colônias em característica de ovo frito. Esta espécie fermenta glicose e não produz filmes ou manchas (COLE; GOLIGHTLY; WARD, 1967). O diagnóstico pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento do gene 16S rRNA já foram descritos (GRAY; KETRING; TANG, 2005; CHALKER et al., 2004b). *Immunoblot* pode também ser utilizado, principalmente para diferenciação de *M. felis* de *M. gateae* (BROWN; GIONET; SENIOR, 1990). O exame citológico



de raspados conjuntivais de animais com conjuntivite pode auxiliar no diagnóstico e apresenta uma predominância de leucócitos polimorfonucleares e pequenas inclusões basofílicas nas células epiteliais de membrana (WHITLEY, 2000).

### 3.2.3 Hemoplasmas

As riquetsias *Eperythrozoon* spp e *Haemobartonella* spp, parasitas de eritrócitos de mamíferos, foram re-classificados como micoplasmas em 1997 por meio de análise filogenética do gene 16S rRNA, sendo usualmente denominados hemoplasmas. Como esses microrganismos foram historicamente considerados espécies definidas na ordem dos *Rickettsiales*, o mesmos foram diretamente classificados como micoplasmas, sem obter o “status” de *Candidatus*. Aqueles que foram descritos “a posteriori” da reclassificação receberam o nome proposto seguido ao *Candidatus* pelas atuais regras taxonômicas (RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001).

A hemoplasmose dos felídeos é uma doença hemotrópica e infecto contagiosa causada pelos microrganismos *M. haemofelis* (Mhf), “*Candidatus M. haemominutum*” (CMhm) e/ou “*Candidatus M. turicensis*” (CMt). Antes da reclassificação como micoplasmas, a riquetsia *H. felis* possuía duas variantes, a “small form” ou Califórnia, e a “large form” ou Ohio. A primeira é hoje considerada CMhm e a segunda foi reclassificada como Mhf. O CMt foi descrito somente em 2005, em estudos realizados com gatos domésticos na Suíça (WILLI et al., 2005).

Os hemoplasmas aderem à membrana dos eritrócitos de felídeos causando sinais clínicos variáveis, que vão desde uma anemia aguda a uma forma crônica sem alterações hematológicas evidentes (MESSICK, 2004). A doença pode atingir animais de todas as faixas etárias e ambos os sexos. A principal fonte de infecção são animais infectados. Gatos domésticos que se recuperam da infecção permanecem cronicamente infectados por período indeterminado e se tornam carreadores do agente (TASKER, 2006). Não existem dados a respeito da morbidade, e a mortalidade e letalidade são baixas em indivíduos imunocompetentes. Estudos mais antigos descreveram alguns fatores de risco baseados na prevalência por análise citológica de esfregaços sanguíneos (NASH; BOBADE, 1986; GRINDEM; CORBETT; TOMKINS, 1990), que é agora conhecida pelo grande número de falsos positivos e negativos, como descrito por Tarigo et al.

(2006) e Guimaraes et al. (em fase de elaboração)<sup>3</sup>. Desta forma, estudos mais recentes que utilizaram a PCR puderam descrever de forma mais precisa alguns fatores de risco associados à hemoplasmoses, que incluem: sexo, idade, acesso a rua e infecções retrovirais (LURIA et al., 2004; TASKER, 2006; WILLI et al., 2006a,b; MACIEIRA et al., 2007; SYKES et al., 2007a).

Mhf e CMhm possuem distribuição mundial (TASKER et al., 2003; WILLI et al., 2007a). Diversos estudos descrevem a frequência de ambos os hemoplasmas em felídeos domésticos e selvagens, inclusive no Brasil (HAEFNER et al., 2003; GUIMARAES et al., 2005, 2007; BAUMANN et al., 2006; HACKETT et al., 2006; WILLI et al., 2006a, 2007b; DE MORAES et al., 2007; MACIEIRA et al., 2007; PETERS et al., 2008). Observa-se que a prevalência varia com a localização geográfica e o tipo de população avaliada. Estudos a respeito da frequência do CMt são mais restritos, mas esse microrganismo logo foi detectado em felídeos domésticos na Suíça, Inglaterra, Austrália, África do Sul e Japão (WILLI et al., 2006a,b; FUJIHARA et al., 2007). No Brasil, somente um espécime de *L. pardalis* de vida livre foi diagnosticado com CMt (WILLI et al., 2007b). Não existem evidências desse microrganismo na população de gatos domésticos nacionais.

Dez diferentes espécies de felídeos selvagens foram mundialmente identificadas com hemoplasmas, incluindo os pequenos felídeos neotropicais brasileiros *L. pardalis*, *L. geoffroyi* e *L. weidii* (HAEFNER et al., 2003; WILLI et al., 2007b), e um espécime *Panthera leo* de cativeiro nacional diagnosticado com CMhm pelo nosso grupo de pesquisa (GUIMARAES et al., 2007b).

A forma de transmissão dos hemoplasmas é pouco conhecida. Inoculações experimentais por via endovenosa, intraperitoneal e oral com sangue contaminado foram descritas (BERENT; MESSICK; COOPER, 1998; FOLEY et al., 1998b; WILLI et al., 2005; GARY et al., 2006), além da transmissão iatrogênica por transfusão sanguínea (WILLI et al., 2006a). Apesar de Woods et al. (2005) sugerirem a transmissão do Mhf pela pulga *Ctenocephalides felis*, os resultados não foram conclusivos. Seis animais foram expostos à atividade hematofágica de pulgas contaminadas e apenas um apresentou resultado positivo a PCR para Mhf, mas não apresentou alterações hematológicas. A ingestão experimental de pulgas contaminadas por gatos também não reproduziu a doença por Mhf ou CMhm (WOODS; WINEWSKI; LAPPIN, 2006). Entretanto, o DNA dos hemoplasmas é frequentemente detectado em pulgas e carrapatos coletados de felídeos, fortalecendo o indício da transmissão por artrópodes (TAROURA et al., 2005; LAPPIN et al., 2006; WILLI et al., 2007c). Alguns autores reportaram ainda a detecção de

<sup>3</sup> GUIMARAES et al. **Comparison between two diagnostic methods for Mhf and CMhm detection in blood from anemic domestic cats**. Em elaboração para o Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Setembro de 2008.

CMhm e CMt na saliva de felídeos domésticos experimentalmente infectados (DEAN et al., 2005, WILLI et al., 2007c); entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar a saliva como fonte de infecção. Transmissões “in utero” e transmamária têm sido sugeridas (FISHER; TOT; COLLIER, 1983).

Até o momento, não é possível definir a patogenia dos hemoplasmas (TASKER; LAPPIN, 2002). Estudos sobre mecanismos de patogenicidade da *H. felis* por meio de inoculação experimental foram realizados na década de 70 (MAEDE, 1975, 1979; MAEDE; HATA, 1975). Como esses micoplasmas não são cultiváveis, não podem ser quantificados com precisão, e desta maneira não há controle da dose infectante, que por sua vez poderia influenciar o aparecimento dos sinais clínicos e observações de patogenia. Além do mais, as rotas naturais de infecção (como transmissão por vetores) não foram avaliadas e poderiam interferir nos resultados (TASKER; LAPPIN, 2002).

Nesses estudos experimentais, a anemia hemolítica ocorreu de forma extravascular, com seqüestro de eritrócitos parasitados pelo baço, fígado, medula óssea e pulmão. Células do sistema fagocítico mononuclear desses órgãos realizaram eritrofagocitose ou fagocitaram apenas o parasita, deixando o eritrócito livre para retornar a circulação (MAEDE, 1978, 1979; MAEDE; MURATA, 1978).

O baço parece ser o principal responsável pelo sequestro de eritrócitos parasitados por hemoplasmas na doença aguda (MAEDE, 1978; MAEDE; MURATA, 1978). Desta forma, a esplenectomia induz a doença clínica em animais cronicamente infectados (BERENT; MESSICK; COOPER, 1998). Gatos domésticos esplenectomizados infectados com *H. felis* possuem recuperação mais lenta quando comparados a animais não esplenectomizados (MAEDE, 1978); e a parasitemia pode prolongar-se pelo dobro do tempo. Em animais esplenectomizados, a medula óssea, o fígado, e o pulmão sequestram mais eritrócitos parasitados, mas de forma pouco eficiente (MAEDE, 1978).

Observou-se que a *H. felis* causava danos diretos aos eritrócitos, aumentando a fragilidade osmótica dos mesmos e levando a uma hemólise intravascular (MAEDE, 1975). Da mesma forma, ao descrever o CMt pela primeira vez, Willi et al. (2005) o descobriram em um animal com severa anemia hemolítica intravascular. Entrementes, estudos com o hemoplasma de suínos, *M. suis*, descreveram aumento de fragilidade osmótica e diminuição de meia vida de eritrócitos em animais agudamente afetados (HEINRITZI; PLANK, 1992). Esses danos aos eritrócitos

podem, adicionalmente, induzir a uma hemólise imunomediada secundária. O micoplasma faz com que proteínas dos eritrócitos, antes desconhecidas ao sistema imune, fiquem expostas na circulação e desencadeiem uma resposta imune do hospedeiro contra a própria célula vermelha (MAEDE; HATA, 1975; WILLI et al., 2007a).

De maneira geral, as observações clínicas e experimentais das haemoplasmoses em gatos domésticos demonstram o estabelecimento de infecções crônicas e, algumas vezes, cíclicas (MESSICK, 2004). Ao contrário dos casos de CMt e CMhm, a parasitemia cíclica parece ser comum em infecções por Mhf (TASKER et al., 2006a,b; WILLI et al., 2005). Essa característica, associada às variações na apresentação clínica entre os três microrganismos, evidencia que os hemoplasmas variam em virulência. Desta forma, a identificação da espécie torna-se uma importante ferramenta para definição do prognóstico clínico (TASKER; LAPPIN, 2002).

Mhf é o causador clássico da anemia infecciosa felina (BERENT et al., 2000). A forma aguda da doença pode atingir animais imunossuprimidos e imunocompetentes. Os sinais clínicos mais comumente observados são: letargia, febre e anorexia (BERENT; MESSICK; COOPER, 1998). Os sinais clínicos resultantes da anemia variam com a severidade da mesma. Fraqueza, palidez de mucosas, dispnéia, taquicardia, esplenomegalia, hepatomegalia, murmúrios cardíacos e, ocasionalmente, síncope foram observadas. Alguns gatos moribundos podem apresentar hipotermia (SYKES, 2003).

O hematócrito e a concentração de hemoglobina de animais experimentalmente infectados com Mhf podem chegar a  $< 10\%$  e  $< 5,0$  g/dl, respectivamente (FOLEY et al., 1998b). A anemia normalmente é regenerativa com anisocitose, reticulocitose e policromasia; mas dependendo do momento de infecção e coleta pode-se observar valores compatíveis com uma anemia não regenerativa (SYKES, 2003). Mais de 80% dos eritrócitos podem estar parasitados em picos de parasitemia (BERENT; MESSICK; COOPER, 1998). Anemia não regenerativa pode também ser resultado de infecção concomitante por FeLV (SYKES, 2003).

Animais experimentalmente infectados por CMhm parecem desenvolver sinais clínicos e alterações hematológicas mínimas ou ausentes (FOLEY et al., 1998b). Por outro lado, um recente estudo demonstrou anemia em alguns animais infectados experimentalmente (TASKER et al., 2006a). Reynolds e Lappin (2007) descreveram a infecção por CMhm como causa primária de anemia em animais naturalmente infectados, sugerindo que esse hemoplasma seja mais patogênico do que o esperado. Sabe-se que animais co-infectados com FeLV e CMhm

desenvolvem uma anemia mais severa do que animais infectados somente pelo hemoplasma, e além disso podem desenvolver doenças mieloproliferativas (GEORGE et al., 2002). Como em outras infecções associadas com micoplasma, este conjunto deve ser mais amplamente investigado.

Pouco se conhece a respeito dos sinais clínicos e alterações hematológicas do CMt. Esse microrganismo foi primeiramente identificado em um gato naturalmente infectado, e este apresentava severa anemia hemolítica (WILLI et al., 2005). Entretanto, Willi et al. (2005) realizaram infecções experimentais em gatos Specific Pathogen Free (SPF) e puderam observar sinais clínicos mínimos ou ausentes. Em um estudo subsequente, a infecção natural por CMt também não levou a casos de anemia significativos e a presença de co-fatores mostrou-se necessária para o desenvolvimento da doença (WILLI et al., 2006a).

Não existem relatos de doença clínica em gatos selvagens infectados por hemoplasmas; bem como não se conhece se esses animais servem de reservatório do microrganismo ou se podem adoecer por hemoplasmas. Entre os poucos estudos, a prevalência é considerada menor do que aquelas encontradas em animais domésticos. A hemoplasmose foi associada à espécie e ao “modus vivendi” dos felídeos selvagens testados por Willi et al. (2007b). Associou-se a detecção de DNA proviral de FeLV em *Felis silvestris* com a infecção, e coinfeções por hemoplasmas foram frequentemente observadas. Entretanto, não houve diferença no hematócrito entre animais infectados e não infectados.

Embora não cultiváveis, os hemoplasmas podem ser observados isolados ou em grupos aderidos às hemáceas em esfregaços de sangue corados (Romanowsky, laranja de acridina ou imunofluorescência). Devido à parasitemia cíclica e fraca capacidade dos micoplasmas em se corar, a ausência desses microrganismos no esfregaço sanguíneo não exclui o diagnóstico da doença. Atualmente, técnicas moleculares são os testes diagnósticos de escolha para infecção por hemoplasmas e são capazes de detectar animais agudamente ou cronicamente infectados (TASKER; LAPPIN, 2002; MESSICK, 2004).

O tratamento é indicado somente para animais positivos ao diagnóstico pela PCR que possuam sinais clínicos da doença (TASKER, 2006). A eficácia dos tratamentos antibióticos ainda é contraditória e a eliminação total dos hemoplasmas não foi consistentemente provada. Parecem existir variações quanto a resposta antibiótica entre as três espécies e casos de supostas eliminações do CMt com doxiciclina foram relatados (WILLI et al., 2005, 2006a). De maneira

geral, a utilização de doxiciclina, enrofloxacina ou marbofloxacina foram eficientes em diminuir a carga parasitária e controlar os sinais clínicos em gatos infectados por Mhf e CMt (BERENT; MESSICK; COOPER, 1998; TASKER et al., 2006a,b).

Terapias de suporte incluem a fluidoterapia, transfusão sanguínea e corticoterapia. A transfusão sanguínea não é indicada em gatos domésticos com hematócrito de 15% ou mais. A utilização de corticóides para inibir a eritrofagocitose ainda é contraditória, sendo que muitos autores têm conseguido controlar a anemia somente com antibioticoterapia (BERENT; MESSICK; COOPER, 1998; FOLEY et al., 1998b; TASKER, 2006). Não existem vacinas disponíveis e o controle baseia-se na supressão dos fatores de risco, como acesso a rua, e no controle de artrópodes. Bancos de sangue e doadores também devem ser constantemente monitorados (TASKER, 2006).

### 3.2.4 Retrovírus em felídeos

A família *Retroviridae* é composta de sete gêneros (*Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, Tipo D, *Lentivirus* e *Spumavirus*) e várias espécies já foram identificadas em felídeos. Dois grupos afetam esses animais: os retrovírus endógenos (RD-114, enFeLV, e Mac-1) e os retrovírus exógenos (FeLV, FIV, FeFV). Até o momento, somente FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FeLV são considerados patogênicos; e dentre os vírus endógenos, o enFeLV (seqüências endógenas de FeLV no genoma de felídeos) recombina com seqüências do FeLV exógeno para formar diferentes tipos de vírus (STEWART et al., 1986; COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS, 2007).

Os retrovírus têm 80-100 nm de diâmetro, são pleomórficos, com envoltório e possuem uma molécula linear positiva de fita simples de RNA (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS, 2007). Esse RNA serve de molde para enzima transcriptase reversa, presente nesses microrganismos, para produção de uma cópia de DNA que é posteriormente integrada no genoma do hospedeiro como provírus. Esse processo é primordial para persistência viral, uma vez que genes provirais servem de molde para transcrição de novas proteínas dos vírus pela célula infectada e permanecem no genoma do gato de forma silenciosa, sem serem

identificados pelo sistema imune do mesmo. As conseqüências da replicação viral variam de acordo com a relação entre vírus e hospedeiro (JARRETT, 1999).

A estrutura genômica dos retrovirus é similar e todos possuem os genes *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica proteínas estruturais; *pol* codifica proteínas de transcrição e tradução e *env* codifica glicoproteínas do envelope. O FeLV possui estrutura mais simples, somente com *gag*, *pol* e *env*; enquanto que FIV adicionalmente possui genes acessórios codificadores de proteínas auxiliares (JARRETT, 1999).

### 3.2.5 Vírus da Leucemia Felina

FeLV é um *Gammaretrovirus* que pode infectar diferentes espécies de felídeos. Este microrganismo foi primeiramente isolado em 1964 (JARRETT et al., 1964) e três diferentes tipos foram identificados com base nas sequências do gene *env*: FeLV-A, FeLV-B e FeLV-C (SARMA; LOG, 1973). FeLV-A é a forma transmissível de FeLV e é encontrado em todos os gatos infectados. FeLV-B surge de uma recombinação de FeLV-A com enFeLV (STEWART et al., 1986) e FeLV-C deriva por mutação de FeLV-A (RIEDEL et al., 1988). Esses vírus apresentam variações na patogenia e virulência.

A transmissão usual é pela saliva, mas pode ocorrer pelo contato com urina, fezes, lágrimas e leite contaminados e por via transplacentária (LEVY, 2004). A principal fonte de infecção do FeLV é o gato assintomático persistentemente virêmico. Apesar da menor frequência detectada em animais selvagens quando comparados a gatos domésticos, a infecção por FeLV foi associada à doença severa em pumas e guepardos de cativeiro (JESSUP et al., 1993; MARKER et al., 2003). A infecção é também mencionada como causa de declínio populacional em felídeos de vida livre nos EUA (NOLEN, 2004); e no Brasil, evidências sorológicas e/ou virêmicas foram demonstradas em todas as espécies nacionais em cativeiro. Da mesma forma, espécimes de *L. pardalis* e *P. concolor* de vida livre apresentaram sorologia positiva para infecção. DNA proviral, além de viremia, já foi detectado em espécimes de *P. yagouaroundi* (SCHMITT et al., 2003; FILONI, 2006).

Quando um gato se infecta por FeLV, o vírus primeiramente se multiplica em tecidos linfóides da faringe e tonsilas. Em seguida, ocorre uma viremia transitória onde o vírus se difunde pelo organismo atingindo outros tecidos linfóides (timo, baço e linfonodos). Falhando em eliminar o agente, o vírus infecta a medula óssea; e leucócitos e plaquetas infectadas começam a circular no sangue. Se o animal permanecer em viremia, o vírus atinge glândulas salivares e epitélio glandular de mucosas onde é excretado. De forma geral, após infecção da medula óssea, o animal pode desenvolver uma viremia persistente, uma infecção latente ou uma infecção “seqüestrada”. No caso da infecção latente, o provírus permanece em células da medula óssea e linfonodos e não ocorre viremia. Em infecções “seqüestradas”, o microrganismo pode ser encontrado na medula óssea, baço, linfonodo e intestino, mas não no sangue. Em ambos os casos, uma reativação por condições de estresse, doenças bacterianas ou virais etc pode ocorrer e o animal torna a ser virêmico e a excretar o vírus (NELSON; COUTO, 2003; TIZARD, 2004). Animais persistentemente virêmicos eliminam o vírus constantemente e possuem o pior prognóstico clínico (JARRETT, 1999).

Ao contrário da infecção por FIV, muitos gatos expostos ao FeLV podem eliminar o agente (HARDY JR et al., 1976). A infecção por FeLV pode induzir uma resposta imune contra a proteína gp70, responsável pela aderência viral a célula do hospedeiro, que pode eliminar a infecção. Se isso acontecer antes da infecção da medula óssea, as chances de eliminação são altas. Cerca de 30% dos gatos infectados eliminam o agente dessa forma. Outros 30% desenvolvem uma viremia persistente e o restante desenvolve infecções latentes ou “seqüestradas” (NELSON; COUTO, 2003).

FeLV está associado a doenças neoplásicas e doenças degenerativas em gatos domésticos. A maioria dos gatos infectados com sintomatologia apresenta doenças não neoplásicas de caráter crônico e com sinais clínicos inespecíficos. São relatadas enterites, doenças respiratórias, periodontites, estomatites, dermatites, artrites, alterações do sistema nervoso central, problemas reprodutivos, dentre outros. Devido à infecção da medula óssea, linhagens celulares sanguíneas são diretamente afetadas, resultando em citopenias diversas e até pancitopenia, que levam à imunossupressão e conseqüentes infecções oportunistas (LEVY, 2004). FeLV destrói os linfócitos e suprime a função destes (TIZARD, 2004). Doenças imunomediadas por deposição de imunocomplexos também são associadas ao vírus (anemia hemolítica imunomediada, poliartrites,



glomerulonefrites e lúpus eritematoso). Dentre as doenças neoplásicas, o linfoma é o mais comum (LEVY, 2004).

O diagnóstico é realizado pelo isolamento, ELISA direto, sorologia indireta (anticorpos contra antígeno gp70), imunofluorescência indireta (IFA), PCR ou RT-PCR (GOMES-KELLER et al., 2006). No caso do ELISA direto, é possível detectar a proteína p27 (proteína do capsídeo viral) solúvel no plasma, soro, saliva ou lágrimas. A IFA, por outro lado, identifica esse antígeno no citoplasma das células infectadas em esfregaço de sangue periférico (HARDY JR; ZUCKERMANN, 1991; LEVY, 2004). A presença da proteína p27 indica que o animal está em viremia. Entretanto, devido à replicação viral inicial em tecidos linfóides locais, animais que ainda não tiveram a medula óssea infectada, e por consequência, possuem chance de eliminar o agente, podem apresentar resultado de ELISA direto positivo e IFA negativo (HARDY JR; ZUCKERMANN, 1991). Se esse animal eliminar a infecção, o ELISA deverá negativar dentro de algumas semanas. A IFA, nesse caso, confirmaria uma infecção da medula óssea. Da mesma maneira, sorologia indireta ou PCR para DNA proviral positivos não indicam viremia. Testes como RT-PCR, IFA ou ELISA direto servem para melhor indicar esse estado. A “American Association of Feline Practicioners” recomenda o ELISA como teste de triagem e a IFA como teste confirmatório para o diagnóstico da enfermidade. Como os protocolos de PCR e RT-PCR ainda não estão completamente padronizados entre diferentes laboratórios, a Associação é cautelosa em recomendá-lo. Porém, animais positivos ao DNA proviral pela PCR não necessariamente estão em viremia.

Drogas antivirais também podem ser utilizadas no tratamento de animais infectados com FeLV, mas, a princípio, os benefícios são mínimos para animais em viremia (NELSON; COUTO, 2003; LEVY, 2004). Animais com neoplasias podem ser submetidos a protocolos quimioterápicos. A identificação de animais positivos e consequente segregação parece ser a melhor forma de controle (LEVY, 2004). Zoológicos e criadouros devem considerar essa possibilidade ao colocar animais no mesmo cativieiro. Atualmente, vacinas estão disponíveis comercialmente, mas sua eficácia é contraditória. A recomendação é somente para animais domésticos com alto risco de adquirir a infecção (SPARKES, 2003; LEVY, 2004).

### 3.2.6 *Bartonella* spp

As Bartoneloses caracterizam-se por uma série de infecções em mamíferos causadas por microrganismos emergentes ou re-emergentes do gênero *Bartonella*. *Bartonella* spp são bactérias em forma de bacilos ou cocobacilos de coloração gram-negativa, classificadas dentro do filo *Proteobacteria*, classe *Alphaproteobacteria*, ordem *Rhizobiales*, família *Bartonellaceae*. São microrganismos hemotrópicos, fastidiosos e representados por 16 espécies (BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000). Apresentam atividade negativa de catalase, oxidase, urease e nitrato redutase. Algumas espécies foram descritas como parasitas intracelulares, enquanto outras não foram estudadas. Desta forma, acredita-se que o gênero *Bartonella* seja capaz de internalizar na célula do hospedeiro de forma pouco esclarecida, mas diversa. A *B. bacilliformis*, por exemplo, possui um flagelo que facilita a invasão eritrocitária. Por outro lado, a *B. henselae* não apresenta tal estrutura, mas internaliza nas mesmas células por um mecanismo dependente de actina denominado “invasome” (DEHIO et al., 1997).

