



*Aline Santana da Hora*

**Micoplasmas hemotrópicos como  
potenciais agentes causadores de anemia  
em felinos domésticos**

**São Paulo  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ALINE SANTANA DA HORA**

**Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores  
de anemia em felinos domésticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

**Departamento:**  
Clínica Médica

**Área de concentração:**  
Clínica Veterinária

**Orientador:**  
Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara

São Paulo  
2008

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.2011 FMVZ	<p>Hora, Aline Santana da Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos / Aline Santana da Hora. – São Paulo : A. S. Hora, 2008. 75 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2008.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária. Orientador: Profa Dra Mitika Kuribayashi Hagiwara.</p> <p>1. Micoplasmas hemotrópicos. 2. Anemia. 3. <i>Mycoplasma</i> spp. 4. Vírus da leucemia felina. 5. Vírus da imunodeficiência felinos. I. Título.</p>
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

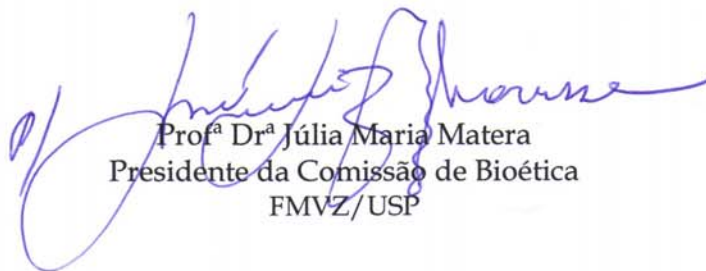
*Comissão Bioética*

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Mycoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos", protocolo nº780/2005, utilizando 150 gatos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Hemotropic mycoplasmas as potencial cause of anemia in domestic cats", protocol number 780/2005, under the responsibility of Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara, utilizing 150 cats, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 11 de abril de 2006



Profª Drª Júlia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HORA, Aline Santana da

Título: Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do 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

“Se procurar bem você acaba encontrando.  
Não a explicação (duvidosa) da vida,  
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”

**Carlos Drummond de Andrade**

À minha mãe, *Nair*, que por sua força e amor me conduziu pela vida.

“O valor das coisas não está no tempo que  
elas duram, mas na intensidade com que  
acontecem.  
Por isso, existem momentos inesquecíveis,  
coisas inexplicáveis e pessoas  
incomparáveis.”

**Fernando Pessoa**

Ao meu amor, *Moacyr*, por toda amizade, dedicação, compreensão, carinho,  
atenção, apoio ..., enfim por todo amor.

“Um gato vive um pouco nas poltronas, no cimento ao sol, no telhado sob a lua. Vive também sobre a mesa do escritório, e o salto preciso que ele dá para atingi-la é mais do que impulso para a cultura. É o movimento civilizado de um organismo plenamente ajustado às leis físicas, e que não carece de suplemento de informação. Livros e papéis beneficiam-se com a sua presteza austera. Mais do que a coruja, o gato é símbolo e guardião da vida intelectual.”

**Carlos Drummond de Andrade**

“Nossa tarefa deveria ser nos libertarmos ... aumentando o nosso círculo de compaixão para envolver todas as criaturas viventes, toda a natureza e sua beleza.”

**Albert Einstein**

**Baby, Cabrita, Cindy, Darling** (*in memorian*), **Elizabeth, Lelê** (*in memorian*), **Marlyn** (*in memorian*), **Melissa, Miau, Preta, Sadam, Tene, Titi** a possibilidade de poder observar a beleza, astúcia e individualidade de vocês foi e é incomensurável.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara** pela orientação, ensinamentos, oportunidades, apoio, e principalmente por acreditar na minha capacidade.

À Fundação de **Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de mestrado (Proc. 05/57482) e do auxílio à pesquisa (Proc. 06/50544-3).

Ao **Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior**, por me acolher no Laboratório de Diagnóstico Molecular, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB – UNESP – Botucatu, para que eu aprendesse a engatilhar na biologia molecular, e pela oportunidade de poder admirar todo seu brilhantismo intelectual.

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão**, que sempre colaborou comigo por meio de seu profundo conhecimento virológico, e de diagnóstico e seqüenciamento molecular. Além de co-orientador, um grande amigo. Paulãuns, muito obrigada por tudo!

Ao **Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain** que em conjunto com o **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão** abriram as portas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) – FMVZ – USP, para que eu pudesse realizar os testes moleculares desse estudo.

À **Maria Helena Pelissari, Maria Luisa Franchini e Samantha Ive Myashiro** (vulgo Neusa), mais que laboratoristas do Hospital Veterinário (HOVET) e do Departamento de Clínica Médica (VCM) – FMVZ – USP que muito contribuíram para esse estudo, vocês foram e são peças fundamentais na minha vida. Amo vocês!

À **Maiara Leme e Cecília Augusto**, fiéis escudeiras, sempre dispostas a segurar mais um gato para as coletas de sangue, debaixo de chuva ou sol. A convivência e amizade de vocês foi uma das melhores lembranças que carregarei para sempre.

À minha amiga “cinomótica” (como eu), **Quélin Vanaz**, a minha amiga e uma das melhores veterinárias de felinos, **Kátia Barão**, aos meus irmãos, **Carlos Alberto Erpen** e **Rubens Almeida**, aos meus professores de graduação e amigos, **Henry Carlesso** (pai) e **Aury Moraes**, por fazerem parte daquele seleta grupo de amigos para todas as horas, os quais estão ao meu lado há muito tempo, e sempre estarão em meu coração, mesmo estando distantes.

Ao **Thiago Batista Neves**, com quem aprendi as primeiras PCRs e que desde o início sempre me deu conselhos e ajudas “PCRéricas”, mesmo à distância.

À **Sheila Oliveira e Adriana Cortez**, que sempre me auxiliaram nas questões moleculares.

Professores do Departamento de Clínica Médica, que muito contribuíram para minha formação profissional. Em especial ao **Prof. Dr. Archivaldo Reche Junior** que muito colaborou com esse estudo.

À **Cláudia Regina Strignolo** pelo auxílio com a técnica de imunofluorescência.

Médicos veterinários, residentes e enfermeiros do serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais, que sempre estavam dispostos e preocupados em me ajudar a obter os felinos necessários.

Aos pós-graduandos e ex-pós-graduandos do VCM e VPS, **Ângela Manetti, Bruno Teixeira, Carlos Alberto Geraldo Junior, Carolina Zaghi, Cynthia Venâncio, Estela Gallucci, Humberto Minervino, Leila Taranti, Magda Leal, Mônica Kanashiro, Ricardo Duarte, Sibele Souza (Sibelãuns) e Thaisa Sandri**, a amizade e ajuda de vocês foram de extrema importância para a conclusão desse trabalho.

À toda família **Miyashiro**, em especial a **Tereza e Jorge** que sempre me acolheram com muito carinho em seu lar.

Ao **Lucas Santana**, por tornar os momentos de espera no LABMAS mais agradáveis, por compartilhar alegrias e tristezas PCRérricas, principalmente quando víamos banda onde não devia haver ou não as encontrávamos quando queríamos.

À **Gisele** e ao **Guerra** que sempre me receberam em sua casa de braços abertos para mais uma coleta. A obstinação de vocês para com os animais é admirável.

Ao **Maurício Marquezi** por ceder gentilmente a amostra sangüínea do Bu que foi fundamental para esse estudo.

À todos os proprietários e seus animais que permitiram a coleta de sangue, principalmente, aqueles proprietários que cederam amostras biológicas de seus felinos hígidos, por gesto de amizade e/ou de colaboração com a ciência o fizeram de coração.