As bartonelas tendem a ser espécie-específicas, mas por serem microrganismos com transmissão por vetores, a preferência dos mesmos por determinados hospedeiros indica a frequência com a qual determinada *Bartonella* pode ser encontrada em um hospedeiro. (BREITSCHWERDT; KORDICK, 2000). Das onze espécies ou subespécies conhecidas ou suspeitas de serem patogênicas para o homem, seis foram isoladas de cães e/ou gatos domésticos (CHOMEL et al., 2006). Os felídeos domésticos são os principais reservatórios da *B. henselae*, *B. clarridgeiae* e, provavelmente, da *B. koehlerae* (BRUNT et al., 2006). Podem também se infectar com *B. quintana* e *B. bovis*, e anticorpos anti-*B. elizabethae* foram descritos (HJELM; MCGILL; BLOMQUIST, 2002; BRUNT et al., 2006).

*B. henselae* é o principal agente causador da Doença da Arranhadura do Gato (DAG) em humanos (CHOMEL et al., 2006). Anticorpos anti-*B. clarridgeiae*, por outro lado, foram associados a alguns casos da doença (KORDICK et al., 1997; CHOMEL et al., 2006). Por sua vez, *B. koehlerae* foi recentemente descrita como causa de endocardite humana em um paciente com histórico de contato com gatos e isolada de gatos domésticos em Israel, EUA e França (AVIDOR et al., 2004; CHOMEL et al., 2006). Por ser a bartonela mais fastidiosa, estudos quanto à determinação de gatos como reservatórios têm sido dificultados.

*B. quintana* tem o homem como único reservatório conhecido e é transmitida por piolhos (*Pediculus humanus corporis*). Entretanto, recentes evidências sugerem que os gatos podem estar envolvidos na transmissão desse microrganismo. Inicialmente, DNA da bactéria foi amplificado da polpa dental de felídeos domésticos e de pulgas *Ctenocephalides felis* (ROLAIN et al., 2003; LA et al., 2005), e seres humanos infectados por *B. quintana* reportaram contato com gatos (DRANCOURT et al., 1996; PARROT et al., 1997). Mais recentemente, uma forte evidência molecular de transmissão desse microrganismo para uma paciente humana após mordedura de seu gato foi descrita (BREITSCHWERDT et al., 2007). Mais estudos devem ser realizados para se comprovar essa hipótese.

As pulgas dos felídeos são consideradas os principais vetores responsáveis pela transmissão de *Bartonella* spp entre esses animais. Carrapatos e mosquitos podem também estar envolvidos (SANOGO et al., 2003; CHUNG et al., 2004). A transmissão transplacentária ou transmamária não ocorreu experimentalmente (GUPTILL et al., 1998). Ao picar o animal, a pulga se infecta com *Bartonella* spp, que se multiplica no seu canal digestivo e é eliminada pelas fezes. A transmissão para humanos parece ocorrer pela inoculação dessas fezes contaminadas por meio de arranhaduras. Ainda não existem evidências de transmissão por picada de vetores de felinos em humanos (BRUNT et al., 2006).

Dentre os fatores de risco para infecção por *Bartonella* spp em felídeos domésticos cita-se de maneira controversa: o clima, a idade, o sexo, o acesso à rua e a infestação por pulgas (CHOMEL et al., 1995; FOLEY et al., 1998a; GUPTILL et al., 2004). Desta forma, a prevalência de sorologia positiva em gatos domésticos e selvagens varia muito entre os estudos, principalmente devido à exposição a esses fatores de risco (BRUNT et al., 2006).

Evidência sorológica da infecção por *B. henselae* foi descrita em diversas espécies de felídeos de vida livre e cativeiro nos EUA, além da descrição em *P. leo* e *A. jubatus* de vida livre na África (YAMAMOTO et al., 1998; ROTSTEIN et al., 2000; CHOMEL et al., 2004; MOLIA et al., 2004). Dentre os felídeos neotropicais de ocorrência nacional, todas as espécies já foram descritas com sorologia positiva para *B. henselae* (YAMAMOTO et al., 1998; FILONI et al., 2006; FILONI, 2006). Com exceção da *P. onca*, todos esses felídeos com sorologia positiva são de cativeiro nacional ou de vida livre (FILONI, 2006). A única *P. onca* com sorologia positiva foi descrita por Yamamoto et al. (1998) e é mantida em cativeiro nos EUA.

Apenas dois estudos descrevem a detecção molecular ou isolamento de *B. henselae* em felídeos selvagens (MOLIA et al., 2004; FILONI, 2006). Molia et al. (2004) descreveram ainda dois isolados de *Bartonella* de espécies desconhecidas em amostras de *P. leo* e *A. jubatus*. Nesse mesmo estudo, foi possível isolar *B. henselae* de *P. leo* e detectar molecularmente *Bartonella* spp nas duas espécies de felídeos. Filoni (2006) testou todas as espécies de felídeos neotropicais, com exceção da *P. onca*, e detectou DNA de *B. henselae* somente em um espécime de *L. weidii* de cativeiro. Da mesma forma que felídeos domésticos, esses estudos sugerem que animais selvagens também possam ser classificados como reservatório do agente, mantendo-o no ambiente em que vivem.

A patogenia da infecção por *Bartonella* spp em gatos é pouco conhecida. Sabe-se que a *B. henselae* invade e adere a eritrócitos, células endoteliais, pericitos, macrófagos e neutrófilos; mas pode ser encontrada em diversos tecidos (KORDICK; BREITSCHWERDT, 1995; MAURIN; BERTLES; RAOULT, 1997; ANDERSON; NEUMAN, 1997; KORDICK et al., 1999). O tempo de bacteremia nos gatos domésticos é variável e acredita-se que eles sejam capazes de eliminar a bactéria do organismo, dado o grande número de animais soropositivos sem evidência de infecção (BRUNT et al., 2006). Desconhece-se o tempo de bacteremia ou eliminação do agente em gatos selvagens.

A infecção por *Bartonella* spp de origem felina em humanos pode resultar em diferentes apresentações clínicas. A DAG clássica em pacientes imunocompetentes é caracterizada por linfadenopatia regional que persiste por algumas semanas até meses. Em 5 a 9% dos pacientes ocorrem manifestações atípicas, como encefalite, endocardite, anemia hemolítica, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite etc. A maioria dos casos de endocardite por *Bartonella* em humanos se deve a infecção por *B. quintana*, mas casos de *B. henselae* e *B. koehlerae* já foram descritos. Em pacientes imunossuprimidos, *B. henselae* causa febre e/ou bacteremia prolongada. Angiomatose bacilar ou peliose é normalmente observada em pessoas altamente imunocomprometidas (JACOMO; KELLY; RAOULT, 2002; CHOMEL et al., 2006).

Alterações clínicas da infecção nos gatos domésticos não foram inteiramente investigadas. Infecções experimentais por *B. koehlerae* levaram a bacteremia, mas não produziram sintomatologia (YAMAMOTO et al., 2002a). Por outro lado, inoculações experimentais de *B. henselae* ou *B. clarridgeiae* em sua maioria não resultam em sinais clínicos, mas alterações como febre, anemia, problemas neurológicos e linfadenopatia já foram descritos (BRUNT et al.,

2006). Lesões histopatológicas também foram observadas nesses animais e incluem: hiperplasia de linfonodos e folicular esplênica, microabscessos esplênicos e hepáticos, nefrite intersticial linfocítica ou piogranulomatosa, dentre outras (GUPTILL et al., 1997; KORDICK et al., 1999). Nos estudos relacionados a infecções naturais, um caso fatal de endocardite por *B. henselae* e associações de *Bartonella* spp a doença ocular, estomatites, doença do trato urinário, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e hematuria já foram descritos de forma contraditória em literatura (UENO et al., 1996; GLAUS et al., 1997; LAPPIN; BLACK, 1999; CHOMEL et al., 2003; BREITSCHWERDT et al., 2005). Apesar dos resultados desses estudos indicarem que a infecção por *Bartonella* spp deva ser considerada como diagnóstico diferencial de várias alterações em gatos domésticos, acredita-se que outros estudos devam ser realizados para se estabelecer associações causais, uma vez que a grande maioria dos animais infectados não apresenta sinais clínicos (BRUNT et al., 2006). Até o momento, não existem estudos associando doença clínica à infecção por *Bartonella* spp em felídeos selvagens.

Os testes disponíveis para o diagnóstico da infecção por *Bartonella* spp em gatos incluem: cultura de microrganismos, detecção de DNA no sangue e tecidos, e detecção de anticorpos no soro, humor aquoso ou líquido cefalorraquidiano por meio de imunofluorescência, ELISA e *Western Blot* (BRUNT et al., 2006). A cultura, considerada o teste padrão ouro, pode ser realizada a partir de sangue total inoculado em placas de ágar Columbia com 5% de sangue de ovino/coelho/cavalo incubadas a 35-37°C a 5% de CO<sub>2</sub> por quatro a seis semanas (JACOMO; KELLY; RAOULT., 2002). Todos esses testes têm sido utilizados para o diagnóstico de bartonelose em felídeos selvagens (MOLIA et al., 2004; FILONI, 2006).

O tratamento de gatos domésticos infectados sem sinais clínicos não é indicado, pois não existem evidências concretas de eliminação da infecção (BRUNT et al., 2006). O tratamento desses animais pode acarretar em sensação de falsa segurança dos proprietários que, conseqüentemente, podem descuidar do controle de pulgas dos animais. É evidente que o controle de vetores auxilia na prevenção da re-infecção e na transmissão para o homem. As diretrizes estabelecidas pelo Serviço de Saúde Pública e Doenças Infecciosas dos EUA para a prevenção de doenças oportunistas entre indivíduos HIV-positivos não indica o teste rotineiro dos animais ou seus donos para infecção por *Bartonella* spp. Nesse caso, as desvantagens superam as vantagens devido ao grande número de falsos positivos e/ou negativos nos testes disponíveis, a possibilidade de eliminação do agente naqueles animais considerados positivos, a possibilidade

de uma eutanásia desnecessária, e a sensação de falsa segurança e/ou redistribuição de gastos que podem levar a um menor controle de vetores. No Brasil, não existem diretrizes estabelecidas por órgãos governamentais ou um plano de prevenção da transmissão desses microrganismos para profissionais que trabalham com gatos selvagens em cativeiro ou em vida livre (FILONI, 2006).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS DE REFERÊNCIA

Cepas de *Mycoplasma felis* CO, *M. gateae* CS, *M. pneumoniae* FH, *M. arginini* G-230, *M. genitalium* G37, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 foram obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP; enquanto que a cepa de *M. simbae* ATCC 49888 foi obtida da Coleção ATCC. Soluções de DNAs extraídos de *M. leocaptivi*, *M. leopharyngis*, *M. felifaucium* e *M. feliminutum* foram cedidas pelo Professor Daniel Brown da Universidade da Flórida, EUA.

Plasmídeos (pGEM T-easy, Promega, EUA) contendo fragmentos parciais do gene 16SrRNA do Mhf (393 pb) e CMhm (192 pb) foram fornecidos pela Professora Joanne Messick da Universidade de Purdue, EUA. Plasmídeo (TOPO, Invitrogen, Suíça) contendo fragmento parcial (~1400 pb) do gene 16SrRNA do CMt e 100 µL de DNA extraído de sangue total de um felídeo doméstico SPF foram cedidos pela Professora Regina Hofmann-Lehmann da Universidade de Zurich, Suíça.

Amostras de DNA extraído de sangue de suínos e gatos domésticos sabidamente positivos para hemoplasmas (*M. suis*, CMhm, Mhf) em estudos anteriores (BAUMANN et al., 2006; GUIMARAES et al., 2007a) foram utilizadas em testes de especificidade. Uma amostra de sangue de *L. pardalis* positiva para CMhm e negativa para Mhf e CMt por PCR em tempo real (WILLI et al., 2007b) foi fornecida pela Médica Veterinária, DSc, Cláudia Filoni, pós doutoranda do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Uma amostra de sangue total de um felídeo doméstico sabidamente positivo para FeLV (diagnosticado por imunofluorescência indireta e confirmado por sequenciamento de DNA proviral) foi fornecido pela Professora Mitika Hagiwara da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

*Bartonella henselae* cepa Houston foi adquirida no Instituto Adolfo Lutz (sessão de cultura) sob liofilização.

DNA extraído de *Ehrlichia chaffensis* foi fornecido pelo Professor Marcelo Labruna do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

#### 4.2 ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O Refúgio Bela Vista, localizado em Foz do Iguaçu, Paraná, foi escolhido para o presente estudo. Tal instituição, mantida pela Hidrelétrica Itaipu Binacional, compreende um Zoológico e um Criadouro Científico (Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e Zoológico Roberto Ribas Lange) que abrigam em cativeiro diferentes espécies de mamíferos, aves e répteis de ocorrência regional.

Durante três manhãs consecutivas foram coletadas amostras de sangue total e suabes de orofaringe e conjuntiva de 57 pequenos felídeos neotropicais assim listados: 1 *L. geoffroyi*, 14 *L. pardalis*, 17 *L. weidii*, 22 *L. tigrinus* e 3 *P. yagouaroundi* (Tabela 1). Todos os animais foram contidos inicialmente com puçá, seguido de anestesia geral por injeção intramuscular. A dose foi calculada por uma estimativa de peso e, após a pesagem, foi definida com acurácia. Utilizaram-se diferentes combinações de hidrocloreto de cetamina, hidrocloreto de xilazina, sulfato de atropina e diazepam.

As amostras de sangue total foram coletadas por punção de veia jugular ou femoral e armazenadas em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Em seguida, foram enviadas ao Laboratório Ambiental da Hidrelétrica de Itaipu Binacional para realização de hemograma completo por contagem manual. Esses hemogramas foram realizados pela equipe do Refúgio Bela Vista e Laboratório Ambiental, sob orientação do médico veterinário Wanderlei de Moraes e da farmacêutica Leonilda Correia dos Santos, e como descrito por Santos (1999a). Seus resultados foram posteriormente disponibilizados para esse trabalho. O restante do sangue foi então armazenado em tubos de 1,5 mL estéreis e enviados em caixas com gelo seco para o Laboratório de Micoplasmas da USP.



Os suabes foram obtidos por fricção da conjuntiva ocular e mucosa de orofaringe e armazenados em 2 mL de meio de transporte SP4 (Anexo A). Foram posteriormente enviados sob refrigeração (4 °C) ao Laboratório de Micoplasmas da USP.

Durante a coleta, dados relacionados à aparência geral, peso e presença de ectoparasitas foram anotados. Informações sobre o histórico dos animais incluíam: anemia e pulgas.

Tabela 1 – Número de animais estudados separados por espécie, sexo e origem<sup>1</sup> - São Paulo - 2008

Variável	Espécie de felídeo (número total de animais)					Total	P <sup>4</sup>
	<i>Leopardus geoffroyi</i> (1) <sup>5</sup>	<i>Puma yagouaroundi</i> (3) <sup>5</sup>	<i>L. pardalis</i> (14) <sup>5</sup>	<i>L. tigrinus</i> (22) <sup>5</sup>	<i>L. weidii</i> (17) <sup>5</sup>		
<b>Sexo</b>							
Macho	1	2	5	11	8	27	p = 0,77
Fêmea	0	1	9	11	9	30	
<b>Cativeiro</b>							
VL <sup>2</sup>	1	2	7	16	8	34	p = 0,29
NC <sup>3</sup>	0	1	7	6	9	23	

<sup>1</sup> A identificação individual dos animais é descrita no apêndice A.

<sup>2</sup> VL = animal oriundo de vida livre

<sup>3</sup> NC = animal nascido em cativeiro

<sup>4</sup> valor de p no teste do quiquadro para analisar diferença estatística entre observado e esperado em uma população homogênea. Esperava-se um número igual de machos e fêmeas, bem como de animais NC e de VL. Ambos os valores de p rejeitam a hipótese de diferença estatística entre os números.

<sup>5</sup> A distribuição de felídeos dentro das 5 espécies consideradas é a mesma para NC e VL, bem como para machos e fêmeas (p = 0,3778 e p = 0,6953, respectivamente).

#### 4.3 CULTIVO DE MICOPLASMAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Os caldos utilizados como transporte dos suabes foram homogeneizados e submetidos ao cultivo em meio específico SP4 (Anexo A) (TULLY, 1995). Os 2 mL de cada meio de transporte dos suabes de orofaringe foram filtrados em membrana 0,45 µm (Millipore, São Paulo, Brasil) antes de serem semeados em caldo e ágar. Duzentos µL desse filtrado foram diluídos serialmente até 10<sup>-3</sup> em 2 mL de caldo SP4. Um total de 50 µL da primeira e da última diluição foram semeados em placas com ágar SP4. Ao contrário do suabe de orofaringe, o meio de transporte do suabe de conjuntiva não foi filtrado. O mesmo processo de semeadura foi adotado, com exceção

do meio sólido, cuja semeadura da primeira diluição foi substituída pela semeadura direta do suabe sobre a superfície do ágar.

Os caldos e placas foram incubados a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Ao 15º dia, novos repiques em caldo e placa SP4 foram realizados e observados por mais 15 dias. Micoplasmas foram caracterizados pela produção de colônias em forma de “ovo frito” e por suas bases metabólicas, como a utilização de glicose e/ou arginina evidenciada pela alteração de pH, e formação de filmes e manchas (RAZIN; TULLY, 1983).

Cepas de referência de micoplasma (*M. felis*, *M. gateae*, *M. simbae*, *M. arginini*, *M. pneumoniae* e *M. genitalium*) também foram cultivadas como descrito, mas sem filtrações prévias.

#### 4.4 CULTIVO DE CEPAS BACTERIANAS DE REFERÊNCIA

As cepas de *B. henselae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. mirabilis* e *S. aureus* foram cultivadas em meios específicos como descrito a seguir.

##### 4.4.1 Cultivo de *Bartonella henselae*

A cepa de *Bartonella henselae* Houston liofilizada foi hidratada com água destilada estéril e imediatamente semeada em Ágar Columbia com 5 % de sangue de ovino desfibrinado (Anexo A); sendo incubada por cerca de sete dias a 37 °C com 5 % CO<sub>2</sub>. O restante do caldo hidratado foi submetido à extração de DNA bacteriano. Após incubação, um raspado das colônias com alça estéril foi realizado, sendo as mesmas transferidas para solução fisiológica para posterior congelamento com glicerol estéril.

#### **4.4.2 Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus***

Todas as cepas foram inicialmente inoculadas em caldo tripticase e soja (TSB) e incubadas a 37 °C por 18 horas. Para certificar ausência de contaminação, cada cepa foi separadamente semeada em placas com meios específicos e incubadas a 37 °C por 24 horas. Nesse caso, procedeu-se a semeadura em ágar MacConkey para *E. coli* e *P. mirabilis*; ágar Manitol para *S. aureus* e *B. subtilis*; e ágar Cetrimide para *P. aeruginosa* (Anexo A). Uma colônia de cada espécie bacteriana foi inoculada novamente em caldo TSB e incubada a 37 °C por 18 horas. Uma alíquota de 200 µL foi separada para extração de DNA e o restante foi acondicionado com glicerol a -20 °C.

#### **4.5 EXTRAÇÕES DE DNA**

Amostras de suabes de orofaringe e conjuntiva, sangue e cepas bacterianas de referência tiveram seu DNA extraído como descrito a seguir.

##### **4.5.1 Extração pelo método de fervura**

A extração de DNA do meio de transporte filtrado dos suabes de orofaringe e do meio de transporte dos suabes de conjuntiva foi realizada pelo método de fervura descrito por Fan, Kleven e Jackwood (1995). Um mL do meio foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sedimento lavado com PBS 1 X (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl 0,85%; pH 7.4). Após lavagens, o sedimento foi ressuspendido em 20 µL de PBS 1X, e a solução aquecida a 100 °C em banho maria e resfriada em gelo. Em seguida, a solução foi centrifugada novamente a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante contendo o DNA congelado a -80 °C.

#### 4.5.2 Extração de DNA de sangue total

Um total de 325 µL de sangue total de cada amostra de felídeo selvagem e da amostra do gato doméstico positivo para FeLV foi submetido à extração de DNA por meio de um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (GenomicPrep Blood DNA Isolation Kit, GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). As células foram primeiramente lisadas (“RBC Lysis Solution”) e uma solução preservativa de DNA foi adicionada. Em seguida, uma solução detergente aniônica solubilizou os componentes e proteínas celulares ou citoplasmáticas, que foram subsequentemente removidas por precipitação em sal (“Protein Precipitation Solution”). O DNA foi então isolado por precipitação com álcool (Isopropanol 100 % e Etanol 70 %) e dissolvido em solução de tampão de eluição (“Elution Buffer”).

#### 4.5.3 Extração pelo método de Boom

Um total de 200 µL de meio de cultura contendo *B. henselae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. mirabilis* ou *S. aureus* foi utilizado para extração dos respectivos DNAs pelo método de Boom (BOOM et al., 1990). Os DNAs dos isolados no presente estudo foram obtidos da mesma forma. Esse método baseia-se na apreensão do DNA pela sílica (SiO<sub>2</sub>) e subsequentes lavagens para retirada de impurezas com tampões de lise e lavagem (Lise: 120 g de tiocianato de guanidina, 100 mL Tris HCl 0,1 M, 22 mL de EDTA, 2,6 g Triton X-100, pH 8,0; Lavagem: 120 g de tiocianato de guanidina, 100 mL Tris HCl 0,1 M, pH 6,4), acetona e etanol 70 %. O aquecimento do sedimento de sílica a 62 °C por 10 minutos libera o DNA no tampão de eluição (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), que poderá ser utilizado para posterior análise.

#### 4.5.4 Espectrofotometria

Todas as quantificações de DNA extraído foram realizadas por espectrofotometria em aparelho DU-640 UV/VIS Scanning Spectrophotometer, utilizando um comprimento de onda (absorbância) de 260 nm de acordo com as instruções do fabricante (Beckman Coulter, São Paulo, Brasil).

#### 4.6 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

As amostras de suabes de orofaringe e conjuntiva foram submetidas à PCRs para detecção de *Mollicutes* e *M. felis*; enquanto que as amostras de sangue foram submetidas à PCRs para detecção de GAPDH, Mhf, CMhm, DNA proviral de FeLV e *Bartonella* spp. Tais reações são descritas a seguir.

##### 4.6.1 PCR para detecção de *Mollicutes*

Para detecção de DNA de *Mollicutes* nas amostras extraídas de suabes de orofaringe e conjuntiva, uma PCR utilizando iniciadores de amplo espectro para microrganismos dessa Classe foi realizada. Os iniciadores utilizados, descritos por Van Kuppeveld et al. (1992), são complementares as sequências dos genes 16SrRNA da maioria dos micoplasmas, ureaplasmas e acholeplasmas; mas não às sequências de hemoplasmas. Por esse motivo, foram utilizados somente em amostras de DNA extraído de suabes. Os iniciadores utilizados para amplificar um produto de 270 pb foram: “forward” GPO3 5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3', “reverse” MGSO 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'.

A reação de 25 µL continha 1 X Tampão para PCR a 10 X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM; 0,2 mM de dNTPs a 1 mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 20

pmol de cada iniciador a 50 pmol/ $\mu$ L, 0,5 U de Platinum *Taq* DNA polimerase a 5 U/  $\mu$ L (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e água ultrapura estéril. O protocolo no termociclador consistiu em uma temperatura inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; com extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Amostras de DNA extraído de *M. felis* e/ou *M. gateae* e/ou *M. arginini* foram utilizados como controles positivos. Água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo. Um total de 1  $\mu$ L de cada amostra de DNA extraído de suabes foi utilizado em cada reação. Os produtos foram armazenados a 4 °C para posterior análise por eletroforese.

#### **4.6.2 Desenvolvimento e padronização da PCR para detecção de DNA de *Mycoplasma felis***

Como os iniciadores descritos por Chalker et al. (2004b) apresentaram reações cruzadas com *M. leocaptivi* e *P. multocida* nas reações realizadas, foi necessário desenvolver novos iniciadores para detecção do *M. felis*. Esses foram desenvolvidos baseado na seqüência do gene 16S rRNA do *M. felis* ATCC 23391 de gatos domésticos armazenada no GenBank sob acesso U09787. O programa Megalign do software DNASTAR (DNASTAR Inc., Wiscousin, EUA) foi utilizado para alinhamento por método Clustal W de seqüências similares e seleção de regiões alvo para desenvolvimento de iniciadores. A análise dos iniciadores foi realizada utilizando os programas Gene Runner e Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA). Os seguintes iniciadores foram selecionados para amplificação do produto de 299 pb: “forward” M. fel -F 5’AGA GAA TCT ATC GGC ACA GC 3’, “reverse” MF-R 5’GTC TCC CTA GAA TAT ACT AAG GGA CC 3’.