## RESUMO

**HORA, A. L.** Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos. [Hemotrophic mycoplasmas as potential cause of anemia in domestic cats]. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Com o objetivo de avaliar a magnitude da infecção por micoplasmas hemotrópicos nos felinos anêmicos, amostras sanguíneas de 270 felinos anêmicos ( $Ht \leq 29\%$ ) e 53 felinos saudáveis foram submetidas à exames hematológicos, bioquímicos séricos (proteína total, albumina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gamaglutamil transferase, bilirrubinas, uréia e creatinina), avaliação citológica do esfregaço sanguíneo e testes moleculares para a detecção de material genético de *Mycoplasma* spp. Foram encontradas 25 amostras positivas no grupo dos felinos anêmicos, pela técnica de Nested-PCR utilizando-se primers que amplificam fragmentos do gene 16S rRNA dos hemoplasmas. Dentre as amostras positivas, 23 foram caracterizadas por meio de seqüenciamento como *Mycoplasma haemofelis* e as duas restantes como “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e *Mycoplasma haemocanis*, respectivamente. As seqüências de nucleotídeos encontradas nesse estudo estão disponíveis no GenBank, sob os números de acesso EU442616 a EU442640, sendo os números EU442629 e EU442623, referentes ao “*Candidatus M. turicensis*” e *M. haemocanis*, respectivamente. Nos felinos infectados por *M. haemofelis* a anemia foi mais intensa quando comparados aos animais anêmicos negativos para qualquer uma das espécies de micoplasmas. Quanto à bioquímica sérica, as concentrações das bilirrubinas e a atividade sérica da ALT foram maiores nos felinos infectados. Adicionalmente, com o intuito de avaliar o papel desempenhado pelos retrovírus no desenvolvimento ou agravamento da anemia causada por micoplasmas hemotrópicos, todos os felinos foram avaliados quanto à infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV), por meio de testes imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção de ambos os vírus, de imunofluorescência indireta para detecção do antígeno do FeLV e de técnicas moleculares de detecção do DNA viral do FIV. Dentre os felinos saudáveis não foi observada nenhuma amostra positiva para os micoplasmas hemotrópicos e/ou

retrovírus. A associação entre *M. haemofelis* e FIV ( $p=0,009$ ) e entre o *M. haemofelis* e FeLV ( $p=0,015$ ), foi evidenciada. O felino infectado por “*Candidatus M. turicensis*” apresentou discreta diminuição do hematócrito e ausência de sinais de regeneração medular e o felino positivo para *M. haemocanis* apresentou anemia mais profunda com sinais de regeneração. No primeiro a infecção por nenhum dos retrovírus foi identificada, enquanto que o segundo apresentou co-infecção por FIV e FeLV. As informações obtidas das alterações hematológicas e bioquímicas correlacionadas à infecção pelo *M. haemofelis* evidenciaram o potencial patogênico dessa espécie de micoplasma hemotrópico. A disfunção imunológica resultante da infecção pelos retrovírus pode predispor à infecção por *M. haemofelis*, não se excluindo a possibilidade de infecção por outros hemoplasmas.

Palavras-chave: Micoplasmas hemotrópicos. Felinos. Anemia. *Mycoplasma* spp. Vírus da leucemia felina. Vírus da imunodeficiência felina.

**HORA, A. L.** Hemotrophic mycoplasmas as potential cause of anemia in domestic cats [Mycoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos]. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The present study aimed to evaluate the magnitude of the hemotrophic mycoplasmas infections in anemic cats. Samples from 270 anemic cats ( $PCV \leq 29\%$ ) and 53 healthy cats were submitted to hematological analysis (CBC, cytologic evaluation of blood smear), serum biochemistry (total protein, albumin, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma glutamil transferase, bilirubins, urea and creatinin), and molecular assays for hemoplasma DNA detection in blood samples. Among the anemic cats, 25 samples were positive by Nested-PCR for the genus *Mycoplasma* using primers targeting the 16S rRNA. For species identification, sequencing of the products revealed that 23 cats were infected with *Mycoplasma haemofelis*, one with “*Candidatus M. turicensis*” and another with *M. haemocanis*. The GenBank accession numbers of the nucleotide sequences derived in this study are from EU442616 to EU442640 (EU442629 and EU442623 refer to “*Candidatus M. turicensis*” and *M. haemocanis*, respectively). *M. haemofelis*-infected cats presented significantly more severe anemia and higher bilirubins concentration and ALT serum activity. Additionally, with purpose to evaluate the role play by the retrovirus in the development or aggravation of the anemia caused by hemotrophic mycoplasmas, all cats were tested for FeLV p27 antigenemia by enzyme-linked immunosorbent assay and by indirect immunofluorescence, and anti-FIV antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay and viral DNA by Nested-PCR. None of the healthy cats presented infection with hemotrophic mycoplasmas and/or retroviruses. The association between *M. haemofelis* and retroviruses (FIV,  $p=0,009$  and FeLV,  $p=0,015$ ) in anemic cats was evidenced. In the “*Candidatus M. turicensis*”-infected cat, slightly decreased hematocrit with no signs of regeneration were observed; and in the *M. haemocanis*-infected cat anemia was severe and regenerative. In the first, retroviruses infections were not detected, whereas the second was infected with FIV and FeLV. The hematological and biochemistry abnormalities correlated to the *M. haemofelis* infection had evidenced the pathogenic potential of this hemoplasma species. In conclusion, immunological dysfunction resulting from retrovirus infection

may predispose to *M. haemofelis* infection, without excluding the possibility of infection with other hemoplasma.

Key words: Hemotrophic mycoplasmas. Feline. Anemia. *Mycoplasma* spp. Feline leukemia virus. Feline immunodeficiency virus.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esfregaço sangüíneo de um felino anêmico. As estruturas epicelulares dos micoplasmas hemotrópicos são observadas como formas cocóides na superfície das hemácias (1.000X). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007..... 40
- Figura 2 – Gel de agarose 1,5% após eletroforese. Resultado da Nested-PCR (675bp) para *Mycoplasma* spp. Linha 1: controle positivo; linha 2: controle negativo, linhas, linhas: 3 e 5 amostras positivas; linhas 4 e 6: amostras negativas. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007..... 40

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Distribuição dos felinos anêmicos de acordo com a faixa etária e a infecção por <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	42
Gráfico 2 –	Distribuição dos felinos anêmicos de acordo com as características raciais e a infecção por <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	43
Gráfico 3 –	Distribuição dos felinos de acordo com o sexo e a infecção pelo <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	44
Gráfico 4 –	Box-plot dos felinos anêmicos da atividade sérica da ALT de acordo com a presença do <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	47
Gráfico 5 –	Box-plot dos felinos anêmicos de acordo com as concentrações séricas de bilirrubinas total, direta e indireta e com a presença do <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	48



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediana, primeiro e terceiro quartis* das variáveis hematológicas e bioquímicas séricas dos felinos anêmicos (grupo A), saudáveis (grupo C) e valores de referência. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	38
Tabela 2 – Frequência de positivos aos testes moleculares e à pesquisa citológica de <i>Mycoplasma</i> spp. nas amostras sanguíneas dos felinos anêmicos (n=270). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.	41
Tabela 3 – Mediana, primeiro e terceiro quartis, e nível de significância (p) das variáveis hematológicas e bioquímicas séricas dos felinos anêmicos de acordo com a infecção por <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	45
Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa de felinos de acordo com os diferentes graus de regeneração medular (nenhuma, leve, moderada e acentuada) de acordo com a infecção por <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	46
Tabela 5 – Frequência absoluta e relativa de felinos de acordo com a infecção pelos retrovírus (FIV e/ou FeLV) e a presença de <i>M. haemofelis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	49
Tabela 6 – Distribuição dos felinos de acordo com a faixa etária e as infecções por <i>M. haemofelis</i> e retrovírus (FIV e/ou FeLV). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	50
Tabela 7 – Frequência absoluta e relativa de felinos de acordo com o sexo e as infecções por <i>M. haemofelis</i> e retrovírus (FIV e/ou FeLV). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	50
Tabela 8 – Frequência absoluta e relativa de felinos positivos para <i>M. haemofelis</i> com relação à infecção pelos retrovírus (FIV e/ou FeLV) e a regeneração medular. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	51
Tabela 9 – Identificação, idade, sexo, características raciais, espécie de micoplasma hemotrópico, pesquisa de estruturas epicelulares de <i>Mycoplasma</i> spp., número de reticulócitos e infecção pelos retrovírus (FIV e/ou FeLV) nos felinos anêmicos positivos para os hemoplasmas (n=25). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	52
Tabela 10 – Valores de hemograma e bioquímica sérica dos felinos positivos para “ <i>Candidatus M. turicensis</i> ” e <i>M. haemocanis</i> . São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	nível de significância
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AST</b>	aspartato aminotransferase
<b>bp</b>	pares de base
<b>CHCM</b>	concentração de hemoglobina corpuscular média
<b>dL</b>	decilitros
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>DNase</b>	enzima que degrada o DNA
<b>dNTPs</b>	desoxirribonucleosídeos trifosfatados
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>FA</b>	fosfatase alcalina
<b>FeLV</b>	vírus da leucemia felina
<b>FIV</b>	vírus da imunodeficiência dos felinos
<b>fL</b>	fentolitros
<b>g</b>	gramas
<b>GGT</b>	gamaglutamil transferase
<b>HCM</b>	hemoglobina corpuscular média
<b>HOVET</b>	Hospital Veterinário
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biomédicas
<b>L</b>	litro
<b>M.</b>	<i>Mycoplasma</i>
<b>mg</b>	miligramas
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>MHF</b>	micoplasmose hemotrófica felina
<b>Mhf +</b>	Grupo de felinos anêmicos positivos na Nested-PCR para <i>M. haemofelis</i>
<b>Mhf -</b>	Grupo de felinos anêmicos negativos na Nested-PCR para <i>M. haemofelis</i>
<b>mL</b>	mililitro
<b>mL</b>	microlitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>ng</b>	nanogramas
<b>p</b>	valor crítico amostral
<b>PCR</b>	reação em cadeia pela polimerase
<b>Nested-PCR</b>	reação em cadeia da polimerase que amplifica uma seqüência interna de um fragmento previamente amplificado
<b>PCV</b>	<i>Packed cell volume</i> (volume globular)
<b>pg</b>	picogramas
<b>q.s.p.</b>	quantidade suficiente para
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RNAse</b>	enzima que degrada o RNA
<b>U</b>	unidade
<b>VCM</b>	volume corpuscular médio
<b>Ht</b>	hematócrito
<b>X</b>	vezes