Para padronização da reação de PCR, um gradiente de temperatura de anelamento e testes quanto à concentração de MgCl<sub>2</sub>, quantidade de iniciadores e volume da reação (25 e 50  $\mu$ L) foram realizados. Desta forma, a reação resultante ficou baseada em 25  $\mu$ L contendo 1 X Tampão para PCR a 10 X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM; 0,2 mM de dNTPs a 1mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 35 pmol de cada iniciador a 100 pmol/ $\mu$ L, 0,5 U de Platinum *Taq* DNA polimerase a 5 U/  $\mu$ L (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e água MilliQ estéril. O protocolo no termociclador consistiu em temperatura inicial de 94 °C por 10 minutos,

seguida de 43 ciclos a 94 °C por um minuto, 58,9 °C por um minuto e 72 °C por um minuto; com extensão final de 72 °C por cinco minutos.

DNA extraído de cepa de *M. felis* e água ultrapura estéril foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Um total de 5 µL de cada amostra de DNA extraído de suabes foi utilizado em cada reação. Os produtos foram armazenados a 4 °C para posterior análise por eletroforese.

#### 4.6.3 PCR para detecção de gene interno

Para garantir a eficácia da extração de DNA do sangue total, uma PCR para detecção do gene codificador da GAPDH (“glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”) do gato foi realizada de acordo com iniciadores descritos em Shi e Roy-Burman (2000). Os iniciadores utilizados foram RBD 581 5’CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3’, e RBD 582 5’ TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC AC 3’. Devido à ausência de descrição dos ciclos e reações por Shi e Roy-Burman (2000) alguns parâmetros foram ajustados, dentre eles, a temperatura de anelamento, a quantidade de iniciadores e a concentração de MgCl<sub>2</sub>.

A reação resultante ficou baseada em 25 µL contendo 1 X Tampão para PCR a 10 X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4); 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM; 0,2 mM de dNTPs a 1mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 20 pmol de cada iniciador a 10 pmol/µL, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase a 1 U/ µL (Biotools do Brasil, São Paulo, Brasil), e água ultrapura estéril. O protocolo no termociclador consistiu em temperatura inicial de 94 °C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 50,1 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; com extensão final de 72 °C por 5 minutos. Como controle positivo utilizou-se DNA extraído de sangue total de gato SPF e como controle negativo água ultrapura estéril. Os produtos foram armazenados a 4 °C para posterior análise por eletroforese.

O limite de detecção da técnica foi determinado para se estimar a quantidade mínima de amostra a ser adicionada em cada reação. Procedeu-se a diluição decimal a partir de 250 ng de DNA extraído de sangue total do gato SPF (aproximadamente 4 µL de amostra) até um fentograma (10<sup>-8</sup>). Em seguida, as diluições foram submetidas à PCR nas mesmas condições

descritas acima. A PCR foi capaz de detectar até 100  $\mu\text{g}$  de DNA ( $10^{-3}$ ). Considerando que cada célula diplóide possui seis  $\mu\text{g}$  de DNA (MIYAZAWA; JARRETT, 1997), tornam-se necessários aproximadamente 17 leucócitos em cada amostra extraída de sangue total para ser detectável pela PCR. Consequentemente, após a indicação pelo espectrofotômetro de que as amostras de DNA extraído de sangue do presente estudo possuíam mais de 10  $\eta\text{g}$  de DNA/ $\mu\text{L}$ , foi utilizado apenas 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra para reação de PCR do GAPDH.

#### 4.6.4 PCR para detecção de hemoplasmas

Os iniciadores para detecção de DNA de Mhf e CMhm foram descritos por Berent, Messick e Cooper (1998) e Foley et al. (1998b), respectivamente, e utilizados em trabalho prévio no Laboratório de Micoplasmas (BAUMANN et al., 2006). Ambos são baseados em sequências do gene 16SrRNA e amplificam um produto de 393 pb e 192 pb para Mhf e CMhm, respectivamente. São eles, para Mhf: “forward” *H. felis* F1 5’GAC TTT GGT TTC GGC CAA GG 3’, “reverse” *H. felis* R3 5’ CGA AGT ACT ATC ATA ATT ATC C CT C 3’; e para CMhm: “forward” Califórnia F1 5’GCA TAA TGT GTC GCA ATC 3’, “reverse” Califórnia R1 5’GTT TCA ACT AGT ACT TTC TCC C 3’.

A reação para detecção de Mhf foi baseada em 25  $\mu\text{L}$  contendo 1 X Tampão para PCR a 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4); 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  a 50 mM; 0,2 mM de dNTPs a 1 mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 10 pmol de cada iniciador a 10 pmol/ $\mu\text{L}$ , 1 U de Platinum *Taq* DNA polimerase a 5U/ $\mu\text{L}$  (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e água ultrapura estéril. O protocolo no termociclador consistiu em temperatura inicial de 94 °C por 10 minutos, seguida de 43 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 58,3 °C por 45 segundos e 72 °C por um minuto; com extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Um plasmídeo (pGEM-T easy, Promega) com inserção do produto da PCR e água ultrapura estéril foram utilizados como controles positivo negativo, respectivamente. Um total de 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra de DNA extraído de sangue foi utilizado em cada reação, como descrito por Berent, Messick e Cooper (1998). Os produtos foram armazenados a 4 °C para posterior análise por eletroforese.



A reação para detecção de CMhm foi baseada em 25  $\mu$ L contendo 1 X Tampão para PCR a 10 X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4); 1,5 mM de  $MgCl_2$  a 50 mM; 0,2 mM de dNTPs a 1 mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 25 pmol de cada iniciador a 20 pmol/ $\mu$ L, 1 U de Platinum *Taq* DNA polimerase a 5 U/ $\mu$ L (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e água ultrapura estéril. O protocolo no termociclador consistiu em temperatura inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 59 °C por um minuto e 72 °C por 45 segundos; com extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Um plasmídeo (pGEM-T easy, Promega) com inserção do produto da PCR e água ultrapura estéril foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Um total de 5  $\mu$ L de cada amostra de DNA extraído de sangue foi utilizado em cada reação, como descrito por Foley et al. (1998b). Os produtos foram armazenados a 4 °C para posterior análise por eletroforese.

A PCR para detecção de DNA de CMt nas amostras extraídas do sangue dos felídeos selvagens encontra-se em padronização.

#### 4.6.5 PCR para detecção de DNA proviral de FeLV

Os iniciadores para realização do Nested-PCR para detecção de DNA proviral de FeLV foram descritos por Miyazawa e Jarrett (1997), e são assim listados: primeira reação, U3-F(1) 5'ACA GCA GAA GTT TCA AGG CC 3', G-R(1) 5'GAC CAG TGA TCA AGG GTG AG 3'; e na segunda reação, U3-F(2) 5'GCT CCC CAG TTG ACC AGA GT 3', G-R(2) 5'GCT TCG GTA CCA AAC CGA AA 3'. Esses iniciadores baseiam-se na amplificação parcial do gene "gag" e região U3 do FeLV subgrupo A genoma completo (GenBank M18247) (FeLV-FAIDS) e amplificam um produto de 601pb (MYIAZAWA; JARRETT, 1997).

As reações de 25  $\mu$ L para primeira e segunda reação da nested-PCR continham 1 X Tampão de PCR a 10 X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4); 2,0 mM de  $MgCl_2$  a 50 mM; 0,2 mM de dNTPs a 1,0 mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP); 10 pmol de cada iniciador a 10 pmol/ $\mu$ L, 1 U de *Platinum Taq* DNA polimerase a 5 U/ $\mu$ L (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e água ultrapura estéril. O protocolo no termociclador consistiu em temperatura inicial de 94 °C por 7

minutos, seguida de 33 ciclos a 94 °C por 55 segundos, 55,3 °C por 55 segundos na primeira reação ou 59,5 °C por 55 segundos na segunda reação, e 72 °C por 1 minuto e 10 segundos; com extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Uma amostra de DNA extraído de sangue total de um gato doméstico sabidamente positivo para FeLV e água ultrapura estéril foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Um total aproximado de 200 ng de cada amostra de DNA extraído de sangue foi adicionado a primeira reação e 1 µL do produto dessa reação foi adicionada a segunda reação para amplificação. Os produtos foram armazenados a 4 °C para posterior análise por eletroforese.

#### 4.6.6 PCR para detecção de *Bartonella* spp

Iniciadores descritos por Maggi et al. (2006) foram utilizados para detecção de *Bartonella* spp em amostras de DNA extraídas do sangue dos felídeos selvagens. Esses iniciadores são complementares a seqüência do espaço intergênico dos genes 16S rRNA e 23S rRNA e amplificam diferentes espécies de *Bartonella* spp de acordo com o tamanho das bandas no gel de agarose em eletroforese. *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii berkhoffii*, *B. elizabethae*, *B. quintana* e *B. bovis* amplificam produtos de 635 pb, 635 pb, 725 pb, 673 pb, 520 pb, 406 pb, respectivamente. Os iniciadores utilizados foram: “forward” 325s 5’ CTT CAG ATG ATG ATC CCA AGC CTT YTG GCG 3’ e “reverse” 1100as 5’ GAA CCG ACG ACC CCC TGC TTG CAA AGC A 3’.

A reação de PCR foi realizada como descrita por Maggi et al. (2006), onde 25 µL continham 1 X Tampão para PCR a 10 X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4); 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM; 0,2 mM de dNTPs a 1 mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP); 12,5 µmol de cada iniciador a 10 µmol/µL; 0,625 U de Platinum *Taq* DNA polimerase a 5 U/ µL (Invitrogen, São Paulo, Brasil); e água ultrapura estéril. O protocolo no termociclador teve algumas alterações e consistiu em temperatura inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 66 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; com extensão final de 72 °C por cinco minutos.

Uma amostra de DNA extraído de *B. henselae* cepa Houston foi utilizada como controle positivo. Como controle negativo utilizou-se água ultrapura estéril. Um total aproximado de 200 ng de cada amostra de DNA extraído de sangue foi adicionado em cada reação, como descrito por Maggi et al. (2006). Os produtos foram armazenados a 4 °C para posterior análise por eletroforese.

#### **4.6.7 Detecção dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose**

Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese utilizando gel de agarose 1 a 2 % com brometo de etídio (0,5 mg/mL) em solução TAE 1 X (40 mM Tris-acetato; 2 mM EDTA, pH 8,0). Foram submetidos a 80-100 V e visualizados sob luz ultravioleta em transluminador Vilber Lourmat (Vilber Loumart, Marne la Vallée, França). O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canadá).

#### **4.6.8 Limite de detecção das Reações em Cadeia da Polimerase**

Com exceção da PCR para detecção de *Mollicutes*, determinou-se em todas as reações o limite de detecção de DNA. O limite de detecção e a especificidade da PCR para *Mollicutes* foi realizado por Santos (2003).

O procedimento descrito por Marques et al. (2007) foi utilizado para determinar o limite de detecção da PCR para *M. felis*, onde diluições decimais foram realizadas a partir de 100 ng até 1 fg de DNA extraído de cultura pura. Para se estimar o número de microrganismos capazes de serem detectados pela reação, o tamanho aproximado do *M. fermentans* de aproximadamente 1 Mb foi utilizado como base, uma vez que o ambos fazem parte do mesmo grupo filogenético (BROWN; MACLAUGHLIN; BROWN, 1995).

Para o limite de detecção do DNA de hemoplasmas nas reações, controles positivos de Mhf e CMhm fornecidos pela Prof Joanne Messick foram quantificados por espectrofotometria e

diluídos serialmente em água (500 mil, 50 mil, 5 mil, 500, 50, 5 e 0,5 cópias de plasmídeos) como descrito por Birkenheuer et al. (2006).

Para o limite de detecção da PCR para DNA proviral de FeLV, a amostra de DNA extraída do sangue do gato doméstico sabidamente positiva foi quantificada por espectrofotometria e diluída serialmente a  $10^{-10}$  partindo de 1µg de DNA.

Para o limite de detecção da PCR para *Bartonella* spp, o DNA foi quantificado por espectrofotometria e diluído decimalmente de acordo com o tamanho do genoma e peso em massa de cada microrganismo, como descrito por Applied Biosystems (2003). Para estimar o número de microrganismos capazes de serem detectados pela reação, utilizou-se um tamanho genômico de 2Mb para *B. henselae* (MARUYAMA et al., 2001), e para proceder as diluições, a solução de DNA extraído e a água da diluição foram fervidos em banho maria para evitar a formação de grumos de DNA, assim como descrito por Marques et al. (2007)

#### 4.6.9 Especificidade das Reações em Cadeia da Polimerase

Para especificidade da reação de *M. felis*, DNA dos seguintes microrganismos foram utilizados: *M. felis*, *M. gateae*, *M. simbae*, *M. arginini*, *M. feliminutum*, *M. felifaucium*, *M. leocaptivi*, *M. leopharyngis*, *A. laidlawii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*.

Para especificidade das reações dos hemoplasmas, DNA de gato SPF e dos seguintes microrganismos foram utilizados: Mhf, CMt, Chm, *M. suis*, *B. henselae*, *M. felis*, *M. gateae*, *M. simbae*, *M. arginini*, *M. feliminutum*, *M. felifaucium*, *M. leocaptivi*, *M. leopharyngis*, *A. laidlawii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *E. chaffensis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*.

Para especificidade das reações de *Bartonella* spp e FeLV, DNA de gato SPF e dos seguintes microrganismos foram utilizados: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, CMt, Mhf, CMhm e *E. chaffensis*.

#### 4.6.10 Transformações dos plasmídeos de CMhm e Mhf

Quatro  $\mu\text{L}$  da solução de plasmídeo foram transformados em *E. coli* DH5a competente por meio de choque térmico (30 minutos em gelo, 2 minutos em banho-maria, e 5 minutos em gelo). Meio SOC (Anexo A) foi imediatamente adicionado ao tubo da reação, sendo este incubado sob agitação (150 rpm) a 37 °C por 1,5 hora. Um total de 300  $\mu\text{L}$  foi em seguida semeado em meio sólido Luria Bertani (LB) (Anexo A) contendo ampicilina (50  $\mu\text{g/ml}$ ), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80  $\mu\text{g/ml}$ ) e incubado a 37 °C por 16-24 horas. Colônias brancas recombinantes foram selecionadas e incubadas em 3 mL caldo LB com ampicilina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) por 18 horas a 37 °C sob agitação (250 rpm). Após crescimento bacteriano, 1 mL do meio foi centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm e o sedimento utilizado para realização da extração de DNA plasmidial em pequena escala (miniprep) e purificação.

O protocolo da miniprep foi realizado pelo método de lise alcalina em placas de 96 orifícios (BIRNBOIM; DOLY, 1979; BIRNBOIM, 1983; ENGBRECHT; BRENT; KADERBHAI, 1991). Em seguida, foi purificado em filtro Millipore (MAGVN 2250), conforme as instruções do fabricante (Millipore, São Paulo, Brasil).

#### 4.7 SEQUENCIAMENTOS

Produtos da PCR de FeLV e *Bartonella* spp foram seqüenciados para se determinar a especificidade da reação e a espécie de bartonela detectada, respectivamente, como descritos a seguir.

### 3.7.1 Sequenciamento dos produtos da PCR de FeLV e *Bartonella* spp

Todos os produtos amplificados na PCR para FeLV e *Bartonella* spp a partir do DNA das amostras dos felídeos, incluindo o controle positivo de gato doméstico utilizado na reação de FeLV, foram diretamente seqüenciados nos sentidos senso (“forward”) e antisense (“reverse”). O sequenciamento dos produtos da reação de FeLV foi realizado no Laboratório de Reparo de DNA do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, enquanto que o sequenciamento dos produtos da reação de *Bartonella* spp foram realizados no Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

No Laboratório de Reparo de DNA, aproximadamente 150 µL de cada amplificação para FeLV foram purificados utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Wizard SV gel and PCR purification, Promega Wisconsin, EUA). No Laboratório de Sorologia e Biologia Molecular optou-se por purificar o produto da PCR para *Bartonella* spp a partir do gel de agarose utilizando um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit, GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Ambas as purificações baseiam-se na ligação do produto de PCR a uma coluna de afinidade com posteriores lavagens para retirada de restos de dNTPs, iniciadores e outras substâncias que possam interferir na posterior reação de sequenciamento.

Em ambos os laboratórios, a reação de sequenciamento baseou-se no princípio de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), onde o seqüenciamento do DNA ocorre pela interrupção da cadeia durante sua polimerização no momento em que moléculas análogas aos desoxirribonucleotídeos são incorporadas à cadeia crescente. Tais moléculas são denominadas didesoxirribonucleotídeos e caracterizadas pela ausência do grupo -OH do carbono 3' da desoxirribose. Nestas, o grupo -OH foi substituído por -H, impedindo a ligação fosfodiéster com o próximo desoxirribonucleotídeo. Entretanto, é importante ressaltar que os didesoxirribonucleotídeos competem com os desoxirribonucleotídeos normais presentes no mix de reação, razão pela qual são gerados fragmentos de DNA de tamanhos aleatoriamente diferentes. Dessa forma, o DNA a ser seqüenciado é usado como molde para a síntese “in vitro” de um conjunto de réplicas parciais, todas iniciando no mesmo sítio, mas terminando em diferentes pontos ao longo da cadeia de DNA.

No seqüenciamento das amostras geradas dos PCRs foi utilizado o kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), onde os didesoxirribonucleotídeos apresentam adicionalmente uma molécula fluorescente não-radioativa. Para cada reação, preparou-se um mix contendo o DNA molde (~200 ng), iniciadores específicos (3,2 pmoles), 4 µL de “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (“AmpliTaQ DNA polimerase FS e BigDye terminators”), 4 µL de tampão de seqüenciamento 2,5 X (400 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0) e água q.s.p.. Foram programados 30 ciclos no termociclador, sendo estes constituídos dos seguintes passos: 96 °C por 30 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos, com rampa de 0,7 °C por segundo em cada temperatura.

Para remoção de dNTPs não incorporados, o produto dessa reação foi precipitado a temperatura ambiente utilizando isopropanol e etanol. Primeiramente, 80 µL de isopropanol a 75 % foram adicionados ao produto da reação e incubados em tubo de 1,5 mL por 20 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 25 minutos a 25° C e removeu-se o sobrenadante. Em seguida, 250 µL de etanol 70% foram adicionados ao pellet e o tubo centrifugado novamente a 14.000 rpm por 15 minutos. Removeu-se o sobrenadante, e o pellet foi secado a 95° C durante 5 minutos em bloco seco. O produto precipitado foi resuspenso em água e submetido ao seqüenciador ABI-377 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra foram conferidos manualmente com o programa BioEdit 5.0.6 (HALL, 1999) para correção de erros de interpretação e discrepâncias. A seqüência consenso final foi obtida a partir da formação do alinhamento entre a seqüência senso e o reverso-complemento da seqüência anti-senso de cada amostra utilizando o programa DNASTAR (DNASTAR Inc., Wiscounsín, EUA).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Devido ao baixo número ou ausência de animais positivos para FeLV, hemoplasmas e *M. felis* não houve avaliação estatística relacionada a essas enfermidades.

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS (SAS Institute, North Carolina, EUA) e software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008) e pode ser dividida em

quatro partes: 1) Teste de homogeneidade da população para verificar se o número de machos e fêmeas e o número de NC e de VL possuem diferença estatística na população como um todo e dentro da mesma espécie de felídeo (dados apresentados na descrição da população estudada); 2) Análise da associação entre as espécies de felídeos avaliadas e dados do histórico e avaliação clínica geral (arrancamento de pêlos, anemia, desidratação, hemograma de estresse de captura, leucocitose, leucopenia e histórico de anemia); 3) Análise da associação entre sinais clínicos (anemia, desidratação, leucocitose, leucopenia e histórico de anemia) e infecção para *Bartonella* spp; 4) Análise de fatores de risco (sexo, origem, espécie, histórico de pulgas) associados à infecção por *Bartonella* spp.

Os estudos de associação e ajuste/ homogeneidade da população foram realizados pelo teste exato de Fisher, considerando um intervalo de confiança de 95%. Os dados foram considerados em associação estatística quando  $p < 0.05$ .

No estudo dos fatores de risco para infecção por *Bartonella* spp, os dados foram analisados por meio de regressão logística. Os espécimes de *P. yagouaroundi* (n=3) e *L. geoffroyi* (n=1) foram alocados em uma só variável/grupo (n=4) devido ao baixo número de amostras. As variáveis foram primeiramente consideradas individualmente em análise univariada pelo teste de exato de Fisher e em seguida foram submetidas à análise multivariada pelo método de regressão logística exata. Optou-se pelo intervalo de confiança de 95% e os resultados foram considerados em significância estatística quando  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

### 5.1 HEMOGRAMAS, AVALIAÇÃO GERAL E HISTÓRICO

Os dados considerados de maior importância, levantados durante a contenção dos animais e por análise minuciosa dos hemogramas e históricos arquivados, foram: anemia, hemogramas sugestivos de estresse de captura em decorrência da contenção, desidratação, leucopenia, leucocitose, arrancamento de pêlos, peso, histórico de anemia e histórico de pulgas. Os valores de referências utilizados para os hemogramas e para o peso dos animais foram descritos por Santos (1999c) e Silva e Adania (2006), respectivamente. Hemogramas sugestivos de estresse de captura foram identificados com base na série vermelha, com hematócrito (Ht) acima do intervalo de referência e proteína plasmática total (PPT) dentro dos valores normais. Desidratação foi definida como Ht e PPT acima dos intervalos de referência (BARGER, 2003).

#### 5.1.1 Hemogramas

Os resultados dos hemogramas de acordo com a espécie e sexo dos felídeos encontram-se no apêndice B.

##### 5.1.1.1 Anemia

Três (5,26%) animais estavam anêmicos no momento da coleta: 1 (33,33%) *P. yagouaroundi* e 2 (14,3%) *L. pardalis* (Apêndice B). O valor de Ht da fêmea *P. yagouaroundi* era 40% (intervalo de referência: 41 a 47%) e a PPT era 7,7 g/dL (intervalo de referência: 6,1 a 8,2 g/dL). Os valores de Ht das duas fêmeas anêmicas de *L. pardalis* eram 35% (intervalo de

referência: 39 a 46%) e PPT 7,0 e 9,2 g/dL (intervalo de referência: 6,3 a 8,0 g/dL). Nesse caso, houve associação estatística entre as espécies de felídeos avaliadas e a ocorrência de anemia ( $p = 0,0019$ ).

#### 5.1.1.2 Hemograma sugestivo de estresse de captura durante a coleta

Doze (21,0%) animais apresentaram eritrogramas sugestivos de estresse de captura no momento de coleta: 1 (33,33%) *P. yagouaroundi*, 4 (28,57%) *L. pardalis*, 4 (18,18%) *L. tigrinus* e 3 (17,64%) *L. weidii* (Apêndice B). Não houve associação estatística entre as espécies de felídeos avaliadas e a ocorrência de eritrograma sugestivo de estresse de captura ( $p = 0,7668$ ).

#### 5.1.1.3 Desidratação

Doze (21,0%) animais apresentaram eritrogramas sugestivos de desidratação: 8 (47,05%) *L. weidii*, 2 (14,28%) *L. pardalis* e 2 (9,09%) *L. tigrinus* (Apêndice B). Não houve associação estatística entre as espécies de felídeos avaliadas e a ocorrência de desidratação ( $p = 0,2140$ ).

#### 5.1.1.4 Leucopenia

Dezoito (31,57%) animais apresentaram leucopenia: 2 (66,66%) *P. yagouaroundi*, 12 (70,58%) *L. weidii* e 4 (28,57%) *L. pardalis* (Apêndice B). Os 12 espécimes de *L. weidii* com leucopenia possuíam neutropenia de células segmentadas. Os 2 espécimes de *P. yagouaroundi* possuíam (1) neutropenia de células segmentadas, e (2) neutropenia de células segmentadas e linfopenia. Os 4 espécimes de *L. pardalis* possuíam (1) linfopenia, (2) e (3) neutropenia de células segmentadas, (4) neutropenia de células segmentadas e linfopenia. Nesse caso, houve

associação estatística entre as espécies de felídeos avaliadas e a ocorrência de leucopenia ( $p < 0,0001$ ).

Alguns animais com contagem totais de leucócitos consideradas normais também apresentaram alterações em algumas linhagens celulares do leucograma. Esses incluem: 6 (10,52%) espécimes de *L. tigrinus* com (1) e (2) neutropenia de células segmentadas, (3) e (4) e (5) e (6) linfopenia; e 1 (8,33%) espécime de *L. pardalis* com (1) linfopenia.

Desta forma, o número de felídeos com neutropenia de células segmentadas foi de 20 (35,08%) e com linfopenia foi de 7 (12,28%), independente da presença ou não de leucopenia.