## LISTA DE SÍMBOLOS

-	negativo
%	porcentagem
+	positivo
≤	menor e igual
=	igual
>	maior
±	mais ou menos
°C	graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de Literatura.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Coleta do material biológico.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Avaliação hematológica.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>Bioquímica sangüínea.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5</b>	<b>Testes para o diagnóstico da infecção pelos retrovírus .....</b>	<b>30</b>
3.5.1	Reação imunoenzimática.....	30
3.5.2	Teste de imunofluorescência indireta para detecção do antígeno do vírus da leucemia felina.....	30
3.5.3	Reação em cadeia pela polimerase para o vírus da imunodeficiência felina.....	31
<b>3.6</b>	<b>Extração do material genético.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7</b>	<b>Reação em cadeia pela polimerase para <i>Mycoplasma</i> spp.....</b>	<b>32</b>
<b>3.8</b>	<b>Avaliação dos resultados das reações em cadeia pelo polimerase.....</b>	<b>33</b>
<b>3.9</b>	<b>Seqüenciamento de DNA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.10</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>61</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>62</b>
	<b>Apêndices.....</b>	<b>70</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>72</b>

## 1 Introdução

Micoplasmose hemotrópica felina (MHF) é a denominação proposta por Sykes (2003) e aceita atualmente para designar a enfermidade causada pela infecção por *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e/ou “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”. Os micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas são agentes causais de anemia infecciosa em vários mamíferos (WILLI et al., 2007b). A infecção é considerada oportunista, porém, em condições de estresse (HARVEY, 2006) ou em presença de infecções concomitantes, especialmente infecção pelos retrovírus nos felinos (GRINDEM et al., 1990; GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002), pode resultar no desenvolvimento de intensa anemia em consequência do parasitismo celular, resultando no óbito do hospedeiro (SYKES, 2003; HARVEY, 2006). Existe uma considerável variação na apresentação clínica dos felinos infectados por *Mycoplasma* spp., creditada à diferença de patogenicidade entre as espécies (FOLEY et al., 1998; WILLI et al., 2007b) e à suscetibilidade do hospedeiro (MESSICK, 2004). Dentre os micoplasmas identificados em felinos, o *M. haemofelis* é considerado o mais patogênico, e a infecção por “*Candidatus M. haemominutum*” é considerada pouco patogênica (FOLEY et al., 1998; JENSEN et al., 2001; WESTFALL et al., 2001). Na maioria das vezes, o “*Candidatus M. haemominutum*” é detectado apenas por técnicas moleculares e em felinos aparentemente saudáveis (JENSEN et al., 2001), embora tenha sido também encontrado em felinos anêmicos (TASKER et al., 2003; SYKES et al., 2008), muitas vezes associado a *M. haemofelis* (JENSEN et al., 2001). Quanto ao “*Candidatus M. turicensis*”, foi recentemente relatado em um felino com anemia, tendo sido considerado tão patogênico quanto *M. haemofelis* por Willi et al. (2005), contudo a patogenicidade desse hemoplasma não está bem determinada (SYKES et al., 2008).

O diagnóstico da infecção se baseou até recentemente, na detecção do agente na superfície das hemácias (TASKER; LAPPIN, 2002), porém por ser um método pouco sensível, são comuns os resultados negativos falsos (SYKES, 2003; TASKER, 2006). A visualização microscópica dos micoplasmas em esfregaços sanguíneos não possibilita a diferenciação de espécies (WILLI et al., 2007b), e o “*Candidatus M. turicensis*”, não foi observado em esfregaços de sangue periférico

(SYKES et al., 2008). A diferenciação das três espécies de *Mycoplasma* spp., que infectam os felinos, só é possível por meio de técnicas moleculares que possibilitam o estudo do material genético do microrganismo, assim, esses testes constituem no melhor método para a identificação dos felinos infectados por micoplasmas hemotrópicos (WESTFALL et al., 2001; TASKER; LAPPIN, 2002; WILLI et al., 2007b; SYKES et al., 2008).

A infecção pelos hemoplasmas é amplamente disseminada, tendo sido descrita ao redor do mundo (BATISTA, 2004; LURIA et al., 2004; BAUMANN et al., 2006; WILLI et al., 2006b; WILLI et al., 2007c; SYKES et al., 2008). A prevalência da infecção é bastante variável, na dependência da localização geográfica, da amostra estudada e da metodologia diagnóstica utilizada (TASKER et al., 2003; WILLI et al., 2007b). No Brasil, foi relatada a ocorrência de *M. haemofelis* e “*Candidatus M. haemominutum*” entre os felinos domésticos (BATISTA, 2004; BAUMANN et al., 2006; MACIEIRA et al., 2007). A infecção pelo “*Candidatus M. turicensis*” foi relatada no Brasil apenas em felídeos selvagens (WILLI et al., 2007c).

A anemia é uma das alterações clínicas e de patologia clínicas mais frequentes na clínica de felinos (HAGIWARA, 2003). Entre as causas de anemia são citadas a MHF, a infecção pelo vírus da imunodeficiência dos felinos (FIV) e/ou vírus da leucemia felina (FeLV), idiossincrasias a fármacos, neoplasias, aplasia eritróide, hipoplasia medular, entre outros (THRALL et al., 2004). Dentre as causas, particular atenção deve ser dada à infecção por *M. haemofelis*, isoladamente ou em associação com a infecção pelos retrovírus, responsáveis pela imunossupressão frequentemente encontrada nos felinos.

Estruturas semelhantes aos micoplasmas hemotrópicos também foram encontrados em pacientes humanos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), aderidos aos eritrócitos (DUARTE et al., 1992). Segundo os autores, a imunossupressão progressiva causada pela SIDA pode predispor à instalação de infecções oportunistas, possibilitando também a infecção por patógenos de animais raramente vistos em humanos, como por exemplo, os micoplasmas hemotrópicos.

Embora a micoplasmose hemotrópica seja conhecida há muito tempo no Brasil, principalmente sob o aspecto clínico, o diagnóstico molecular da infecção por *M. haemofelis* e “*Candidatus M. haemominutum*” só foi realizado recentemente (BATISTA, 2004). Entretanto, nenhum estudo foi conduzido no sentido de elucidar o papel patogênico dessas espécies no desenvolvimento da anemia, já que, por serem

microrganismos oportunistas, podem ser encontrados em animais hígidos, como é relatado na literatura (HARVEY, 2006) causando apenas uma infecção inaparente. Também se desconhece a possível associação entre os micoplasmas hemotrópicos e a infecção pelos retrovírus (FIV e/ou FeLV) no desenvolvimento ou agravamento da anemia.

Constituem-se em objetivo do trabalho avaliar a magnitude da infecção por micoplasmas hemotrópicos nos felinos anêmicos, comparando-se com os felinos sem alterações hematológicas. Adicionalmente, avaliar o papel desempenhado pelos retrovírus no desenvolvimento ou agravamento da anemia causada por micoplasmas hemotrópicos.