#### 5.1.1.5 Leucocitose

Nove (15,78%) animais apresentaram leucocitose: 5 (22,72%) *L. tigrinus*, 2 *L. weidii* (11,76%) e 2 (14,28%) *L. pardalis* (Apêndice B). Os 5 espécimes de *L. tigrinus* com leucocitose apresentavam (1) eosinofilia e linfocitose, (2) neutrofilia por células segmentadas e bastonetes, e monocitose (3) neutrofilia por células segmentadas (4) neutrofilia por células segmentadas, eosinofilia e monocitose e (5) monocitose. Os dois espécimes de *L. pardalis* possuíam (1) neutrofilia por células segmentadas e (2) linfocitose. Os dois espécimes de *L. weidii* com leucocitose possuíam (1) neutrofilia por células segmentadas, linfocitose e monocitose, e (2) eosinofilia e linfocitose. Não houve associação estatística entre as espécies de felídeos avaliadas e a ocorrência de leucocitose ( $p = 0,83$ ).

Alguns animais com contagem totais de leucócitos consideradas normais também apresentaram alterações em algumas linhagens celulares do leucograma. Esses incluem: 5 (22,72%) espécimes de *L. tigrinus* com (1) eosinofilia, (2) neutrofilia por células segmentadas, (3) neutrofilia por bastonetes, (4) neutrofilia por células segmentadas e eosinofilia e (5) linfocitose; 3 (17,64%) espécimes de *L. weidii* com (1) eosinofilia e monocitose, (2) eosinofilia e (3) linfocitose; e 5 (41,66%) espécimes de *L. pardalis* com (1) linfocitose, (2) eosinofilia e monocitose, (3) neutrofilia por células segmentadas, (4) eosinofilia e linfocitose e (5) linfocitose.

Desta forma, o número de felídeos com neutrofilia por células segmentadas foi de 8 (14,03%), com neutrofilia por bastonetes foi de 2 (3,5%), com eosinofilia foi de 9 (15,78%), com

basofilia foi de zero, com linfocitose foi de 9 (15,78%), e com monocitose foi de 6 (10,52%); independente da presença ou ausência de leucocitose.

Três (3/12 – 25%) felídeos que possuíam eritrograma sugestivo de estresse de captura por contenção também possuíam alterações no leucograma sugestivas de estresse de captura (neutrofilia, linfocitose). Desses, 1 espécime de *L. tigrinus* e 1 espécime de *L. pardalis* apresentavam neutrofilia por células segmentadas (com leucocitose) e 1 espécime de *L. weidii* possuía linfocitose (sem leucocitose).

### 5.1.2 Avaliação geral e histórico

Na avaliação geral, o peso e a ocorrência de arrancamento de pêlos foram anotados, e no histórico clínico, os históricos de anemia e pulgas foram disponibilizados e são descritos a seguir.

#### 5.1.2.1 Peso e arrancamento de pêlos

De acordo com a referência de peso para felídeos neotropicais de Silva e Adania (2006), nenhum animal encontrava-se com peso fora do intervalo de referência. O número de animais com arrancamento de pêlos encontra-se na tabela 2. Observou-se associação estatística entre as espécies de felídeos avaliadas e arrancamento de pêlos ( $p = 0,0025$ ). A figura 1 mostra um animal com área de arrancamento de pêlos em flanco e dorso.

#### 5.1.2.2 Histórico de anemia e presença de pulgas

O número de animais com histórico de anemia e pulgas encontra-se na tabela 2. Não foram observadas associações estatísticas entre as espécies de felídeos avaliadas e o histórico de

pulgas ( $p = 0,07793$ ) ou histórico de anemia ( $p = 0,1016$ ). Durante a coleta, nenhum animal apresentou ectoparasitas, e o histórico de pulgas está estritamente relacionado ao dia de chegada no Refúgio Bela Vista.

Tabela 2 – Relação do número de animais com arrancamento de pêlos, histórico de anemia e histórico de infestação por pulgas de acordo com a espécie de felídeos do Refúgio Bela Vista - Foz do Iguaçu - 2006

<b>Espécie</b>	<b>Arrancamento de pêlos n/%</b>	<b>Histórico de anemia n/%</b>	<b>Histórico de pulgas n/%</b>
<i>L. geoffroyi</i> (n=1)	-	-	-
<i>P. yagouaroundi</i> (n=3)	3 (100 %)	1 (33,3 %)	1(33,3 %)
<i>L. pardalis</i> (n=14)	1 (7,1 %)	1 (7,1 %)	-
<i>L. weidii</i> (n=17)	9 (52,9 %)	6 (35,3 %)	1 (5,8 %)
<i>L. tigrinus</i> (n=22)	5 (22,7 %)	10 (45,4 %)	4 (18,2 %)
<b>Total (n=57)</b>	<b>18 (31,6 %)</b>	<b>18 (31,6 %)</b>	<b>5 (8,8 %)</b>



Figura 1 - Espécime de *L. tigrinus* com arrancamento de pêlos em flanco e dorso durante coleta de amostras - Foz do Iguaçu - 2006

## 5.2 CULTIVO DE MICOPLASMAS

Três (5,26%) das tentativas de isolamento de orofaringe e 5 (8,77%) das tentativas de isolamento de conjuntiva apresentaram contaminação bacteriana e/ou fúngica; sendo impossível

isolar micoplasmas. Foram obtidos 5 (8,8%) isolados de micoplasmas de orofaringe (Figura 2) (um isolado de *L. geoffroyi*, um de *L. weidii*, um de *L. pardalis* e dois de diferentes espécimes de *P. yagouaroundi*) e nenhum de conjuntiva. Todos os micoplasmas isolados evidenciaram a hidrólise de arginina alcalinizando o caldo SP4. As colônias possuíam aspecto de “ovo frito”, mas não apresentaram filmes e manchas. Esses isolados foram submetidos à PCR para *Mollicutes*, sendo positivos para a mesma.

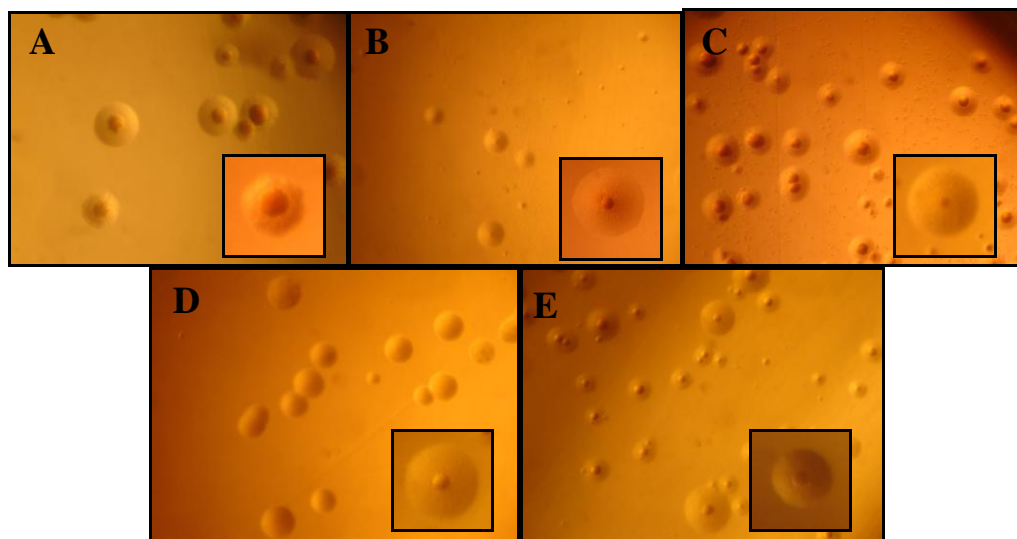


Figura 2 – Colônias de mycoplasma spp em ágar SP4 obtidas dos felídeos selvagens (10 X). Isolados de suabe de orofaringe de: (A) *Leopardus geoffroyi* - espécime 01. (B) *Puma yagouaroundi* – espécime 02. (C) *L. weidii* – espécime 05. (D) *L. pardalis* – espécime 16. (E) *P. yagouaroundi* – espécime 36 - São Paulo - 2008

### 5.3 LIMITE DE DETECÇÃO DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

O limite de detecção do DNA de *M. felis* na PCR desenvolvida foi de 100 fg. Considerando que o genoma do *M. felis* possui cerca de 1,0 Mb, a PCR desenvolvida foi capaz de detectar aproximadamente 100 microrganismos.

O limite de detecção para as reações de hemoplasmas foi de 0,5 plasmídeos para Mhf e CMhm (Figura 3).

Na reação para detecção de DNA proviral de FeLV, houve amplificação até a quantidade de 1  $\eta$ g ( $10^{-3}$ ) de DNA de gato doméstico, correspondendo a 166 células diplóides de gatos contendo DNA proviral no seu genoma (MIYAZAWA; JARRETT, 1997).

Considerando o tamanho genômico de aproximadamente 2,0 Mb para *B. henselae* (MARUYAMA et al., 2001), o limite de detecção de DNA de *Bartonella* spp foi correspondente a aproximadamente 1 microrganismo.

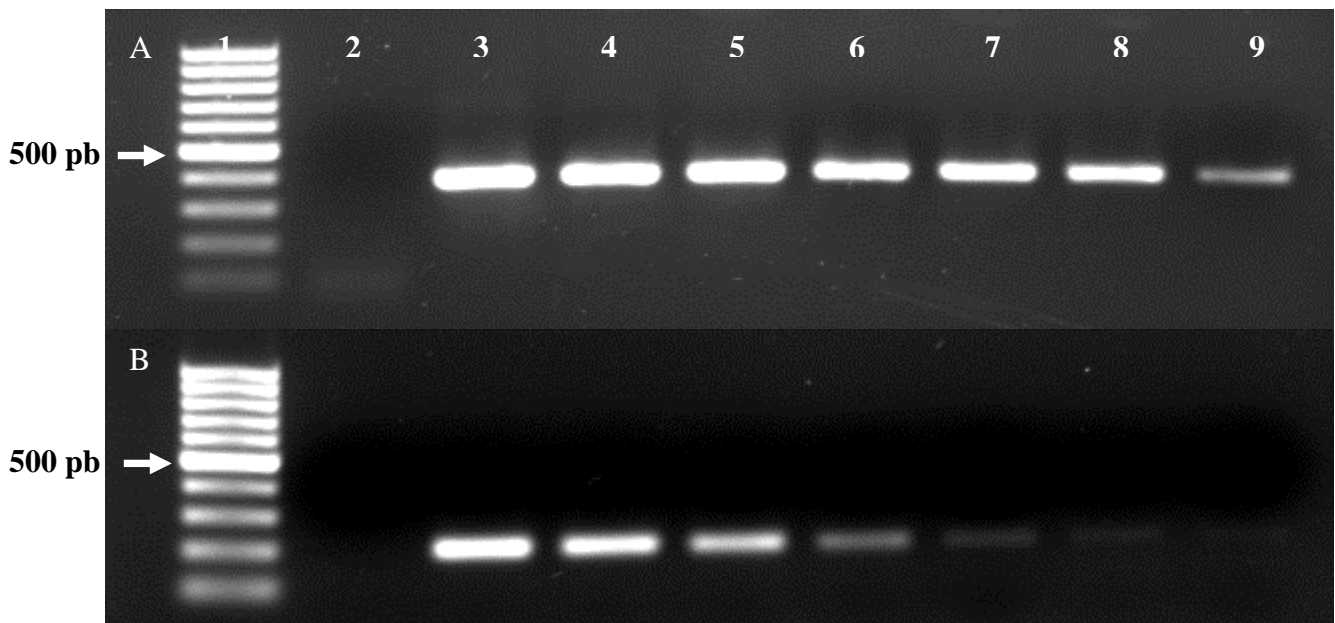


Figura 3 - Gel de agarose com brometo de etídeo apresentando amplificações parciais do gene 16S ribossomal RNA para (A) *M. haemofelis* - 393 pb e (B) "*Candidatus M. haemominutum*" - 192 pb, indicando o limite de detecção de cada técnica. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle negativo - água. Cópias de plasmídeos: 3) 500 mil 4) 50 mil 5) 5 mil 6) 500 7) 50 8) 5 9) 0,5 - São Paulo - 2008

#### 5.4 ESPECIFICIDADE DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

Não houve reação cruzada com o DNA dos microrganismos utilizados no teste de especificidade. Os iniciadores foram, portanto, considerados específicos na obtenção dos resultados.

## 5.5 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

Os resultados dos agentes infecciosos pesquisados que apresentaram positividade, de acordo com a numeração individual dos animais mantidos no Refúgio Bela Vista, estão listados no apêndice C.

### 5.5.1 PCR para detecção de *Mollicutes*

Cinquenta e três (93%) amostras de orofaringe e 27 (47,36%) amostras de conjuntiva ocular foram positivas a PCR na detecção de *Mollicutes*. Um total de 2 (66,66%) *P. yagouaroundi*, 1 (100%) *L. geoffroyi*, 22 (100%) *L. tigrinus*, 15 (88,23%) *L. weidii* e 13 (92,85%) *L. pardalis* amplificaram o DNA alvo esperado nas amostras de orofaringe. No caso das amostras de conjuntiva ocular positivas a PCR, 2 (66,66%) eram de *P. yagouaroundi*, 1 (100%) era de *L. geoffroyi*, 10 (45,45%) eram de *L. tigrinus*, 9 (52,9%) eram de *L. weidii* e 5 (35,71%) eram de *L. pardalis*.

### 5.5.2 Desenvolvimento e padronização da PCR para *M. felis*

As concentrações de  $MgCl_2$  e quantidade de iniciadores testadas em reações independentes na PCR resultaram em produtos de amplificação satisfatórios para *M. felis*. Primeiramente, optou-se pela concentração de 2,0 mM de  $MgCl_2$  e 35 pmol de iniciadores, por meio da observação da intensidade de banda e “primer dimers”. No teste da temperatura de anelamento (Figura 4), optou-se pela temperatura mais alta sem alterar a intensidade da banda. Quanto ao volume da reação, um volume de 25  $\mu$ L apresentou resultados mais satisfatórios.



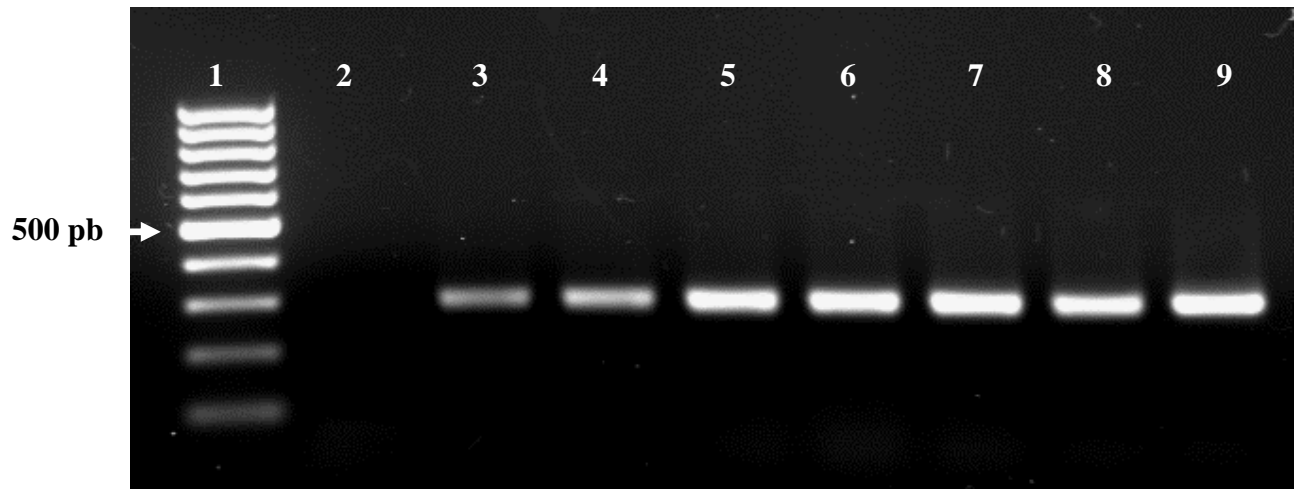


Figura 4 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando ampliações de 299 pb do gene 16S ribossomal RNA do *Mycoplasma felis* em diferentes temperaturas de anelamento. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle negativo – água. Temperatura de anelamento: 3) 55°C 4) 55,9°C 5) 56,8°C 6) 57,9°C 7) 59,2°C 8) 60,5°C 9) 61,9°C - São Paulo - 2008

Ao analisar os DNAs extraídos de amostras de orofaringe e conjuntiva, nenhuma amostra amplificou o produto esperado de *M. felis* (Figura 5).

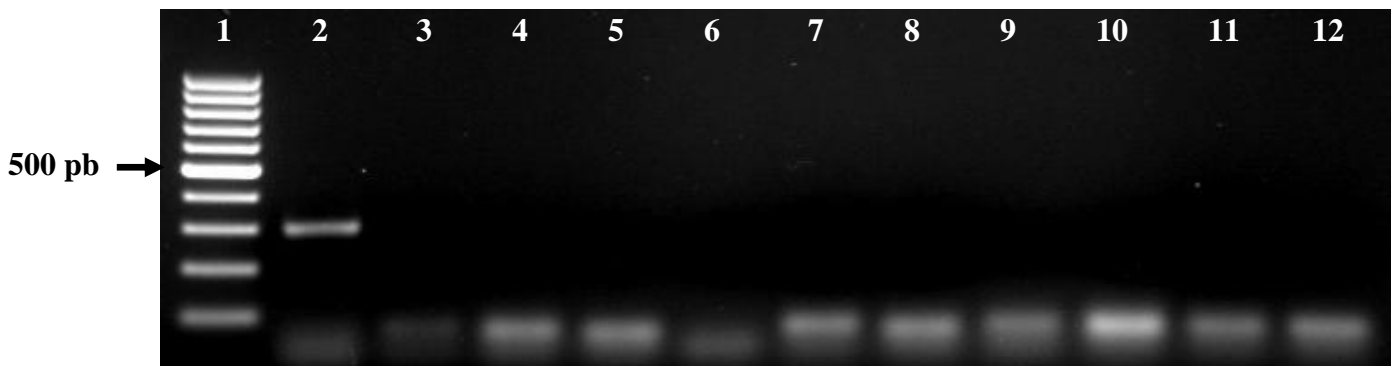


Figura 05 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando ampliações de 299 pb do gene 16S ribossomal RNA do *Mycoplasma felis*. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle positivo 3) controle negativo - água 4 a 12) amostras de orofaringe de pequenos felídeos neotropicais- São Paulo - 2008

### 5.5.3 PCR para gene interno

Todas as amostras apresentaram produto do tamanho esperado para detecção de GAPDH, conferindo a eficácia da extração de DNA do sangue total.

### 5.5.4 PCR para detecção de Hemoplasmas

Apenas 1 (1,7%) animal foi positivo para detecção de DNA de Mhf (Figura 6); um macho de *L. wiedii* nascido em cativeiro em maio de 2000. Este animal não apresentou alterações hematológicas por ocasião da coleta, mas é relatado em seu histórico a presença de anemia em agosto de 2002 [Ht 37% (intervalo de referência: 40% a 51%), PPT 8,0 g/dL (intervalo de referência: 6,13 g/dL a 7,55 g/dL)].

Não houve amostras positivas a PCR na detecção de CMhm.

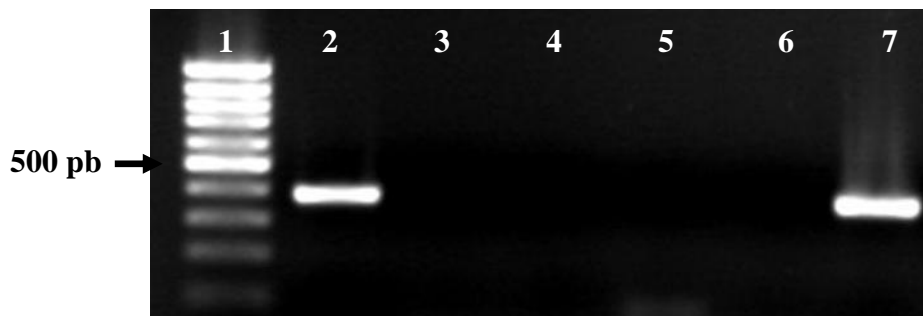


Figura 6 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando amplificações de 393 pb do gene 16S ribossomal RNA do *Mycoplasma haemofelis*. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle positivo 3) controle negativo - água 4) amostra de *Leopardus geoffroyi* 5) amostra de *P. yagouaroundi* 6) amostra de *L. wiedii* 7) amostra de *L. wiedii* (animal 03) - São Paulo - 2008

### 5.5.5 PCR para detecção de FeLV

Apenas duas (3,5%) amostras foram positivas a detecção de DNA proviral de FeLV: um macho, adulto, nascido em cativeiro, *L. pardalis*; e uma fêmea, adulta, nascida em cativeiro, *L. tigrinus*. Ambos os animais apresentavam hemograma sugestivo de discreta desidratação [*L. tigrinus*: Ht 45% (intervalo de referência: 37% a 44%), Eritrócitos  $11.07 \cdot 10^6/\text{mm}^3$  (intervalo de referência:  $5.48 \cdot 10^6/\text{mm}^3$  a  $7.96 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ ), PPT 7.8g/dL (intervalo de referência: 5.8 g/dL a 7.6 g/dL); *L. pardalis*: Ht 46% (intervalo de referência: 33.4% a 44.8%), Hemoglobina 16.6 g/dL (intervalo de referência: 11.6 g/dL to 14.8 g/dL), PPT 8.2 g/dL (intervalo de referência: 7.0 g/dL a 8.2g/dL)], e o espécime de *L. tigrinus* apresentou linfocitose [ $3474/\text{mm}^3$  (intervalo de referência:  $907/\text{mm}^3$  a  $2679/\text{mm}^3$ )] (SANTOS, 1999c). Adicionalmente, o espécime de *L. pardalis* possui sinais de leve ataxia não progressiva dos membros anteriores de causa desconhecida desde o nascimento.

### 5.5.6 PCR para detecção de *Bartonella* spp

Nove (15,8%) animais foram positivos a reação para detecção de DNA de *Bartonella* spp: 1 (33,33%) *P. yagouaroundi*, 1 (100%) *L. geoffroyi*, 3 (13,6%) *L. tigrinus*, 3 (17,6%) *L. weidii* e 1 (7,1%) *L. pardalis*. Todos os produtos obtidos possuíam aproximadamente 635 pb (Figura 7). Todos os animais positivos eram machos, 6 (66,6%) eram oriundos de vida livre, 1 (11,1%) animal estava anêmico, 2 (22,2%) estavam desidratados, 4 (44,4%) apresentavam leucopenia, 2 (22,2%) possuíam histórico de anemia e 1 (11,1%) possuía histórico de presença de pulgas.

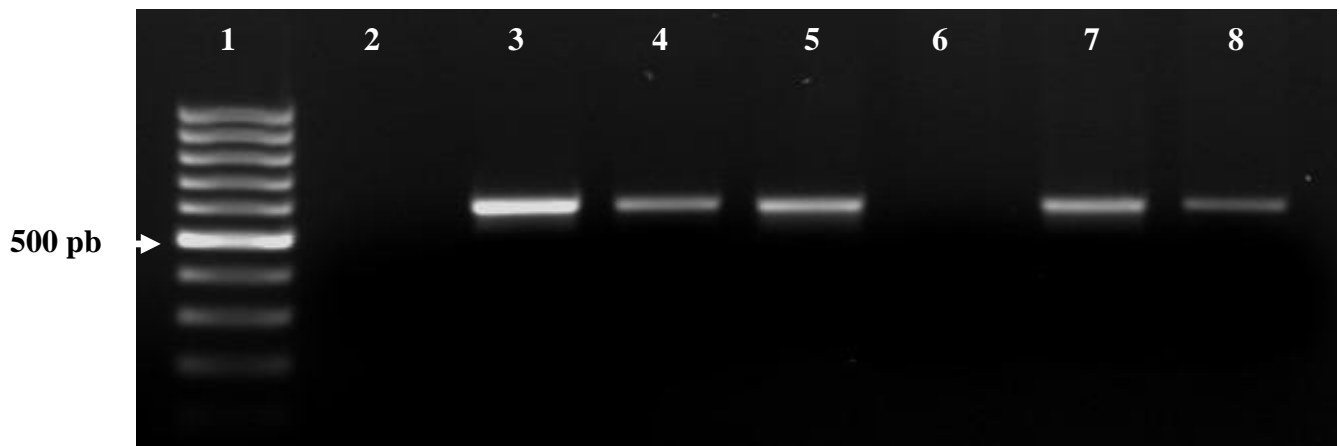


Figura 7 - Gel de agarose com brometo de etídeo indicando amplificações do espaço intergênico dos genes 16SrRNA e 23SrRNA de *Bartonella* spp. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb 2) controle negativo - água 3) controle positivo (*Bartonella henselae*) 4) amostra 01 (*Leopardus geoffroyi*) 5) amostra 02 (*Puma yagouaroundi*) 6) amostra 03 (*L. wiedii*) 7) amostra 04 (*L. weidii*) 8) amostra 05 (*L. weidii*) - São Paulo - 2008

#### 5.6 SEQUENCIAMENTO DE FeLV E *Bartonella* spp

Os produtos de PCR da reação de FeLV apresentaram mais de 99% de similaridade quando alinhado com o fragmento correspondente do genoma completo de FeLV de gato doméstico (GenBank, número de acesso NC 001940), confirmando a especificidade da reação.

Os nove produtos da PCR provenientes das amostras dos felídeos selvagens apresentaram de 99 a 100% de similaridade com o fragmento correspondente do genoma completo da *Bartonella henselae* Houston-1 (GenBank, número de acesso NC 005956).

#### 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA INFECÇÃO POR *Bartonella* spp

Os resultados da análise da associação entre sinais clínicos e *Bartonella* spp e dos fatores de risco para infecção por esse microrganismo são apresentados a seguir.

### 5.7.1 Alterações hematológicas e *Bartonella* spp

Não houve associação estatística entre os sinais clínicos avaliados e a infecção por *Bartonella* spp ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3). Apesar da chance de encontrar animais positivos ser aproximadamente duas vezes maior no grupo de animais anêmicos quando comparados ao grupo de animais não anêmicos, não houve evidências estatísticas para associar anemia à infecção por *Bartonella* spp ( $p = 0,5074$ ). A chance de encontrar animais positivos para *Bartonella* spp dentro do grupo de animais com desidratação, leucocitose, leucopenia e histórico de anemia é menor quando comparado ao grupo de animais sem desidratação, sem leucocitose, sem leucopenia e sem histórico de anemia (odds ratio = 0,92; 0,0; 0,57 e 0,57; respectivamente). Adicionalmente, não foi possível observar evidências estatísticas para associar esses 4 alterações hematológicas à infecção por *Bartonella* spp ( $p = 1,00$ ; 0,3279; 0,4628 e 0,7041; respectivamente).

Tabela 3 – Resultado da associação entre positividade para *Bartonella* spp e sinais clínicos dos felídeos selvagens do Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu, utilizando o teste de Fisher - São Paulo - 2008

Variável	Número de animais <i>Bartonella</i> spp positivo (%)	Número de animais <i>Bartonella</i> spp negativo (%)	Odds ratio	Intervalo de confiança (95%)	Valor de p
<b>Anemia</b>					
Presente	1 (11,11%)	2 (4,16%)	1,85	0,031-26,69	$p = 0,5074$
Ausente	8 (88,88%)	46 (95,83%)	1,00		
<b>Desidratação</b>					
Presente	2 (22,22%)	10 (20,83%)	0,92	0,095-7,03	$p = 1,000$
Ausente	7 (77,77%)	38 (79,17%)	1,00		
<b>Leucocitose</b>					
Presente	0 (0%)	9 (18,75%)	0,0	0,00 – 2,71	$p = 0,3279$
Ausente	9 (100%)	39 (81,25%)	1,0		
<b>Leucopenia</b>					
Presente	4 (44,44%)	15 (31,25%)	0,57	0,30-9,43	$p = 0,4628$
Ausente	5 (55,55%)	33 (68,75%)	1,00		
<b>Histórico de anemia</b>					
Presente	2 (22,22%)	16 (33,33%)	0,57	0,52-3,52	$p = 0,7041$
Ausente	7 (77,77%)	32 (66,66%)	1,00		

### 5.7.2 Análise univariada dos fatores de risco

A análise univariada pelo teste de Fisher indicou que a variável sexo é fator de risco para infecção por *Bartonella* spp ( $p = 0,0005$ , IC 95% = 2,79 – infinito). As variáveis origem, histórico de pulgas e espécie não apareceram estatisticamente associadas ( $p > 0,05$ ; IC inclui o valor 1).

### 5.7.3 Análise multivariada dos fatores de risco

Os resultados da regressão logística multivariada exata encontram-se na tabela 4. A chance de positividade para *Bartonella* spp é 14,7 vezes maior entre machos do que entre fêmeas. Foi encontrada evidência estatística para rejeitar a hipótese de que a chance para infecção é igual para os dois sexos ( $p = 0,003$ ).

No presente estudo, a chance de um animal oriundo de vida livre ser infectado por *Bartonella* spp é 1,5 vezes maior quando comparado aos animais nascidos em cativeiro, mas essa associação não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,887$ ). Da mesma maneira, o histórico de pulgas não se evidenciou associado à infecção por *Bartonella* spp ( $p = 1,00$ ), mas animais sem histórico de pulgas têm 2,42 vezes mais chances de serem infectados pelo agente.

A chance de positividade pela PCR para *Bartonella* spp entre felídeos das espécies *P. yagouaroundi* e *L. geoffroyi* é 5,1 vezes maior que a chance para aqueles da espécie *L. tigrinus*, 4,7 vezes maior que a chance para aqueles da espécie *L. pardalis*, e 2,7 vezes maior que a chance para aqueles da espécie *L. wiedii*; porém, essas associações não foram estatisticamente significantes ( $p = 0,50$ ,  $p = 0,65$  e  $p = 0,90$  respectivamente).

Tabela 4 – Resultados da regressão logística multivariada exata para análise de fatores de risco para infecção por *Bartonella* spp - São Paulo - 2008

<b>Característica</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Sexo</b>			
Macho x Fêmea	14,7		
Fêmea	1,00	0,00 – 0,451	0,0028
<b>Origem</b>			
VL x NC	1,5		
NC	1,00	0,079 – 4,559	0,8878
<b>Histórico de pulgas</b>			
Sim x Não	0,412		
Não	1,00	0,004 – 43,796	1,00
<b>Espécie</b>			
<i>P. yagouaroundi</i> e <i>L. geoffroyi</i>	1,00		
<i>L. tigrinus</i>	0,195	0,003 – 5,169	0,5030
<i>L. pardalis</i>	0,211	0,002 – 7,315	0,6490
<i>L. weidii</i>	0,377	0,005 – 9,868	0,8999

## 6 DISCUSSÃO

Dentre os objetivos do presente estudo, acreditava-se que a presença de agentes infecciosos nos felídeos poderia estar relacionada aos dados clínicos do histórico e do momento da coleta. Entretanto, de maneira geral, não houve associação direta dos microrganismos detectados com sinais clínicos, alterações hematológicas ou dados dos históricos. Foi possível apenas supor que alguns dados, como o histórico de anemia no espécime acometido por Mhf, poderiam estar relacionados às doenças pesquisadas. Porém, algumas características observadas durante a coleta sugerem que esses animais são acometidos por fatores que merecem ser pesquisados, como arrancamento de pêlos e outras causas que poderiam levar às alterações hematológicas.

O presente estudo não teve como objetivo analisar episódios de arrancamento de pêlos; entretanto, a alta frequência observada, principalmente em espécimes de *L. weidii*, indica a existência de uma alteração comportamental importante e persistente, uma vez que foi relatada anteriormente por Moreira (2001). O arrancamento de pêlos é frequentemente descrito em humanos, macacos, camundongos, cobaias, coelhos, carneiros, cães e gatos (REINHARDT, 2005). Denominado tricotilomania em humanos, é uma desordem comportamental caracterizada por repetitivos arrancamentos de pêlos do couro cabeludo, sobrancelhas, cílios, e/ou região púbica (REINHARDT, 2005; CHAMBERLAIN et al., 2007). Imediatamente antes do arrancamento, a pessoa sente-se tensa, e após o ato, ocorre uma sensação de prazer, alívio e gratificação (CHAMBERLAIN et al., 2007).

A etiologia do arrancamento de pêlos é pouco conhecida, mas alterações gênicas em camundongos e em humanos já foram reportadas (COHEN et al., 1995; GREER; CAPECCHI, 2002). Acredita-se que a tricotilomania em humanos faça parte de uma família de desordens mentais que incluem o transtorno obsessivo-compulsivo (CHAMBERLAIN et al., 2006). Por ser assim classificada, torna-se razoável assumir que os animais sofram distúrbios psicogênicos similares aos humanos, que são conseqüentemente aliviados pela sensação prazerosa do arrancamento de pêlos como reportada por humanos acometidos (REINHARDT, 2005).

O arrancamento de pêlos ocorre em animais mantidos em ambientes artificiais, de confinamento (REINHARDT, 2005), como o observado no presente estudo. Tédio, ansiedade,



depressão e exposição crônica a estressores ambientais são fatores de risco para o desenvolvimento desse comportamento, que mostra grandes similaridades com a tricotilomania (REINHARDT, 2005). A escassez de pesquisas quanto sua etiologia e tratamento em animais selvagens dificultam a prevenção desse tipo de comportamento. No caso dos animais do Refúgio Bela Vista, torna-se imprescindível a pesquisa das causas de estresse psíquico, mesmo que o “cativeiro” pareça ser o principal desencadeador desse tipo de comportamento. Os veterinários do Refúgio Bela Vista relatam que o manejo mais intenso, principalmente durante o verão, aumenta o número de animais acometidos. É comum, por exemplo, após o corte de grama a redor dos recintos, aumentar o número de ocorrências desse comportamento. Alguns desses arrancamentos evoluem para feridas que necessitam intervenção médica e são de difícil recuperação. Estudos em bem estar animal poderão auxiliar no entendimento e prevenção desses episódios.

Em geral, o hemograma auxilia o diagnóstico de diversas doenças metabólicas e infecciosas. Entretanto, seu uso em animais selvagens é dificultado devido à escassez e variabilidade dos valores de referência celulares. Apesar dos felídeos selvagens estarem entre os animais selvagens mais pesquisados do Brasil (IBAMA, 2004), poucos são os estudos sobre valores de referências hematológicas. Além da espécie, fatores como contenção física e química, local e dificuldade de obtenção de animais saudáveis, interferem na definição de valores considerados normais (FULLER; KERR; KARNS, 1985; KOCAN; BLOUIN; GLENN, 1985; WEAVER; JOHNSON, 1995; MARCO et al., 2000). No entanto, Santos (1999c) desenvolveu, durante cerca de 20 anos, valores de referência hematológica para as espécies animais mantidas no Refúgio Bela Vista. Com esses valores, desenvolvidos no Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, tornou-se possível utilizar o hemograma como ferramenta diagnóstica para os felídeos mantidos em cativeiro nesse local. Desta forma, o presente estudo utilizou-se desses valores para analisar os hemogramas realizados.

Foi possível observar que, apesar de apenas três (5,26%) animais apresentarem anemia no momento da coleta, cerca de 30% dos animais possuem histórico de anemia durante a vida em cativeiro. Mesmo com a baixa frequência de hemoplasmas e FeLV, outras causas infecciosas não podem ser descartadas. Porém, desordens metabólicas e nutricionais podem ser responsáveis por essa alteração. A avaliação hematológica no momento da coleta indicou anemia em uma jaguatirica (*L. pardalis*), que posteriormente veio a óbito por um tumor renal possivelmente causador do baixo hematócrito. Apesar da anemia ter sido associada a espécie de felídeo ( $p=$

0,0019), esse achado deve ser interpretado cautelosamente. O baixo número de amostras e a ocorrência de células com valor zero na tabela de contingência da análise estatística podem influenciar no valor de p. Não é possível afirmar que anemia estava associada a *P. yagouaroundi* ou *L. pardalis* no momento da coleta; mesmo porque o histórico de anemia não apareceu associado estatisticamente à espécie de felídeos ( $p = 0,1016$ ) e ocorreu com maior frequência em *L. tigrinus*.

Hemogramas sugestivos de estresse de captura foram observados em 12 (21%) animais. Apesar de JAIN (1993) citar que o gato possui um pool marginal de neutrófilos três vezes maior que o circulante, apenas 2 desses animais apresentavam leucocitose por neutrofilia (indicativo de estresse de captura). Hemogramas sugestivos de estresse de captura são frequentemente reportados em animais selvagens, inclusive felídeos, dificultando a avaliação clínica de espécimes (FULLER; KERR; KARNS, 1985; KOCAN; BLOUIN; GLENN, 1985; JAIN, 1993; WEAVER; JOHNSON, 1995; MARCO et al., 2000). Assim, devido à alta frequência dessa característica, sugere-se, em um próximo estudo, que novas medidas de contenção sejam avaliadas, como por exemplo, substituir o puçá pelos dardos anestésicos.

A desidratação foi observada em 21% dos animais e não foi associada à espécie de felídeos. Essa característica alerta para cuidados na disponibilidade de água fresca e potável, controle de temperatura de recintos e fatores estressantes que possam interferir na ingestão de água.

Dentre as principais causas de leucocitose por neutrofilia em animais destacam-se: a inflamação, reposta a liberação de glucocorticóides (estresse e hiperadrenocorticismos), resposta a liberação de catecolaminas e neoplasias (STOCKHAM; KEETON; SZLADOVITS, 2003). Apesar de 14,03% (8/57) dos felídeos avaliados apresentarem neutrofilia de células segmentadas, apenas 2 desses animais possuíam eritrograma sugestivo de estresse de captura/liberação de catecolaminas. Não foi possível justificar a razão pela qual outros animais apresentaram neutrofilia de células segmentadas ou bastonetes. Entretanto, devido ao alto índice de estresse em cativeiro (evidenciado pela ocorrência de arrancamento de pêlos), sugere-se que a liberação de glucocorticóides em estresse crônico seja um fator contribuinte para essa alteração (BLECHA, 2000). No entanto, não foi possível associar estatisticamente a ocorrência de arrancamento de pêlos com a presença de leucocitose ou neutrofilia no momento da coleta (dado não apresentado).

Outras alterações observadas em leucograma foram: eosinofilia (15,78%), linfocitose (15,78%) e monocitose (10,52%). A eosinofilia possui seis causas principais em gatos domésticos: desordens de hipersensibilidade, parasitismo (ecto e endoparasitas), desgranulação de mastócitos causadas por inflamação (cutânea, respiratória, intestinal, genital e urinária), neoplasia de mastócitos, hipoadrenocorticismo e neoplasia eosinofílica (leucemia eosinofílica e eosinofilia paraneoplásica) (STOCKHAM; KEETON; SZLADOVITS, 2003). Devido à ausência de ectoparasitas nos animais durante a coleta, a possibilidade de eosinofilia por esses agentes e reação de hipersensibilidade a dermatite por pulgas é remota. Devido à descrição de endoparasitas nos animais do Refúgio (SANTOS, 1999b), acredita-se que esse parasitismo seja o responsável pela alteração no leucograma. Desordens neoplásicas ou de hipoadrenocorticismo não podem ser desconsideradas.

Dentre as principais causas de linfocitose em gatos domésticos destacam-se a inflamação crônica (infecções bacterianas, especialmente riquetsias; infecções fúngicas sistêmicas; infecções virais; e protozoários, especialmente a babesia), liberação de catecolaminas, neoplasia e hipoadrenocorticismo (STOCKHAM; KEETON; SZLADOVITS, 2003). Dentre os 9 animais com linfocitose, apenas 1 (11,11%) possuía eritrograma sugestivo de estresse de captura/liberação de catecolaminas. Outras causas de linfocitose devem ser pesquisadas, como infecções por riquetsias e babesia. Adicionalmente, o espécime de *L. tigrinus* positivo para FeLV apresentou uma leve linfocitose.

Dentre as principais causas de monocitose em gatos domésticos destacam-se a inflamação, liberação de glucocorticóides (estresse crônico, hiperadrenocorticismo), neoplasia (monocítica ou leucemia mielomonocítica), secundário a neutropenia imune e hematopoiese cíclica (STOCKHAM; KEETON; SZLADOVITS, 2003). Metade dos casos de monocitose (3 = 50%) do presente estudo foram acompanhados de neutrofilia, que normalmente ocorre em casos de inflamação ou liberação de glucocorticóides (STOCKHAM; KEETON; SZLADOVITS, 2003). Outros dois casos foram acompanhados de eosinofilia e o outro foi a única alteração encontrada. Importante ressaltar que cerca de 23% dos gatos domésticos infectados com FIV apresentam monocitose (SPARKES et al., 1993) e essa doença não foi avaliada.

A leucopenia foi estatisticamente associada à espécie de felídeos e observada em 18 (31,57%) animais, incluindo 12 (70,58%) espécimes de *L. weidii*. Um total de 19 (33,33%) animais apresentaram neutropenia por células segmentadas (com ou sem leucopenia), incluindo

os 12 espécimes de *L. weidii* com leucopenia. Os 12 machos e fêmeas *L. weidii* com leucopenia apresentaram uma média de contagem de leucócitos de 5691,6 (+/- 1168,5) e 5791,6 (+/-1235) (Apêndice B), respectivamente (intervalo de referência: 7500 a 11900 leucócitos /mm<sup>3</sup>). Esse resultado indica a importância do estudo de outras causas infecciosas, além de FeLV, para leucopenia/neutropenia; como vírus da Panleucopenia e FIV (BROWN; ROGERS, 2001); mas também indica uma possível reavaliação dos valores de referência hematológicos para *L. weidii*, uma vez que esses animais, em sua maioria, não apresentam sinais clínicos evidentes, e os casos de mortalidade são baixos segundo Moraes<sup>1</sup> (2007) (informação verbal).

A linfopenia foi observada em 7 (12,28%) felídeos do presente estudo. Dentre as principais causas dessa alteração em gatos domésticos destacam-se: inflamação aguda (por infecção viral ou bacteriana, e endotoxemia), depleção (efusão linfocítica – quilotórax, cardiomiopatia, neoplasias etc), ou hipoplasia ou aplasia linfóide (drogas imunossupressivas, destruição de tecidos linfóides por linfomas ou linfadenite generalizada). Os animais com essa anormalidade deveriam ser novamente avaliados para se observar cursos de infecções agudas, se existentes, ou, inclusive linfomas.

Apesar de várias alterações hematológicas terem sido observadas nos animais do presente estudo, o hemograma apenas auxilia no diagnóstico de infecções ou alterações metabólicas. No momento da coleta, nenhum animal apresentou sinais clínicos para ser acompanhado futuramente (com exceção de um *P. yagouaroundi* que apresentou uma fístula periorbital por problemas odontológicos – dado não apresentado). Entretanto, o monitoramento deve ser constante, principalmente pela dificuldade de avaliação dos sinais clínicos em animais selvagens. Alterações hematológicas em felídeos selvagens podem possuir causas diferentes das citadas em gatos domésticos, e, desta forma, um hemograma torna-se imprescindível no estudo de doenças em felídeos selvagens; para que futuramente seja possível associar alterações hematológicas com infecções por microrganismos nesses animais.

Os felídeos avaliados não apresentaram ectoparasitas no momento da coleta. Isso é resultado do ótimo programa de controle de ectoparasitas realizado pelo Refúgio Bela Vista, tanto durante a quarentena, quanto no cativeiro definitivo. Ao contrário disto, um outro estudo realizado em 22 zoológicos do Estado de São Paulo relatou uma ocorrência de infestações por pulgas *Ctenocephalides felis* em 30% dos animais (ADANIA et al., 1998). Nesse caso, a infestação excessiva desencadeou anemias intensas e conseqüentes óbitos.

<sup>1</sup> Informação fornecida por Moraes em campanha de coleta de amostras de capivaras no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu, 2007.

Adania et al. (1998) verificaram que 21% dos gatos do mato pequenos apresentavam peso abaixo do ideal e 29,2% das jaguatiricas estavam obesas nos zoológicos de São Paulo. Devido ao abrangente intervalo de referência para “peso” citado por Silva e Adania (2006), alguns animais do presente estudo podem estar em condições físicas insatisfatórias. Verifica-se uma carência em valores de referência para essa característica em felídeos neotropicais no Brasil. O Centro Brasileiro para Conservação de Felinos Neotropicais da Associação Mata Ciliar estabeleceu um escore corporal de 1 a 5 (caquexia, magreza, normalidade, tendência a obesidade, e obesidade) que pode ser utilizado na avaliação de felídeos. Entretanto, no presente estudo esse método não se mostrou eficaz devido à variação de observação individual entre os voluntários (alunos de veterinária da Universidade Federal do Paraná) (dado não apresentado).

Esse é o primeiro levantamento realizado sobre micoplasmas parasitas de mucosa em pequenos felídeos neotropicais. Nesse caso, obtiveram-se 5 isolados de *Mycoplasma* spp de 4 espécies de felídeos (*L. pardalis*, *L. geoffroyi*, *L. weidii* e *P. yagouaroundi*). Por outro lado, *M. felis* não foi detectado nas amostras clínicas avaliadas, e os felídeos do presente estudo provavelmente estavam livres do agente no momento da coleta.

No presente estudo, a ausência de isolamento de *Mycoplasma* spp da conjuntiva está de acordo com outros relatos da literatura, que varia de zero a 27,4% (TAN; MILES, 1974; FILHO, 1977; TAN; LIM; ISHAK, 1977; SHEWEN; POVEY; WILSON, 1980; HAESEBROUCK et al., 1991). Vários relatos descrevem a ausência de isolados *Mycoplasma* spp da conjuntiva de animais sadios (SHEWEN; POVEY; WILSON, 1980; HAESEBROUCK et al., 1991; GIONFFRIDO et al., 1991; GRASBON; MIÑO DE KASPAR; KLAUSS, 1994; DAVIDSON et al., 1994; DAVIDSON et al., 1999; PINARD et al., 2002) e acredita-se que o baixo número de células bacterianas viáveis coletadas por um suabe nesse sítio dificulte o isolamento desses microrganismos. Desta maneira, pode-se justificar em parte a ausência de cultivo destes microrganismos da conjuntiva dos animais do presente estudo.

Verifica-se na literatura que o cultivo foi o único método utilizado para o diagnóstico, que é menos sensível que métodos moleculares. Como observado por Pinard et al. (2002) em amostras conjuntivais de gambás (*Didelphis virginiana*) e guaxinins (*Procyon lotor*), a PCR para *Mollicutes* é mais sensível do que as técnicas de cultivo. Recentemente, Low et al. (2007) utilizou a PCR para detectar *Mycoplasma* spp em suabes de conjuntiva de gatos domésticos e apenas 2,6% (1/39) dos animais sadios apresentaram resultado positivo, enquanto que 16,5% (9/55) dos

animais com conjuntivite ativa apresentaram DNA de micoplasma. No presente estudo, 47,36% dos suabes de conjuntiva mostraram resultados positivos a PCR para *Mollicutes*, e os animais não apresentavam alteração ocular no momento da coleta. Apenas um espécime, uma fêmea de *L. pardalis*, mostrou histórico de conjuntivite em 2002 (dado não apresentado). A alta frequência de detecção de *Mollicutes* em suabes oculares nesse estudo pode ser explicada por diversos fatores; dentre eles, a presença de *Ureaplasma* spp e *Acholeplasma* spp, a diferença entre espécies animais, e pelo modo de coleta dos suabes. Os animais do presente estudo foram anestesiados para coleta de amostras, e o suabe foi firmemente passado várias vezes sobre a mucosa conjuntival e em movimentos horizontais. Por outro lado, as amostras utilizadas por Low et al. (2007) foram coletadas de animais não sedados e por diferentes profissionais.

Ainda no presente estudo, o isolamento de micoplasmas da orofaringe dos felídeos selvagens foi baixo quando comparado a relatos em animais domésticos (TAN; MILES, 1972; TAN; MILES, 1974; TAN; LIM; ISHAK, 1977; RANDOLPH et al., 1993). Entretanto, a frequência de amostras positivas na PCR para *Mollicutes* é comparável a esses estudos, mostrando, mais uma vez, a maior sensibilidade da técnica quando comparada ao cultivo.

Embora *M. felis* não tenha sido detectado nas amostras dos felídeos selvagens, não é possível afirmar que esse microrganismo não possa ser encontrado em felídeos neotropicais. Como a frequência de isolamento desse agente é maior em animais doentes, felídeos com alterações clínicas devem ser investigados. Entretanto, a frequência de *M. felis* em animais sadios e a descrição desse microrganismo como agente primário de doenças em felídeos permanecem desconhecidas. As condições necessárias para o estabelecimento de infecção conjuntival e subsequente multiplicação bacteriana não são descritas (HAESEBROUCK et al., 1991), mas a inoculação experimental levou a severa doença respiratória e ocular em filhotes de gatos domésticos (TAN, 1974; HAESEBROUCK et al., 1991). Porém, filhotes são conhecidos por apresentarem sistema imune em desenvolvimento que pode não prevenir a infecção e/ou o desenvolvimento de doença clínica. Assim, o isolamento de *M. felis* em animais sadios (BLACKMORE; HILL; JACKSON, 1971; TAN; LIM; ISHAK, 1977), mesmo que raramente reportado, sugere que esse microrganismo não seja um agente primário de doença; e outros fatores relacionados a hospedeiro, co-infecções e ambiente podem auxiliar na indução de doença clínica (WHITLEY, 2000; CHALKER et al., 2004b). Vários micoplasmas são denominados

agentes oportunistas, e mais estudos devem ser realizados para esclarecer o papel epidemiológico da infecção por *M. felis* em felídeos domésticos e selvagens.

Apesar dos resultados negativos, esse é o primeiro relato do desenvolvimento de uma PCR para detecção de *M. felis* em felídeos selvagens. A PCR descrita por Chalker et al. (2004b) não foi testada contra DNA de micoplasmas de felídeos selvagens ou amostras clínicas desses animais. O par de iniciadores descritos por esses autores reagiu cruzado com DNA de *M. leocaptivi* no presente estudo. Por outro lado, a reação aqui descrita mostrou-se específica e sensível para detecção do *M. felis*. O tamanho do genoma desse microrganismo é desconhecido; porém, considerando o tamanho de 1 Mb descrito em um micoplasma filogeneticamente relacionado, o *M. fermentans*, pode-se inferir que a PCR desse estudo foi capaz de detectar aproximadamente 100 microrganismos. Esse limite de detecção é comparável a outros estudos relacionados à detecção de micoplasmas em amostras clínicas (CALSAMIGLIA; PIJOAN; TRIGO, 1999; CARON; OUARDANI; DEA, 2000).

Este estudo constitui o primeiro levantamento de DNA proviral de FeLV em felídeos neotropicais no Sul do Brasil. Dados ainda não publicados por Coelho<sup>2</sup> (2007) evidenciam a presença de DNA proviral de FeLV em quatro espécies de felídeos neotropicais do Zoológico de Belo Horizonte (*L. pardalis*, *P. onca*, *P. concolor* e *P. yagouaroundi*) (informação verbal). Por outro lado, Filoni (2006) detectou de forma inédita RNA e DNA proviral de FeLV em espécimes de *P. yagouaroundi* de cativeiro em São Paulo, além de relatar a presença de anticorpos anti-FeLV em todas as espécies de felídeos neotropicais, com exceção da *P. onca*. Esse mesmo grupo de pesquisa avaliou 109 felídeos neotropicais do Zoológico de São Paulo para presença de antígeno p27 de FeLV, e nenhum dos animais mostrou resultados positivos (FILONI et al., 2003). Por outro lado, um diferente estudo descreveu antígeno p27 em *L. pardalis*, *L. colocolo*, *L. weidii*, *P. concolor* e *P. onca* no Sul do Brasil (SCHIMIT et al., 2003). Desta forma, embora em variável frequência, a infecção por FeLV evidencia-se moderadamente disseminada nas populações de felídeos selvagens no Brasil, indicando importante ameaça para conservação dessas espécies.

Embora os animais positivos para DNA proviral de FeLV tenham apresentado desidratação e linfocitose, essas alterações foram observadas em outros 10 e 8 animais, respectivamente; sugerindo que tais características provavelmente não estão relacionadas a infecção por FeLV nesse caso. Da mesma forma, apesar da infecção poder levar a mielopatia em

<sup>2</sup> Informação fornecida por Coelho em estágio no Laboratório de Virologia Comparada da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2007.

gatos domésticos (CARMICHAEL; BIENZLE; MCDONNELL, 2002), não houve associação evidente da ataxia não progressiva de membros anteriores do *L. pardalis* com a infecção viral. Como as fêmeas escondem seus filhotes por cerca de dois meses após o nascimento, também não é possível afirmar uma causa congênita. Entretanto, convém ressaltar que esse animal já reproduziu prole sadia e não possui nenhum outro sinal clínico mais sério.

Ambos os animais positivos são nascidos em cativeiro. Felídeos selvagens frequentemente dividem seu habitat, inclusive zoológicos, com animais domésticos que podem carrear e transmitir vírus a esses animais. A circulação de gatos domésticos errantes entre os recintos do Refúgio Bela Vista é relatada pelos veterinários, evidenciando uma possível transmissão entre animal doméstico e animal selvagem. Da mesma forma, Mendes-de Almeida et al. (2007) relatam a presença de diversos agentes infecciosos em uma colônia de gatos de rua no Zoológico do Rio de Janeiro, representando potenciais transmissores. Assim, sugere-se que estudos em populações de gatos domésticos sejam realizados na região do Refúgio Bela Vista.

Ao contrário do observado em *Felis silvestris* por Willi et al. (2007b) e em outros estudos com gatos domésticos (GEORGE et al., 2002; LURIA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2008), o presente estudo não mostrou associação entre a infecção por hemoplasma e FeLV. Da mesma forma, Filoni (2006) não mostrou associação entre infecção (antígeno p27, RNA e DNA proviral) ou evidência sorológica de FeLV (Western Blot e ELISA indireto FeLV gp70) com a infecção por hemoplasma. Entretanto, devido ao baixo número de animais positivos, não é possível afirmar que essa associação é inexistente em felídeos neotropicais. Convém ressaltar que o FeLV é consistentemente encontrado em populações de vida livre de *F. silvestris*, inclusive em maior prevalência do que em gatos domésticos da mesma região (FILONI, 2006), o que poderia explicar a associação entre esses agentes no estudo de Willi et al. (2007b). Além disto, a literatura é contraditória em associar FeLV e hemoplasma mesmo em gatos domésticos; o que parece variar com o tipo de população estudada (TASKER et al., 2003; LURIA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2008).

Apesar do *L. weidii* infectado por Mhf apresentar histórico de anemia em 2002, não é possível afirmar que esse espécime se encontrava infectado naquele momento. Outro fato interessante é que esse animal é nascido em cativeiro e nunca foi exposto a pulgas, a qual se afirma ser a principal forma de transmissão do agente (WILLI et al., 2007a). Desta forma, levanta-se a suspeita para outras formas de transmissão, como saliva, transmissão “in utero”,



mosquitos etc. Apesar da mãe ter sido negativa a PCR no presente estudo (dado não apresentado), a parasitemia cíclica e a infecção crônica do Mhf pode resultar em falsos negativos (WILLI et al., 2007a), assim como para outros animais do presente estudo.

Apesar da frequência de infecção por Mhf ser semelhante à observada por Willi et al. (2007b) nos felídeos do zoológico de São Paulo, a ausência de animais positivos para CMhm no presente estudo contradiz a prevalência de 10% observada por esses autores (WILLI et al., 2007b). Assim como em gatos domésticos (TASKER, 2006), a prevalência parece variar de população para população. A sensibilidade da técnica diagnóstica e exposição a fatores de risco podem explicar essa ocorrência. Willi et al. (2007b) utilizou a técnica de Real Time PCR, que é sabidamente mais sensível e específica que a PCR “standard” para detecção de animais infectados, principalmente na forma crônica da doença. Por outro lado, a frequência de infestações por pulgas pode ser alta em zoológicos de São Paulo (ADANIA et al., 1998), ao contrário do Refúgio Bela Vista. Ao mesmo tempo, animais de vida livre são mais frequentemente afetados (WILLI et al., 2007b), e 40,35% dos animais avaliados são nascidos em cativeiro. Adicionalmente, de acordo com Willi<sup>3</sup> (2007), a quantidade de cópias de DNA de hemoplasmas não varia significativamente entre gatos domésticos e selvagens infectados (informação verbal); no entanto, é possível que os animais do presente estudo apresentem um parasitismo muito baixo, não sendo possível detectar mesmo com a PCR. Coletas seriadas podem auxiliar na identificação de animais positivos, além da utilização de técnicas mais sensíveis como o Real-time PCR e o Southern Blot (GUIMARAES et al., 2007a; SYKES et al., 2007b).

Este é o primeiro relato de DNA de *B. henselae* no sangue de *L. pardalis*, *L. geoffroyi*, *L. tigrinus* e *P. yagouaroundi*. Apesar de todas as espécies de pequenos felídeos neotropicais apresentarem evidência sorológica para *B. henselae*, apenas um (0,92%) espécime *L. weidii* apresentou resultado positivo a PCR para esse microrganismo no estudo desenvolvido por Filoni (2006). No presente estudo, 15,78% dos animais apresentaram resultado positivo a PCR para *Bartonella* spp. Esse número foi menor do que o reportado para *Acinonyx jubatus* (23%) de vida livre, mas maior o que o reportado para *Panthera leo* (3,7%) de vida livre (MOLIA et al., 2004).

Nenhum estudo realizado até o momento havia associado alterações hematológicas com a infecção por *B. henselae* em felídeos selvagens. Apesar de algumas infecções ou exposições naturais terem sido contraditoriamente associadas a sinais clínicos em gatos domésticos (UENO et al., 1996; GLAUS et al., 1997; LAPPIN; BLACK, 1999; KETRING; HARDY;

<sup>3</sup> Informação fornecida por Willi em visita técnica a Universidade de Zurich, 2007.

ZUCKERMAN, 2004; BREITSCHWERDT et al., 2005; PEARCE et al., 2006; FONTENELLE et al., 2007; LEIBOVITZ et al., 2008; QUIMBY et al., 2008), infecções experimentais por *B. henselae*, *B. claridgeiae* ou *B. koehlerae* em sua maioria não resultaram em sinais clínicos ou alterações hematológicas evidentes (GREENE et al., 1996; REGNERY et al., 1996; ABBOTT et al., 1997; GUPTILL et al., 1997; KORDICK; BREITSCHWERDT, 1997; KORDICK et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2002a,b). Entretanto, alguns estudos mencionam lesões histopatológicas em diversos órgãos, febre e anemia transitórias, e anormalidades do sistema nervoso central em alguns gatos experimentalmente infectados por *B. henselae* (KORDICK; BREITSCHWERDT, 1997, GUPTILL et al., 1997). Portanto, apesar de reportada em humanos, a ocorrência de anemia em gatos infectados por *B. henselae* permanece indefinida, e até o momento não foi possível associar essa alteração às infecções naturais (ISHAK; RADECKI; LAPPIN, 2007). No presente estudo também não se observou associação entre anemia ou histórico de anemia e a infecção por *B. henselae*. Convém ressaltar que a bacteremia por *Bartonella* spp pode ser intermitente e acredita-se que gatos possam eliminar a infecção (KORDICK; BREITSCHWERDT, 1997; YAMAMOTO et al., 2002b; BRUNT et al., 2006; ARVAND; VIEZENS; BERGHOFF, 2008); desta forma, animais com histórico de anemia podem estar infectados ou terem sido infectados com *Bartonella* spp no passado e eliminado o agente.

Outras anormalidades hematológicas, como as observadas no presente estudo, nunca foram reportadas em gatos domésticos experimentalmente infectados por *B. henselae*; e também não foram associadas à infecção pelo agente no presente estudo. Mas assim como em gatos domésticos, mais estudos devem ser realizados em busca de novas associações.

Fatores de risco associados à soropositividade para *Bartonella* spp em gatos domésticos são diferentes daqueles associados à bacteremia (CHOMEL et al., 1995; GUPTILL et al., 2004). Animais soropositivos não necessariamente estão em bacteremia, mas a ausência de anticorpos é altamente preditiva da ausência de bacteremia por *B. henselae* (CHOMEL et al., 1995; CHOMEL et al., 2004; MOLIA et al., 2004). Conclusões e comparações pertinentes a este estudo devem ser feitas de forma cautelosa, uma vez que fatores de risco associados à infecção ou bacteremia por *Bartonella* variam com o tipo de população estudada e métodos diagnósticos empregados. A interação entre diferentes variáveis pode levar a uma interpretação errônea dos resultados. As variáveis “bacteremia intermitente”, “sexo” e “origem” são variáveis de confusão uma para outra

e podem interferir nos resultados do presente estudo. Adicionalmente, a idade não foi avaliada; sendo que esta apareceu como fator de risco em estudos sobre soroprevalência e bacteremia por *Bartonella* spp em felídeos domésticos e selvagens (CHOMEL et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1998; GUPTILL et al., 2004).

Nesse contexto, apenas um estudo avaliou a variável sexo como fator de risco em animais positivos a PCR para *Bartonella* spp (CHOMEL et al., 2004). Nesse caso, Chomel et al. (2004) avaliaram fatores de risco em espécimes de *P. leo* e *A. jubatus* de vida livre e não encontraram associação entre a variável “sexo” e a presença de DNA de *Bartonella* spp no sangue. Por outro lado, Yamamoto et al. (1998) encontraram associação entre soropositividade e machos de *P. concolor* de vida livre, enquanto outros estudos não o fizeram (ROTSTEIN et al., 2004; CHOMEL et al., 2004). Os machos da população estudada no Refúgio Bela Vista possuíam 14,7 vezes mais chances de apresentar DNA de *B. henselae* no sangue do que as fêmeas. Machos de vida livre tendem a entrar mais em contato com animais da mesma espécie, levando a uma maior exposição a vetores (como pulgas e carrapatos) e a um maior risco de infecção. Porém, por mais que a maioria (66,66%) dos animais positivos do presente estudo seja oriundo de vida livre, esses gatos estão em cativeiro individuais há anos; sendo que a vida livre e conseqüente exposição a vetores pode não ser mais o responsável pela infecção. Convém lembrar que a bacteremia intermitente e a idade dos animais devem ser consideradas. Adicionalmente, fatores intrínsecos aos machos quanto à susceptibilidade a infecção por *Bartonella* spp podem ser futuramente pesquisados.

A interpretação da variável “origem” como fator de risco para os felídeos também deve ser feita de maneira cautelosa. Animais oriundos de vida livre neste estudo apresentaram 1,5 vezes mais chances de estarem infectados do que os animais nascidos em cativeiro no momento da coleta. Porém, esses dados não foram estatisticamente significativos, e, desta forma, não existem garantias de que essa variável seja um fator de risco na população real. Como citado acima, os animais oriundos de vida livre estão em cativeiro e estão expostos aos mesmos fatores de risco que aqueles nascidos em cativeiro e, desta forma, o momento de infecção desses animais não pode ser assegurado. Porém, o tempo de infecção e bacteremia nesses animais são desconhecidos, e não se descarta a possibilidade de uma infecção adquirida durante o período de vida livre e que ainda não foi eliminada.

Recentemente, 11 espécimes de *P. onca* de cativeiro foram testados para presença de *Bartonella* spp pelo nosso grupo de pesquisa (dado não apresentado). Apenas um macho, filhote, de cativeiro foi positivo a reação; identificada como *B. henselae*. Todos os outros animais eram adultos e foram negativos. Esse filhote tinha sido recém capturado no estado de Mato Grosso, e estava em cativeiro há menos de uma semana; o que sugere que essa infecção tenha ocorrido durante seu período em vida livre. Esse dado confirma a presença de DNA de *B. henselae* no sangue da espécie *P. onca* e sugere a presença do agente em vida livre.

A infestação por pulgas é frequentemente reportada como fator de risco para infecção por bartonela em gatos domésticos e a transmissão por esse vetor foi confirmada (BRUNT et al., 2006). DNA de *Bartonella* spp foi identificado em carrapatos do gênero *Ixodes* e moscas dos gêneros *Haematobia* spp, *Stomoxys* spp e *Chrysops* spp e sugere-se que esses artrópodes sejam vetores de transmissão (CHANG et al., 2001; CHUNG et al., 2004). O histórico de pulgas não apareceu associado à infecção por *Bartonella* spp no presente estudo e animais sem histórico de pulgas tinham 2,4 vezes mais chances de estarem infectados. Isso pode ter ocorrido devido a errôneas anotações no histórico dos animais do Refúgio ou até mesmo devido à transmissão por outros vetores. Animais de vida livre são comumente encontrados com pulgas e carrapatos (LABRUNA et al., 2005; FIORELLO et al., 2006; DURDEN et al., 2006) e apenas 11,76% (4/34) dos animais oriundos de vida livre tinham histórico da presença de pulgas no momento da chegada no Refúgio. Nesse caso, alguns animais podem ser oriundos de vida livre, mas estiveram primeiramente em outros zoológicos, sendo encaminhados ao Refúgio Bela Vista sem pulgas, levando a falhas nas anotações dos históricos.

Ao contrário do que foi descrito por Yamamoto et al. (1998) em felídeos de cativeiro, o gênero/espécie de felídeo não foi classificado como fator de risco para os animais do Refúgio Bela Vista. Apesar de espécimes de *L. geoffroyi* e *P. yagouaroundi* terem maior risco de infecção quando comparado a outras espécies, o número de amostras desses animais era baixo (n=4) e esse dado não foi estatisticamente significativo. Variáveis como espécie estudada, localidade, bacteremia intermitente e idade podem ter influenciado os resultados.

Os felídeos avaliados não apresentaram co-infecção entre *B. henselae* e FeLV, ou *B. henselae* e hemoplasmas. Em outros estudos, a soropositividade para *B. henselae* em gatos domésticos não estava associada à infecção por FeLV (GLAUS et al., 1997; LURIA et al., 2004). Além disto, Luria et al. (2004) observaram ausência de associação de soropositividade com

infecção por hemoplasma e Sykes et al. (2007c) demonstraram que a infecção prévia por hemoplasmas não altera o curso da infecção experimental por *B. henselae* em gatos SPF.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As alterações hematológicas observadas nos felídeos indicam a necessidade de aumentar o espectro dos agentes infecciosos a serem estudados e aprimorar a contenção destes animais durante procedimentos de coleta de amostras.
- O arrancamento de pêlos foi mais freqüente em *L. weidii*.
- Esse é o primeiro relato de isolamento de *Mycoplasma* spp de orofaringe de pequenos felídeos neotropicais.
- A PCR mostrou-se mais sensível para detecção de *Mollicutes* do que o cultivo em meio específico.
- A detecção de *Mollicutes* em conjuntiva ou orofaringe dos animais avaliados não implicou em doença clínica.
- A PCR desenvolvida para detecção de *M. felis* mostrou-se sensível e específica para detecção do agente, mas DNA desse microrganismo não foi detectado nos felídeos.
- Não foi possível detectar a presença de CMhf nos animais analisados, mas a freqüência de infecção por Mhf é semelhante a outros estudos com felídeos selvagens no Brasil.
- Não foi possível associar doença clínica à infecção por Mhf.
- Este é o primeiro relato de DNA proviral de FeLV em *L. tigrinus* e *L. pardalis* de cativeiro no Sul do Brasil.
- Não foi possível associar doença clínica à infecção por FeLV.

- Este é o primeiro estudo mais abrangente envolvendo PCR para *Bartonella* spp em pequenos felídeos neotropicais.
- *B. henselae* foi a única espécie de bartonela identificada nos animais avaliados e este é o primeiro relato da detecção de DNA desse agente em espécimes de *L. pardalis*, *L. geoffroyi*, *L. tigrinus* e *P. yagouaroundi*.
- Não houve associação de alterações hematológicas com a infecção por *Bartonella* spp.
- Dentre os fatores de risco para infecção por *Bartonella* spp, somente a variável “sexo” apareceu associada, sendo que machos desta população de felídeos possuem mais chances de infectar-se por *Bartonella* spp do que fêmeas.
- As variáveis “origem”, “histórico de pulgas” e “espécie de felídeo” não foram associadas à infecção por *Bartonella* spp.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, R. C.; CHOMEL, B. B.; KASTEB, R. W.; FLOYD-HAWKINS, K. A.; KIKUCHI, Y.; KOEHLER, J. E.; PEDERSEN, N. C. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 41-51, 1997.
- ADANIA, C. H.; DINIZ, L. S. M.; GOMES, M. S.; FILONI, C.; SILVA, M. G. Avaliação das condições veterinárias e de manejo dos pequenos felinos neotropicais em cativeiro do Estado de São Paulo. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 1, n. 1, p. 44-53, 1998.
- ANDERSON, B. E.; NEUMAN, M. A. *Bartonella* spp as emerging human pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 203-219, 1997.
- AVIDOR, B.; GRAIDY, M.; EFRAT, G.; LEIBOWITZ, C.; SHAPIRA, G.; SCHATTNER, A.; ZIMHONY, O.; GILADI, M. *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3462-3468, 2004.
- ARVAND, M.; VIEZENS, J.; BERGHOFF, J. Prolonged *Bartonella henselae* bacteremia caused by reinfection in cats. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 152-154, 2008.
- BARGER, A. M. The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. **The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p. 1207-1222, 2003.
- BARRS, V. R.; ALLAN, G. S.; MARTIN, P.; BEATTY, J. A.; MALIK, R. Feline pyothorax: a retrospective study of 27 cases in Australia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 7, n. 4, p. 211-222, 2005.
- BAUMANN, A.; GUIMARAES, A. M. S.; SILVA, C. C.; YAMAGUTI, M.; KOZEMJAKIM, D. A.; MESSICK, J. B.; TIMENETSKY, J. *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. **Veterinary Clinical Pathology**, Lawrence, v. 35, n. 3, p. 370, 2006. Suplemento.
- 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.



BERENT, L.; MESSICK, J. B.; COOPER, S. K.; CUSICK, P. K. Specific in situ hybridization of *Haemobartonella felis* with a DNA probe and tyramide signal amplification. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 47-53, 2000.

BIRKENHEUER, A. J.; MARR, H.; ALLEMAN, A. R.; LEVY, M.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a PCR assay for the detection of *Cytauxzoon felis* DNA in feline blood samples. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n.1-2, p. 144-149, 2006.

BIRNBOIM, H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. **Methods in Enzymology**, v. 100, p. 243-255, 1983.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BLACKMORE, D. K.; HILL, A.; JACKSON, O. F. The incidence of mycoplasma in pet and colony maintained cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 12, n. 4, p. 207-217, 1971.

BLECHA, F. Immune system response to stress. In: MOBERG, G.; MENCH, J. A. (Ed). **The biology of animal stress: basic principles and implications to animal welfare**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 111-122

BONILLA, H. F.; CHENOWETH, C. E.; TULLY, J. G.; BLYTHE, L. K.; ROBERTSON, J. A.; OGNENOVSKI, V. M.; KAUFFMAN, C. A. *Mycoplasma felis* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. **Clinical Infectious Disease**, v. 24, n. 2, p. 222-225, 1997.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHIEM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BREITSCHWERDT, E. B.; LEVINE, J. F.; RADULOVIC, S.; HANBY, S. B.; KORDICK, D. L.; LA PERLE, K. M. D. *Bartonella henselae* and *Rickettsia* seroreactivity in a sick cat population from North Carolina. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, n. 4, p. 287-302, 2005.

BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G.; SIGMON, B.; NICHOLSON, W. L. Isolation of *Bartonella quintana* from a woman and a cat following putative bite transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 270-272, 2007.

BREITSCHWERDT, E. B.; KORDICK, D. L. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 428-438, 2000.

BROWN, M. B.; GIONET, P.; SENIOR, D. F. Identification of *Mycoplasma felis* and *Mycoplasma gateae* by an immunobinding assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1870-1873, 1990.

BROWN, D. R.; MCLAUGHLIN, G. S.; BROWN, M. B. Taxonomy of the feline mycoplasmas *Mycoplasma felifaucium*, *Mycoplasma feliminutum*, *Mycoplasma felis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma leocaptivus*, *Mycoplasma leopharyngis*, and *Mycoplasma simbae* by 16S rRNA gene sequence comparisons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 560-564, 1995.

BROWN, M. R.; ROGERS, K. S. Neutropenia in dogs and cats: a retrospective study of 261 cases. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 37, n. 2, p. 131-139, 2001.

BRUNT, J.; GUPTILL, L.; KORDICK, D. L.; KUDRAK, S.; LAPPIN, M.R. American Association of Feline Practitioners 2006 Panel Report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp infections. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, n. 4, p. 213-226, 2006.

CALSAMIGLIA, M. PIJOAN, C.; TRIGO, A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 3, p. 246-251, 1999.

CAMPBELL, L. H.; SNYDER, S. B.; REED, C.; FOX, J. G. *Mycoplasma felis*- associated conjunctivitis in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 163, n. 8, p. 991-995, 1973.

CARMICHAEL, K. P.; BIENZLE, D.; MCDONNELL, J. J. Feline leukemia virus-associated myelopathy in cats. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. , p. 536-545, 2002.

CARON, J.; OUARDANI, M.; DEA, S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1390-1396, 2000.

CHALKER, V. J.; OWEN, W. M. A.; PATERSON, C. J. I.; BARKER, E.; BROOKS, H.; RYCROFT, A. N.; BROWLIE, J. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. **Microbiology**, v. 150, Pt. 10, p. 3491-3497, 2004a.

CHALKER, V. J.; OWEN, W. M. A.; PATERSON, C. J. I.; BROWLIE, J. Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats. **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 77-82, 2004b.

CHAMBERLAIN, S. R.; FINEBERG, N. A.; BLACKWELL, A. D.; ROBBINS, T. W.; SAHAKIAN, B. J. Motor inhibition and cognitive flexibility in obsessive-compulsive disorder and trichotillomania. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 7, p. 1282-1284, 2006.

CHANG, C. C.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; ROMANO, V.; TIETZE, N. Molecular evidence of *Bartonella* spp in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1221-1226, 2001.

CHANDLER, J. C.; LAPPIN, M. R. Mycoplasmal respiratory infections in small animals: 17 cases (1988-1999). **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 2, p. 111-119, 2002.

CHOMEL, B. B.; ABBOTT, R. C.; KASTEN, R. W.; FLOYD-HOWKINS, K. A.; KASS, P. H.; GLASER, C. A.; PEDERSEN, N.C.; KOEHLER, J. E. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2445-2450, 1995.

CHOMEL, B. B.; BOULOUIS, H. J.; MARIYAMA, S.; BREITSCHWERDT, E. B. *Bartonella* spp in pets and effect on human health. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 389-394, 2006.

CHOMEL, B. B.; KIKUCHI, Y.; MARTERSON, J. S.; ROELKE-PARKER, M. E.; CHANG, C. C.; KASTEN, R. W.; FOLEY, J. E.; LAUDRE, J.; MURPHY, K.; SWIFT, P. K.; KRAMER, V. L.; O'BRIEN, S. J. Seroprevalence of *Bartonella* infection in American free-ranging and captive pumas (*Felis concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*). **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 233-241, 2004.

CHOMEL, B. B.; WEY, A.C.; KASTEN, R.W.; STACY, B. A.; LABELLE, P. Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5337-5339, 2003.

CHUNG, C. Y.; KASTEN, R.W.; PAFF, S. M.; VAN HORN, B.A.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BOULOUIS, H. J.; CHOMEL, B. B. *Bartonella* spp DNA associated with biting flies from California. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1311-1313, 2004.

CLUBB, R.; MASON, G. Captivity effects on wide-ranging carnivores. **Nature**, v. 425, n. 2, p. 473, 2003.

COHEN, L. J.; STEIN, D. J.; SIMEON, D.; SPADACCINI, E.; ROSEN, J.; ARONOWITZ, B.; HOLLANDER, E.. Clinical profile, comorbidity, and treatment history in 123 hair pullers: a survey study. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 56, n. 7, p. 319-326, 1995.

COLE, B. C.; GOLIGHTLY, L.; WARD, J. R. Characterization of mycoplasma strains from cats. **Journal of Bacteriology**, v. 94, n. 5, p. 1451-1458, 1967.

COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS. **ICTVdB Descriptions - Retroviridae**. 2007. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/61000000.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2007.

COPEES, J.; NIEVAS, V.; VIGO, G.; CASTELLANOS, C.; STANCHI, N. Aislamiento de *Mycoplasma felis* a partir de gatos com enfermidade respiratória. **Avances de Medicina Veterinaria**, v. 12, n. 2, 1997.

CRISP, M. S.; BIRCHARD, S. J.; LAWRENCE, A. E.; FINGEROTH, J. Pulmonary abscess caused by a *Mycoplasma* sp in a cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 191, n. 3, p. 340342, 1987.

DAVIDSON, H. J.; ROGERS, D. P.; YEARY, T. J.; STONE, G. G.; SCHONEWEIS, D. A.; CHENGAPPA, M. M. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 7, p. 949-951, 1994.

DAVIDSON, H. J.; VESTWEBER, J. G.; BRIGHTMAN, A. H.; VAN SLYKE, T. H.; COX, L. K.; CHENGAPPA, M. M. Ophthalmic examination and conjunctival bacteriologic culture results from a herd of North American bison. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 8, p. 1142-1144, 1999.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious disease of wildlife – threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443-449, 2000.

- DE MORAES, H. A.; GUIMARAES, A. M. S.; VIDOTTO, O.; BAUMANN, A.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in three cats from Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 6, p. 518-520, 2007.
- DEAN, R.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. In: BSAVA, 2005, Gloucester, Reino Unido. **Anais...** 2005. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2005, p. 554.
- DEHIO, C.; MEYER, M.; BERGER, J.; SCHWARZ, H.; LANZ, C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalization of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. **Journal of Cell Science**, v. 110, n. 18, p. 2141-2154, 1997.
- DRANCOURT, M.; MOAL, V.; BRUNET, P.; DUSSOL, B.; BERLAND, Y.; RAOULT, D. *Bartonella quintana (Rochalimaea)* infection in a seronegative hemodialyzed patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1158-1160, 1996.
- DURDEN, L. A.; CUNNINGHAM, M. W.; MCBRIDE, R.; FERREE, B. Ectoparasites of free-ranging pumas and jaguars in the Paraguayan Chaco. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 189-193, 2006
- DYBVIG, K. Mycoplasmal genetics. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 81-104, 1990.
- ENGBRECHT, J.; BRENT, R.; KADERBHAI, M. A. Minipreps of plasmid DNA. **Current Protocols in Molecular Biology**, Boston, n. 1.6, 1991. Suplemento 15.
- FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 39, n. 4, p. 729-735, 1995.
- FILHO, O. C. Isolamento de *Mycoplasma* sp em gatos doentes e normais. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 44, n. 1-2, p. 59-62, 1977.
- FILONI, C. **Exposição de felídeos selvagens a agentes infecciosos selecionados**. 2006. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FILONI, C.; ADANIA, C. H.; DURIGON, E. L.; CATÃO-DIAS, J. L. Serosurvey for feline leukemia virus and lentiviruses in captive small neotropical felids in São Paulo State, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.

FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S. P.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and *Ehrlichia* exposure in Brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 470-477, 2006.

FISHER, E. W.; TOT, S.; COLLIER, W. Anaemia in a litter of Siamese kittens. **Journal of Small Animal Practice**, v. 24, n. 4, p. 215-219, 1983.

FIORELLO, C. V.; ROBBINS, R. G.; MAFFEI, L.; WADE, S. E. Parasites of free-ranging small canids and felids in Bolivian Chaco. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 2, p. 130-134, 2006.

FOLEY, J. E.; CHOMEL, B. B.; KIKUCHI, Y.; YAMAMOTO, K.; PEDERSEN, N.C. Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cattery cats: association with cattery hygiene and flea infestation. **The Veterinary Quarterly**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 1998a.

FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N. C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 12, p. 1581-1588, 1998b.

FONTENELLE, J. P.; POWELL, C. C.; HILL, A. E.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Prevalence of serum antibodies against Bartonella species in the serum of cats with or without uveitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 5, p. 315-320, 2008.

FOSTER, S. F.; BARRS, V. R.; MARTIN, P.; MALIK, R. Pneumonia associated with *Mycoplasma* spp in three cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 7, p. 460-464, 1998

FOSTER, S. F.; MARTIN, P.; ALLAN, G. S.; BARRS, V. R.; MALIK, R. Lower respiratory tract infections in cats: 21 cases (1995-2000). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 3, p. 167-180, 2004.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K. V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.;

- NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT, K. F.; HU, P. C.; LUCIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A. 3rd; VENTER, J. C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 397-403, 1995
- FUJIHARA, M.; WATANABE, M.; YAMADA, T.; HARASAWA, R. Occurrence of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” infection in domestic cats in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 10, p. 1061-1063, 2007.
- FULLER, T. K.; KERR, K. D.; KARNS, P. D. Hematology and serum chemistry of bobcats in northcentral Minnesota. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 21, n. 1, p. 29-32, 1985.
- GARY, A. T.; RICHMOND, H. L.; TASKER, S.; HACKETT, T. B.; LAPPIN, M. R. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in blood cats used for transfusions. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 5, p. 321-326, 2006.
- GASKIN, J. M. Microbiology of canine and feline eye. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 10, n. 2, p. 303-316, 1980.
- GEORGE, J. W.; RIDEOUT, B. A.; GRIFFEY, S. M.; PEDERSEN, N. C. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 8, p. 1172-1178, 2002.
- GIONFRIDDO, J. R.; ROSENBUSCH, R.; KINYON, J. M.; BETTS, D. M.; SMITH, T. M. Bacterial and mycoplasmal flora of the healthy camelid conjunctival sac. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 7, p. 1061-1064, 1991.
- GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; GREENE, C.; GLAUS, B.; WOLFENSBERGER, C.; LUTZ, H. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 1883-1885, 1997.
- GOMES-KELLER, M. A.; GÖNCZI, E.; TANDON, R.; RIONDATO, F.; HOFMANN-LEHMANN; MELI, M. L.; LUTZ H. Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 916-922, 2006.

GRASBON, T.; MIÑO DE KASPAR, H.; KLAUSS, V. No detection of mycoplasma in 205 conjunctival swabs. **Ophthalmologie**, v. 91, n. 5, p. 676-679, 1994.

GRAY, L.; KETRING, K. L.; TANG, Y. W. Clinical use of 16S rRNA gene sequencing to identify *Mycoplasma felis* and *M. gateae* associated with feline ulcerative keratitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3431-3434, 2005.

GREENE, C. E.; MCDERMOTT, M.; JAMESON, P. H.; ATKINS, C. L.; MARKS, A. M. *Bartonella henselae* infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1682-1685, 1996.

GREER, J. M.; CAPECCHI, M. R. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. **Neuron**, v. 33, n. 1, p. 23-34, 2002.

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

GUIMARAES, A. M. S.; BIONDO, A. W.; BAUMANN, A.; NAKATANI, S.; MESSICK, J. B. *Mycoplasma hemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* coinfection in a domestic cat (*Felis catus*) in Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Lawrence, v. 34, p. 286, 2005. Suplemento.

GUIMARAES, A. M. S.; BIONDO, A. W.; LARA, A. C.; MESSICK, J. B. An exploratory study on *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in Southern Brazil. **Veterinary Record**, v. 160, n. 2, p. 50-53, 2007a.

GUIMARAES, A. M. S.; JAVOROUSKI, M. L.; BONAT, M.; LACERDA, O.; BALBINOTTI, B.; QUEIROZ, L. G. P. B.; TIMENETSKY, J.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Molecular detection of “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in a (*Panthera leo*) from a Brazilian zoological garden. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 3, p. 195-196, 2007b.

GUPTILL, L.; SLATER, L. N.; WU, C. C.; LIN, T. L.; GLICKMAN, L. T.; WELCH, D. F.; HOGENESCH, H. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 1, p. 206-216, 1997.

GUPTILL, L.; SLATER, L. N.; WU, C. C.; LIN, T. L.; GLICKMAN, L. T.; WELCH, D. F.; TOBOLSKI, J.; HOGENESCH, H. Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 165, n. 2-4, p. 177-189, 1998.



GUPTILL, L.; WU, C. C.; HOGENESCH, H.; SLATER, L. N.; GEICKMAN, N.; DUNHAM, A.; SYME, H.; GLICKMAN, L. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of *Bartonella henselae* infection in pet cats in four regions of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 652-659, 2004.

HACKETT, T. B.; JENSEN, W. A.; LEHMAN, T. L.; HOHENHAUS, A. E.; CRAWFORD, P.C.; GIGER, U.; LAPPIN, M. R. Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*", *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 5, p. 700-705, 2006.

HAEFNER, M.; BURKE, T. J.; KITCHELL, B. E.; LAMONT, L. A.; SCHAEFFER, D. J.; BEHR, M.; MESSICK, J. B. Identification of *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) in captive nondomestic cats. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 2, p. 139-143, 2003.

HAESEBROUCK, F.; DEVRIESE, L. A.; VAN RIJSSEN, B.; COX, E. Incidence and significance of isolation of *Mycoplasma felis* from conjunctival swabs of cats. **Veterinary Microbiology**, v. 26, n. 1-2, p. 95-101, 1991.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 2, p. 95-98, 1999.

HARASAWA, R.; CASSEL, G. H. Phylogenetic analysis of genes coding for 16S rRNA in mammalian ureaplasmas. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 827-829, 1996.

HARASAWA, R.; YAMAMOTO, K.; OGATA, M. Isolation of T-mycoplasmas from cats in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 3, p. 179-181, 1977.

HARDY JR., W. D.; MCCLELLAND, A. J.; ZUCKERMAN, E. E.; HESS, P. W.; ESSEX, M.; COTTER, S. M.; MACEWEN, E. G.; HAYES, A. A. Prevention of the contagious spread of feline leukaemia virus and the development of leukaemia in pet cats. **Nature**, v. 263, n. 5575, p. 326-328, 1976.

HARDY JR., W. D.; ZUCKERMAN, E. E. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for the detection of feline leukemia virus infection in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p. 1365-1373, 1991.

HEINRITZI, K.; PLANK, G. The effect of *Eperythrozoon suis* infection on the osmotic fragility of erythrocytes. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 105, n. 11, p. 380-383, 1992.

HEYWARD, J. T.; SABRY, M. Z.; DOWDLE, W. R. Characterization of mycoplasma species of feline origin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 4, p. 615-622, 1969.

HILL, A. Comparison of mycoplasmas isolated from captive wild felids. **Research in Veterinary Science**, v. 18, n. 2, p. 139-143, 1975.

HINNELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; PIRKL, E.; LI, B. C.; HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 22, p. 4420-4449, 1996.

HJELM, E.; MCGILL, S.; BLOMQVIST, G. Prevalence of *Bartonella henselae*, *B. elizabethae* and *B. quintana* in Swedish domestic cats. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 192-196, 2002.

HOOPER, P. T.; IRELAND, L. A.; CARTER, A. Mycoplasma polyarthritis in a cat with probable severe immune deficiency. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 10, p. 352, 1985.

IBAMA. **Plano de ação: pesquisa e conservação de mamíferos carnívoros do Brasil/ Centro Nacional de Pesquisa e Conservação dos Predadores Naturais**. São Paulo: Ibama, 2004. 52 p.

INAMINE, J. M.; HO, K. C.; LOECHEL, S.; HU, P. C. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 1, p. 504-506, 1990.

ISHAK, A. M.; RADECKI, S.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, *Bartonella* species, *Ehrlichia* species, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the blood of cats with anemia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2006.

JAIN, N. C. The neutrophils. In: \_\_\_\_\_. **Essentials in veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 222-246.

JACOMO, V.; KELLY, P. J.; RAOULT, D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 8-18, 2002.

JARRETT, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. **Veterinary Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 99-107, 1999.

JARRETT, W. F. H.; CRAWFORD, E. M.; MARTIN, W. B.; DAVIE, F. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). **Nature**, v. 202, n. 4932, p. 567-569, 1964.

JESSUP, D. A.; PETTAN, K. C.; LOWENSTEINE, L. J.; PEDERSEN, N. O. Feline leukemia virus infection and renal spirochetosis in free-ranging cougar (*Felis concolor*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, n. 1, p. 73-79, 1993.

JOHNSRUDE, J. D.; CHRISTOPHER, M. M.; LUNG, N. P.; BROWN, M. B. Isolation of *Mycoplasma felis* from a Serval (*Felis serval*) with severe respiratory disease. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 4, p. 691-694, 1996.

JONES, R. F.; SABINE, M. The isolation of mycoplasmas from clinically normal cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 46, n. 7, p. 343-344, 1970.

KAMLA, V.; HENRICH, B.; HADDING, U. Phylogeny based on elongation factor Tu reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16S rRNA. **Gene**, v. 171, n. 1, p. 83-87, 1996.

KETRING, K. L.; ZUCKERMAN, E. E.; HARDY JR., W. D. Bartonella: a new etiological agent of feline ocular disease. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 1, p. 6-12, 2004.

KIM, K. S.; KO, K. S.; CHANG, M. W.; HAHN, T. W.; HONG, S. K.; KOOK, Y. H. Use of *rpoB* sequences for phylogenetic study of *Mycoplasma* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, n. 2, p. 299-305, 2003.

KOCAN, A. A.; BLOUIN, E. F.; GLENN, B. L. Hematologic and serum chemical values for free-ranging bobcats, *Felis rufus* (Schreber), with reference to animals with natural infections of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 21, n. 2, p. 190-192, 1985.

KORDICK, D. L.; BREITSCHWERDT, E. B. Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 1655-1656, 1995.

KORDICK, D. L.; BREITSCHWERDT, E. B. Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 5, p. 492-497, 1997.

KORDICK, D. L.; BROWN, T. T.; SHINK, K.; BREITSCHWERDT, E. B. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *B. clarridgeiae* infection in cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1536-1547, 1999.

KORDICK, D. L.; HILYARD, E. J.; HADFIELD, T. L.; WILSON, K. H.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J.; BREITSCHWERDT, E.B. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1813-1818, 1997.

LA, V. D.; TRAN-HUNG, L.; ABOUDHARAM, G.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. *Bartonella quintana* in domestic cat. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1287-1289, 2005.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S.; SANA, D. A.; JACOMO, A. T.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A. ; SILVEIRA, L.; SANTOS JR., T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H.; GOMES, A. A.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C.; PRADA, C. S; SILVA, J. C.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F.; MORATO, R. L.; ALHO, C. J.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (*Acari: Ixodida*) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, n.1-2, p. 149-163, 2005.

LAPPIN, M. R.; BLACK, J. C. *Bartonella* spp associated uveitis in a cat. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 8, p. 1205-1207, 1999.

LAPPIN, M. R.; GRIFFIN, B.; BRUNT, J.; RILEY, A.; BURNEY, D.; HAWLEY, J.; BREWER, M. M.; JENSEN, W. A. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 2, p. 85-90, 2006.

- LEIBOVITZ, K.; PEARCE, L.; BREWER, M.; LAPPIN, M. R. *Bartonella* species antibodies and DNA in cerebral spinal fluid of cats with central nervous system disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2008. No prelo.
- LEVY, J. K. VLF e doença não-neoplásica relacionada. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds). **Tratado de medicina interna veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 446-455.
- LIEHMANN, L.; DEGASPERI, B.; SPERGSE, J.; NIEBAUER, G. W. *Mycoplasma felis* arthritis in two cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 47, n. 8, p. 476-479, 2006.
- LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 5, p. 287-296, 2004.
- LOW, H. C.; POWELL, C. C.; VEIR, J. K.; HAWLEY, J. R.; LAPPIN, M. Prevalence of feline herpesvirus 1, *Chlamydomphila felis*, and *Mycoplasma* spp DNA in conjunctival cells collected from cats with and without conjunctivitis. **American Journal Veterinary Research**, v. 68, n. 6, p. 643-648, 2007.
- MACIEIRA, D. B.; DE MENEZES, R. D.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R.; MACLANE, 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. 120-129, 2008.
- MAEDE, Y. Sequestration and phagocytosis of *Haemobartonella felis* in the spleen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 5, p. 691, 695, 1979.
- MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. V. Role of the spleen in cats infected with *Haemobartonella felis*. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, n. 2, p. 141-146, 1978.
- MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. IV. Lifespan of erythrocytes of cats infected with *Haemobartonella felis*. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 37, n. 5, p. 269-272, 1975.
- MAEDE, Y.; HATA, R. Studies on feline haemobartonellosis. II. The mechanism of anemia produced by infection with *Haemobartonella felis*. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 37, n. 1, p. 49—54, 1975.

MAEDE, Y.; MURATA, H.; Ultrastructural observation on the removal of *Haemobartonella felis* from erythrocytes in the spleen of a cat. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 40, n. 2, p. 203-205, 1978.

MAILLARD, J. C.; GONZALEZ, J. P. Biodiversity and emerging diseases. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1081, p. 1-16, 2006.

MAGGI, R. G.; DINIZ, P. P.; CADENAS, M. B.; BREITSCHWERDT, E. E. The use of molecular diagnostic techniques to detect *Anaplasma*, *Bartonella* and *Ehrlichia* species in arthropods or patients. In: THE INTERNATIONAL CANINE VECTOR-BORNE DISEASE SYMPOSIUM, 2006, Billesley, Reino Unido. **Anais...** 2006. v. 1, p. 8-13.

MARCO, I.; MARTINEZ, F.; PASTOR, J.; LAVIN, S. Hematologic and serum chemistry values of the captive european wildcat. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 3, p. 445-449, 2000.

MARKER, L.; MUNSON, L.; BASSON, P. A.; QUACKENBUSH, S. Multicentric T- cell lymphoma associated with feline leukemia virus infection in a captive Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 3, p. 690-695, 2003.

MARQUES, L. M.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C.; FERREIRA, J. B.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Use of a polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma dispar* in the nasal mucus of calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 1, p. 103-106, 2007.

MARUYAMA, S.; KASTEN, R. W.; BOULOUIS, H. J.; GURFIELD, N. A.; KATSUBE, Y.; CHOMEL, B. B. Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan, the USA and France by pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 79, n. 4, p. 337-349, 2001.

MAURIN, M.; BERTLES, R.; RAOULT, D. Current knowledge of *Bartonella* species. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 16, n. 7, p. 487-506, 1997.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; LABARTHE, N.; GUERRERO, J.; FARIA, M. C.; BRANCO, A. S.; PEREIRA, C. D.; BARREIRA, J. D.; PEREIRA, M. J. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 9-15, 2007.

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.

MIYAZAWA, T.; JARRETT, O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. **Archives of Virology**, v. 142, n. 2, p. 323-332, 1997.

MOLIA, S.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; LEUTENEGGER, C. M.; STEELE, B. R.; MARKER, L.; MARTENSON, J. S.; KEET, D. F.; BENGIS, R. G.; PETERSON, R. P.; MUNSON, L.; O'BRIEN, S. J. Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Veterinary Microbiology**, v. 100, n. 1-2, p. 31-41, 2004.

MOREIRA, N. **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus***. 2001. 232 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

MURRAY, D. L.; KAPKE, C. A.; EVERMANN, J. F.; FULLER, T. K. Infectious disease and the conservation of free-ranging large carnivores. **Animal Conservation**, v. 2, n. 4, p. 241-254, 1999.

MUTO, A.; YAMAO, F.; OSAWA, S. The genome of *Mycoplasma capricolum*. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 34, p. 29-58, 1987.

NASH, A. S.; BOBADE, P. A. *Haemobartonella felis* infection in cats from Glasgow area. **Veterinary Record**, v. 119, n. 15, p. 373-375, 1986.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, Pt 3, p. 891-899, 2001.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Polysystemic viral diseases. In: \_\_\_\_\_. **Small animal internal medicine**. 3. ed. Saint Louis: Mosby, 2003, p. 1273-1286.

NOLEN, R. S. Feline leukemia virus threatens endangered panthers. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 11, p. 1721-1722, 2004.

OGILVIE, T. H.; ROSENDAL, S.; BLACKWELL, T. E.; ROSTKOWSKI, C. M.; JULIAN, J. J.; RUHNKE, L. *Mycoplasma felis* as a cause of pleuritis in horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.182, n. 12, p.1374-1376, 1983.

PARROT, J. H.; DURE, L.; SULLENDER, W.; BURAPHACHEEP, W.; FRYE, T. A.; GALLIANI, C. A.; MARSTON, E.; JONES, D.; REGNERY, R. Central nervous system infection associated with *Bartonella quintana*: a report of two cases. **Pediatrics**, v. 100, n. 3, p. 403-408, 1997.

PEARCE, L.K.; RADECKI, S. V.; BREWER, M.; LAPPIN, M. R. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in serum of cats with and without clinical signs of central nervous system disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 5, p. 315-320.

PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; WILLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 142-150, 2008.

PINARD, C. L.; BRIGHTMAN, A. H.; YEARY, T. J.; EVERSON, T. D.; COX, L. K.; CHEGAPPA, M. M.; DAVIDSON, H. J. Normal conjunctival flora in the North American opossum (*Didelphis virginiana*) and raccoon (*Procyon lotor*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 4, 851-855, 2002.

PITCHER, D. G.; NICHOLAS, R. A. J. Mycoplasma host specificity: fact or fiction? **The Veterinary Journal**, v. 170, n. 3, p. 300-306, 2005.

QUIMBY, J. M.; ELSTON, T.; HAWLEY, J.; BREWER, M.; MILLER, A.; LAPPIN, M. R. Evaluation of the association of *Bartonella* species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 1, p. 66-72, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2008. Disponível em <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 02 maio 2008.

RANDOLPH, J. F.; MOISE, N. S.; SCARLETT, J. M.; SHIN, S. J.; BLUE, J. T.; CORBETT, J. R. Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and



mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in cats with or without pulmonary disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 6, p. 897-900, 1993.

RAZIN, S. *Mycoplasma* taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 3-22.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiology Reviews**, v. 42, n. 2, p. 414-470, 1978.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. *Mycoplasma* characterization. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G (Ed.). **Methods in mycoplasmaology**. New York: Academic Press, 1983. p. 150-176.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 52, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

REINHARDT, V. Hair pulling: a review. **Laboratory Animals**, v. 39, n. 4, p. 361-369, 2005.

REGNERY, R. L.; ROONEY, J. A.; JOHNSON, A. M.; NESBY, S. L.; MANZEWITSCH, P.; BEAVER, K.; OLSON, J. G. Experimentally induced *Bartonella henselae* infections followed by challenge exposure and antimicrobial therapy in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 12, p. 1714-1719, 1996.

RENTAS. **Primeiro relatório nacional sobre tráfico de fauna silvestre**. São Paulo: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres, 2001. Disponível em <[http://www.rentas.org.br/files/REL\\_RENTAS\\_pt\\_final.pdf](http://www.rentas.org.br/files/REL_RENTAS_pt_final.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2007.

REYNOLDS, C. A.; LAPPIN, M. R. “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” infections in 21 client-owned cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 43, n. 5, p. 249-257, 2007.

RIEDEL, N.; HOOVER, E. A.; GASPER, P. W.; NICOLSON, M. O.; MULLINS, J. Molecular analysis and pathogenesis of feline aplastic anemia retrovirus, feline leukemia virus C-SARMA. **Journal of Virology**, v. 60, n. 1, p. 242-250, 1986.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823-829, 1997.

ROLAIN, J. M.; FRANC, M.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipentis* in cat fleas, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 338-342, 2003.

ROTSTEIN, D. S.; TAYLOR, S. K.; BRADLEY, J.; BREITSCHWERDT, E.B. Prevalence of *Bartonella henselae* antibody in Florida panthers. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, n. 1, p. 157-160, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANOGO, Y. O.; ZEAITER, Z.; CARUSO, G.; MEROLA, F.; SHPYNOV, S.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodida*) removed from humans, Belluno province, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 329-332, 2003.

SANTOS, L. C. Hematologia. In: \_\_\_\_\_. **Laboratório ambiental**. Cascavel: Editora Universitária Edunioeste, 1999a. p. 59-92.

SANTOS, L. C. Parasitologia. In: \_\_\_\_\_. **Laboratório ambiental**. Cascavel: Editora Universitária Edunioeste, 1999b. p. 181-192.

SANTOS, L. C. Valores de referência para exames laboratoriais. In: \_\_\_\_\_. **Laboratório ambiental**. Cascavel: Editora Universitária Edunioeste, 1999c. p. 233-306.

SANTOS, L. C. M. **Detecção e identificação de micoplasmas em culturas celulares por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SARMA, P. S.; LOG, T. Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. **Virology**, v. 54, n. 1, p. 160-169, 1973.

SCHMITT, A. C.; REISCHAK, D.; CAVLAC, C. L.; MONFORTE, C. H. L.; COUTO, F. T.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SANTOS, D. G. G.; SOUZA, L.; ALVES, C.; VECCHI, K. Infecção pelo vírus da leucemia felina e da peritonite infecciosa felina em felídeo selvagem de vida livre e de cativeiro da região do Pantanal matogrossense. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 185-188, 2003.

SHEWEN, P. E.; POVEY, R. C.; WILSON, M. R. A survey of the conjunctival flora of clinically normal cats and cats with conjunctivitis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 21, n. 8, p. 231-233, 1980.

SHI, Y; ROY-BURMAN, P. A novel truncated env gene isolated from a feline leukemia virus-induced thymic lymphosarcoma. **Journal of Virology**, v. 74, n. 3, p. 1451-1456, 2000.

SILVA, J. C. R.; ADANIA, C. H. Carnívora – *Felidae* (onça suçuarana, jaguatirica, gato-domato). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2006. p. 505-546.

SPARKES, A. H. Feline leukaemia virus and vaccination. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, n. 2, p. 97-100, 2003.

SPARKES, A. H.; HOPPER, C. D.; MILLAR, W. G.; GRUFFYD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Feline immunodeficiency virus infection. Clinicopathologic findings in 90 naturally occurring cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, n. 2, p. 85-90, 1993.

STEWART, M. A.; WARNOCK, M.; WHEELER, A.; WILKIE, N.; MULLINS, J. I.; ONIONS, D. E.; NEIL, J. C. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. **Journal of Virology**, v. 58, n. 3, p. 825-834, 1986.

STOCKHAM, S. L.; KEETON, K. S.; SZLADOVITS, B. Clinical assessment of leukocytosis: distinguishing leukocytoses caused by inflammatory, glucocorticoid, physiologic, and leukemic disorders or conditions. **The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p. 1335-1358, 2003.

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

SYKES, J. E.; DRAZENOVICH, N. L.; BALL, L. M.; LEUTENEGGER, C. M. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 4, p. 685-693, 2007a.

SYKES, J. E.; DRAZENOVICH, N. L.; KYLES, A. E.; BALL, L. M.; LEUTENEGGER, C. M. Detection of mixed infections with “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 3, p. 250-255, 2007b.

SYKES, J. E.; HENN, J. B.; KASTEN, R. W.; ALLEN, C.; CHOMEL, B. B. *Bartonella henselae* infection in splenectomized domestic cats previously infected with hemotropic *Mycoplasma* species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, n. 1-2, p. 104-108, 2007c.

TAN, R. J. S. Susceptibility of kittens to *Mycoplasma felis* infection. **Japanese Journal of Experimental Medicine**, v. 44, n. 3, p. 235-240, 1974.

TAN, R. J. S.; LIM, E. W.; ISHAK, B. Ecology of mycoplasmas in clinically healthy cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, n. 11, p. 515-518, 1977.

TAN, R. J. S.; MARKHAM, J. Isolation of mycoplasma from cats with conjunctivitis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 19, n. 1-2, p. 28, 1971.

TAN, R. J. S.; MILES, J. A. R. Mycoplasma isolations from clinically normal cats. **British Veterinary Journal**, v. 128, n. 2, p. 87-90, 1972.

TAN, R. J. S.; MILES, J. A. R. Incidence and significance of mycoplasma in sick cats. **Research in Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 27-34, 1974.

TARIGO, J. L.; GRINDEM, C.B.; TUCKER, M. D.; MARR, H.S.; BIRKENHEUER, A. J. Use of PCR and cytology to assess prevalence of *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in feral cats in North Carolina. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 3, p. 372, 2006. Suplemento.

TAROURA, S.; SAKATA, Y.; MIYAMA, T.; HIRAOKA, H.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of DNA of “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Spiroplasma* sp in unfed ticks collected from vegetation in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 12, p. 1277-1279, 2005.

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

TASKER, S.; BINNS, S. H.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A.; DAY, M. J. Evaluation of retroviral status of UK cats in relation to haemoplasma status, using real-time PCR assays for diagnosis. In: Annual British Small Animal Veterinary Association Congress, 2003, Birmingham, UK. **Anais...** 2003. v. 1, p. 558.

TASKER, S.; CANEY, S. M.; DAY, M. J.; DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; KNOWLES, T. G.; LAIT, P. J.; PINCHES, M. D.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' infection. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 3, p. 653-661, 2006a.

TASKER, S.; CANEY, S. M.; DAY, M. J.; DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; KNOWLES, T. G.; LAIT, P. J.; PINCHES, M. D.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 2-4, p. 169-179, 2006b.

TASKER, S.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; HARBOUR, D. A.; SHAW, S. E.; HARRUS, S.; BANETH, G.; LOBETTI, R. G. MALIK, R.; BEAUFILS, J. P.; BELFORD, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3877-3880, 2003.

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

TIZARD, I. R. Secondary Immunological Defects. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary immunology: an introduction**. 7 ed. Philadelphia: Saunders Company, 2004. p. 428-440.

TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds.) **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma**, v.1, Academic Press, Inc. San Diego, California, 1995, p. 33-40.

TULLY, J. G.; BRADBURY, J. M. **Taxa covered by the ICSP Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes**, 2003. Disponível em: <<http://www.the-icsp.org/taxa/mollicuteslist.htm>>. Acesso em: 26 nov. 2007.

UENO, J.; HOHDATSU, T.; MURAMATSU, Y.; KOYAMA, H.; MORITA, C. Does coinfection of *Bartonella henselae* and feline immunodeficiency virus induce clinical disorders in cats? **Microbiology and Immunology**, v. 40, n. 9, p. 617-620, 1996.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; QUINT, W. G. V.; NIESTERS, J. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus and Species-Specific Identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA Amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 2606-2615, 1992.

VOLOKHOV, D. V.; NEVEROV, A. A.; GEORGE, J.; KONG, H.; LIU, S. X.; ANDERSON, C.; DAVIDSON, M. K.; CHIZHIKOV, V. Genetic analysis of housekeeping genes of members of the genus *Acholeplasma*: phylogeny and complementary molecular markers to the 16S rRNA gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 2, p. 699-710, 2007.

WEAVER, J. L.; JOHNSON, M. R. Hematologic and serum chemistry values of captive Canadian lynx. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p. 212-215, 1995.

WEISBURG, W. G.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; PETZEL, J. P.; OYAIZU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SEHREST, J.; LAWRENCE, T. G.; VAN ETTEN, J.; MANILOFF, J.; WOESE, C. R. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 12, p. 6455-6467, 1989.

WHITLEY, R. D. Canine and feline primary ocular bacterial infections. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, n. 5, p. 1151-1167, 2000.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 961-969, 2006a.

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, pp. 2581-2585, 2005.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; MELI, M. L.; BERNASCONI, M. V.; CASATI, S.; HEGGLIN, D.; PUORGER, M.; NEIMARK, H.; CATTORI, V.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3798-3802, 2007c.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; TASKER, S.; MELI, M.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, v. 125, n. 3-4, p. 197-209, 2007a.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; ROELKE, M. E.; RYSER-DEGIORGIS, M. P.; LEUTENEGGER, C. M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159-1166, 2007b.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F. S.; DOHERR, M. G.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; LOBETTI, R. G.; MALIK, R.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Phylogenetic analysis of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” isolates from pets 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, 2006b.

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

YAMAMOTO, K.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; HEW, C. M.; WEBER, D. K.; LEE, W. I.; DROZ, S.; KOEHLER, J. E. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella koehlerae* and comparison of protein and DNA profiles with those of other *Bartonella* species infecting felines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 466-474, 2002a.

YAMAMOTO, K.; CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W.; HEW, C. M.; WEBER, D. K.; LEE, W. I. Experimental infection of specific pathogen free (SPF) cats with two different strains of *Bartonella henselae* type I: a comparative study. **Veterinary Research**, v. 33, n. 6, p. 669-684, 2002b.

YAMAMOTO, K.; CHOMEL, B. B.; LOWENSTINE, L. J.; KIKUCHI, Y.; PHILLIPS, L. G.; BARR, B. C.; SWIFT, P. K.; JONES, K. R.; RILEY, S. P.; KASTEN, R. W.; FOLEY, J. E.;

PEDERSEN, N. C. *Bartonella henselae* antibody prevalence in free-ranging and captive wild felids from California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 1, p. 56-63, 1998.

YAMAO, F.; MUTO, A.; KAWAUCHI, Y.; IWAMI, M.; IWAGAMI, S.; AZUMI, Y.; OSAWA, S. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 82, n. 8, p. 2306-2309, 1985.



## APÊNDICE A – Identificação individualizada dos animais do Refúgio Bela Vista

<b>Espécie</b>	<b>Número no Refúgio Bela Vista</b>	<b>Sexo<sup>3</sup></b>	<b>Origem</b>
<b><i>L. geoffroyi</i></b>			
<b>(n=1)</b>			
1	2336/ 1	M	VL <sup>1</sup>
<b><i>P. yagouaroundi</i></b>			
<b>(n=3)</b>			
2	1963/ 2	M	VL
3	1785/ 27	F	VL
4	1811/ 36	M	NC <sup>2</sup>
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>1F/ 2M</b>	<b>2VL/ 1NC</b>
<b><i>L. pardalis</i></b>			
<b>(n=14)</b>			
5	0038/ 12	F	VL
6	2386/ 16	F	VL
7	1730/ 29	F	NC
8	2324/ 30	M	VL
9	2323/ 31	M	VL
10	2029/ 32	F	NC
11	1159/ 33	F	VL
12	1897/ 34	F	NC
13	1478/ 35	F	NC
14	0039/ 37	M	NC
15	2325/ 54	F	VL
16	2322/ 55	F	VL
17	1720/ 56	M	NC
18	2103/ 57	M	NC
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>9 (62,3 %) F/ 5 (35,7 %) M</b>	<b>7 (50,0 %)VL/ 7 (50,0 %) NC</b>
<b><i>L. weidii</i></b>			
<b>(n=17)</b>			
19	1883/ 03	M	NC
20	1851/ 04	M	NC
21	2333/ 05	M	VL
22	1698/ 06	M	NC
23	1162/ 09	M	VL
24	1801/ 13	M	VL
25	1374/ 14	M	VL
26	1242/ 44	F	VL
27	1751/ 45	F	VL
28	2335/ 46	F	NC
29	2099/ 47	F	NC
30	0595/ 48	F	VL

<b>Espécie</b>	<b>Número no Refúgio Bela Vista</b>	<b>Sexo<sup>3</sup></b>	<b>Origem</b>
31	0189/ 49	F	VL
32	1806/ 50	F	NC
33	1495/ 51	M	NC
34	2185/ 52	F	NC
35	2100/ 53	F	NC
<b>Total</b>		<b>9 (53,0 %) F/ 8 (47,0 %) M</b>	<b>8 (43,7 %) VL/ 9 (56,3 %) NC</b>
<b><i>L. tigrinus</i></b>			
<b>(n=22)</b>			
36	2334/ 07	M	NC
37	2208/ 08	M	VL
38	1161/ 10	M	VL
39	1830/ 11	M	VL
40	1829/ 15	M	VL
41	1907/ 17	M	VL
42	2155/ 18	F	VL
43	2060/ 19	F	VL
44	2061/ 20	F	VL
45	1909/ 21	F	NC
46	2284/ 22	F	VL
47	1092/ 23	F	VL
48	1328/ 24	M	NC
49	1373/ 25	M	VL
50	1820/ 26	M	NC
51	1821/ 28	M	NC
52	1707/ 38	F	NC
53	16/20/ 39	F	VL
54	1895/ 40	F	VL
55	0205/ 41	F	VL
56	2188/ 42	F	VL
57	1722/ 43	M	VL
<b>Total</b>	-	<b>11 (50,0 %) F/ 11 (50,0%) M</b>	<b>16 (72,7 %)VL/ 6 (27,3 %) NC</b>
<b>Total geral</b>	-	<b>30 (52,6 %) F/ 27 (47,4 %) M</b>	<b>34 (59,6 %)VL/ 23 (40,4 %) NC</b>

<sup>1</sup> VL = animal oriundo de vida livre

<sup>2</sup> NC = animal nascido em cativeiro

<sup>3</sup> M = macho, F= fêmea

? Dados não disponíveis



(continuação)

	<i>P. yagouaroundi</i> (n=3)		<i>L. geoffroyii</i> (n=1)		<i>L. tigrinus</i> (n=22)		<i>L. weidii</i> (n=17)		<i>L. pardalis</i> (n=14)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>Desidratação (n)</b>	-	-	-	-	-	2	2	6	1	1
Ht (%) (média)						46,5	53,0	43,6	46,0	47,0
(desvio padrão)	-	-	-	-	-	(2,12)	(0,0)	(3,4)	(0,0)	(0,0)
PPT (g/dL) (média)	-	-	-	-	-	7,85	7,8	7,7	8,2	8,6
(desvio padrão)						(0,07)	(0,28)	(0,16)	(0,0)	(0,0)
<b>Estresse (n)</b>	1	-	-	-	3	1	-	3	3	1
Ht (%) (média)	49,0				48,66	47		40	46,0	48,0
(desvio padrão)	(0,0)	-	-	-	(1,15)	(0,0)	-	(0,0)	(1,73)	(0,0)
PPT (g/dL) (média)	7,2	-	-	-	7,4	7,5	-	7,26	6,53	6,8
(desvio padrão)	(0,0)				(0,34)	(0,0)		(0,11)	(2,02)	(0,0)

(continuação)

	<i>P. yagouaroundi</i> (n=3)		<i>L. geoffroyii</i> (n=1)		<i>L. tigrinus</i> (n=22)		<i>L. weidii</i> (n=17)		<i>L. pardalis</i> (n=14)	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
<b>LEUCOGRAMA</b>										
<b>Normal (n)</b>	-	<b>1</b>	<b>1</b>	-	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
(leucócitos/mm <sup>3</sup> ) <sup>4</sup>	-	7400	6650	-	6316,6	6387,5	8700	7925	8400	10190
(desvio padrão)		(0,0)	(0,0)		(2507)	(1679)	(0,0)	(1308)	(1609,3)	(1873,3)
<b>Leucopenia (n)</b>	<b>2</b>	-	-	-	-	-	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
(leucócitos/mm <sup>3</sup> )	3000	-	-	-	-	-	5691,6	5791,6	3900	4983,33
(desvio padrão)	(0,0)						(1168,5)	(1235)	(0,0)	(1037,2)
<b>Leucocitose (n)</b>	-	-	-	-	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
(leucócitos/mm <sup>3</sup> )	-	-	-	-	10825	10233	13550	13000	12600	13650
(desvio padrão)					(1662)	(529,9)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)

<sup>1</sup> (n) = número de animais.<sup>2</sup> Ht = hematócrito<sup>3</sup> PPT = proteína plasmática total<sup>4</sup> (leucócitos/mm<sup>3</sup>) = média do número de leucócitos<sup>5</sup> Não existem animais com essa alteração

APÊNDICE C – Resultado individualizado da detecção de agentes infecciosos em amostras de felídeos do Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu, Brasil

<b>Espécies/ identificação amostras<sup>1</sup></b>	<b>DNA proviral de FeLV</b>	<b>M. <i>haemofelis</i></b>	<b><i>Bartonella</i> spp</b>	<b><i>Mollicutes</i> em orofaringe</b>	<b><i>Mollicutes</i> em conjuntiva</b>
<b><i>L. geoffroyi</i> (n=1)</b>					
1	-	-	P	P	P
<b><i>P. yagouaroundi</i> (n=3)</b>					
2	-	-	P	P	P
3	-	-	-	-	P
4	-	-	-	P	-
<b>Total</b>	-	-	<b>1 (33,3%)</b>	<b>2 (66,6%)</b>	<b>2 (66,6%)</b>
<b><i>L. pardalis</i> (n=14)</b>					
5	-	-	-	P	-
6	-	-	-	P	-
7	-	-	-	P	-
8	-	-	P	P	P
9	-	-	-	P	P
10	-	-	-	P	P
11	-	-	-	P	-
12	-	-	-	-	P
13	-	-	-	P	-
14	P	-	-	P	-
15	-	-	-	P	-
16	-	-	-	P	-
17	-	-	-	P	P
18	-	-	-	P	-
<b>Total</b>	<b>1 (7,1%)</b>	-	<b>1 (7,1 %)</b>	<b>13 (92,8 %)</b>	<b>5 (35,7 %)</b>
<b><i>L. weidii</i> (n=17)</b>					
19	-	P	-	P	P
20	-	-	P	P	P
21	-	-	P	P	-
22	-	-	-	P	P
23	-	-	-	P	P
24	-	-	-	P	P
25	-	-	-	P	P
26	-	-	-	P	P
27	-	-	-	P	P
28	-	-	-	P	-
29	-	-	-	P	-

(continuação)

<b>Espécies/ identificação amostras<sup>1</sup></b>	<b>DNA proviral de FeLV</b>	<b>M. <i>haemofelis</i></b>	<b><i>Bartonella</i> spp</b>	<b><i>Mollicutes</i> em orofaringe</b>	<b><i>Mollicutes</i> em conjuntiva</b>
30	-	-	-	-	-
31	-	-	-	P	-
32	-	-	-	P	-
33	-	-	P	P	-
34	-	-	-	P	-
35	-	-	-	-	P
<b>Total</b>	-	<b>1 (5,8 %)</b>	<b>3 (17,6 %)</b>	<b>15 (88,2 %)</b>	<b>9 (52,9 %)</b>
<b><i>L. tigrinus</i> (n=22)</b>					
36	-	-	-	P	-
37	-	-	P	P	-
38	-	-	-	P	-
39	-	-	P	P	-
40	-	-	-	P	P
41	-	-	-	P	P
42	-	-	-	P	P
43	-	-	-	P	P
44	-	-	-	P	P
45	-	-	-	P	P
46	-	-	-	P	P
47	-	-	-	P	P
48	-	-	-	P	-
49	-	-	-	P	-
50	-	-	-	P	-
51	-	-	P	P	-
52	P	-	-	P	P
53	-	-	-	P	-
54	-	-	-	P	-
55	-	-	-	P	P
56	-	-	-	P	-
57	-	-	-	P	-
<b>Total</b>	<b>1 (4,5 %)</b>	-	<b>3 (13,6 %)</b>	<b>22 (100 %)</b>	<b>10 (45,4 %)</b>
<b>Total (n=57)</b>	<b>2 (3,5 %)</b>	<b>1 (1,8 %)</b>	<b>9 (15,8 %)</b>	<b>53 (93,0 %)</b>	<b>27 (47,3%)</b>

<sup>1</sup> Identificação das amostras no Apêndice A.

## ANEXO A – Meios de cultura

## 1) Meio de cultura SP4 – 1 litro (TULLY et al., 1995)

## Meio base:

- 10g de Triptona (Accumedia, Michigan, EUA)
- 5,3 g de Peptona (Accumedia, Michigan, EUA)
- 3,5 g de Base para micoplasma (*Mycoplasma broth base*; Becton, Dickson e Company, Maryland, EUA)
- adicionar água MilliQ para 750 mL
- Quando meio sólido adicionar Ágar Noble a 1% (BD, Maryland, EUA)
- Ajustar pH para 7,8
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e adicionar os suplementos\* abaixo listados.

## \* Suplementos:

- 180 mL de soro equino inativado por calor (Invitrogen, New York, EUA)
- 50 mL de CRML 1066 modificado (com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio) (MP Biomedicals, Ohio, EUA) filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil)
- 35 mL de extrato de levedura fresco a 25% filtrado em membrana de 0,22 µm
- 10 mL de D-glicose 10% (Synth, São Paulo, Brasil) filtrado em membrana de 0,22 µm
- 1 mL de L- arginina 10% (Sigma Chemical Company, Missouri, EUA) filtrado em membrana de 0,22 µm
- 10 mL de *Bacto TC Yeastolate* 20% (BD Biosciences, Maryland, EUA) filtrado em membrana de 0,22 µm
- 4 mL de vermelho de fenol a 0,5% autoclavado
- 1 mL de penicilina G 100000 U/mL (Sigma Chemical Company, Missouri, EUA) filtrado em membrana de 0,22 µm
- 10 mL de acetato de tálio 1% (Sigma Chemical Company, Missouri, EUA) filtrado em membrana de 0,22 µm
- Realizar teste de esterilidade por 24 horas a 37 °C.



## 2) Ágar Columbia com 5% de sangue de ovino desfibrinado

- 44 g de Difco Columbia Blood Agar Base (BD, Maryland, EUA) para 1 L de água ultrapura. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e adicionar 5% de sangue de ovino desfibrinado.
- Realizar teste de esterilidade por 24 horas a 37 °C

## 3) TSB (caldo tripticase e soja)

- 30 g de Bacto Tryptic Soy Broth (BD, Maryland, EUA) para 1L de água ultrapura. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e realizar teste de esterilidade por 24 horas a 37 °C

## 4) Ágar Cetrimide

- 45,3 g de Cetrimide agar (Accumedia, Maryland, EUA)
- 10 mL de glicerol puro estéril
- 1 L de água ultrapura
- Aquecer para dissolver completamente
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e realizar teste de esterilidade por 24 horas a 37 °C

## 5) Ágar MacConkey

- 50 g de MacCONKEY agar (Accumedia, Maryland, EUA) para 1 L de água ultrapura.
- Aquecer para dissolver completamente
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e realizar teste de esterilidade por 24 horas a 37 °C

## 6) Ágar Manitol

- 111g de Ágar Manitol (Synth, São Paulo, Brasil) para 1 L de água ultrapura
- Aquecer para dissolver completamente
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e realizar teste de esterilidade por 24 horas a 37 °C

### 7) Meio Luria Bertani (LB)

- 10 g de triptona (Accumedia, Michigan, EUA)
- 5 g de extrato de levedura (Biobrás Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil)
- 5 g de cloreto de sódio (NaCl) (Sigma Chemical Company, Missouri, EUA)
- Quando meio sólido, adicionar ágar bacteriológico a 1,5%
- 1 L de água ultrapura
- ajustar pH para 7,0
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e realizar teste de esterilidade por 24 horas a 37 °C

### 8) Meio SOC

- 2g de triptona (Accumedia, Michigan, EUA)
- 0,5 g de extrato de levedura (Biobrás Diagnósticos, Minas Gerais, Brasil)
- 1 mL de NaCl 1M
- 0,25 ml de cloreto de potássio (KCl) 1M
- 97 ml de água ultrapura
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos e adicionar 1 mL de  $Mg^{2+}$  2M \* e 1 mL de D-glicose 2M, filtrados em membrana 0,22  $\mu$ m.
- \* solução de  $Mg^{2+}$  2M: 20,33 g de  $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ ; 24,65 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; água ultrapura até 100 mL.

### 9) Placas LB com ampicilina, X-Gal e IPTG

Preparar meio LB sólido, fundir e deixar esfriar até aproximadamente 50 °C. Adicionar então ampicilina a 100  $\mu$ g/mL, 0,5 mM de IPTG e 80  $\mu$ g/mL de X-Gal e distribuir em placas estéreis. A ampicilina, o X-gal e o IPTG foram esterilizados anteriormente por filtração em membrana 0,22  $\mu$ m.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)