## 2 Revisão de literatura

Anemia infecciosa felina ou hemobartonelose felina foi durante muito tempo a denominação da doença resultante da infecção dos felinos por *Haemobartonella felis* (VANSTEENHOUSE et al., 1993), organismo epicelular encontrado nas hemácias. Até recentemente, o microrganismo era classificado como uma riquetsia (TASKER; LAPPIN, 2006) da família Anaplasmataceae (SYKES, 2003), gênero *Haemobartonella* sp.. Após a observação de suas características fenotípicas e biológicas, como o pequeno tamanho do microrganismo, ausência de parede celular e flagelo, resistência à penicilina e análogos, e suscetibilidade à tetraciclina relatados por Neimark et al. (2001; 2002) e principalmente, como resultado de estudos filogenéticos do gene 16S que codifica o RNA ribossômico, os microrganismos anteriormente conhecidos como *Haemobartonella* spp. e *Eperythrozoon* spp. foram reclassificados e incluídos no gênero *Mycoplasma* (RIKIHISA et al., 1997). Apesar da forte relação filogenética com os membros do gênero *Mycoplasma*, essas espécies representam um grupo distinto de micoplasmas, por parasitarem hemácias. Para identificar esse novo grupo, o nome das espécies inclui o prefixo *haemo* (HARVEY, 2006). Assim, esses microrganismos passaram a ser denominados, de uma maneira mais abrangente, por micoplasmas hemotrópicos ou apenas hemoplasmas (NEIMARK et al., 2001; MESSICK, 2004).

Por meio de técnicas moleculares foi reconhecida a existência de duas cepas genética e morfológicamente distintas de micoplasmas hemotrópicos. A primeira delas, representada pela cepa Ohio que é mais facilmente visualizada em hemácias por apresentar um tamanho maior, passou a ser denominada *Mycoplasma haemofelis*. Microrganismos de dimensões minúsculas (cepa Califórnia), apresentando características moleculares que os diferenciavam do *M. haemofelis*, receberam a denominação de “*Candidatus M. haemominutum*” (FOLEY; PEDERSEN, 2001; JENSEN et al., 2001; NEIMARK et al., 2001, 2002). Mais recentemente, outra espécie de hemoplasma foi identificada em um gato doméstico da Suíça com um quadro grave de hemólise intravascular, a qual recebeu a denominação de “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (WILLI et al., 2005). A terminologia “*Candidatus*” utilizada para novas espécies de hemoplasmas refere-se a uma classificação provisória, que deve ser mantida até que informações mais



consistentes estejam disponíveis para possibilitar sua classificação definitiva (SYKES, 2003; WILLI et al., 2007b). Micoplasmose hemotrópica felina (MHF) foi a denominação proposta para a enfermidade causada por esses microrganismos (SYKES, 2003).

Os micoplasmas hemotrópicos são bactérias pequenas que variam de 0,3 a 0,8 $\mu$ m de diâmetro, não possuem parede celular, são Gram negativas e pleomórficas, podendo ser visualizadas à microscopia ótica como cocos, cocobacilos ou pequenas hastes. Geralmente, os microrganismos são observados dispostos em pares ou agrupados como pequenas correntes localizadas em posição epitelial nos eritrócitos. (ALMOSNY, 2002; HARVEY, 2006). “*Candidatus M. haemominutum*” e “*Candidatus M. turicensis*” raramente são observados em esfregaços sangüíneos (HARVEY, 2006; WILLI et al., 2007b). A diferenciação das espécies *M. haemofelis* e “*Candidatus M. haemominutum*” por meio da visualização dos microrganismos em esfregaços sangüíneos é difícil, se não impossível (WILLI et al., 2007b), sendo portanto, necessária análise molecular para a distinção das espécies de hemoplasmas (HARVEY, 2006; TASKER; LAPPIN, 2006; WILLI et al., 2007b).

A posição epitelial do *M. haemofelis* em depressões rasas na superfície eritrocitária é facilmente observada por microscopia eletrônica de varredura, que também possibilita a visualização do pleomorfismo desses organismos, que se apresentam como estruturas discóides, cônicas, cocóides e arredondas. Por meio da microscopia eletrônica de transmissão observam-se pontos intermitentes de contato com a membrana eritrocitária; entretanto apesar da adesão, não é relatada erosão completa da membrana da hemácia (HARVEY, 2006).

Os hemoplasmas contêm DNA e RNA, e replicam-se por divisão binária ou brotamento na superfície eritrocitária (HARVEY, 2006). O genoma do *M. haemofelis* é de aproximadamente 1.200 kb (BERENT; MESSICK, 2003). Os micoplasmas hemotrópicos são parasitos obrigatórios de hemácias e não crescem em meios de cultivo (MESSICK, 2004) o que limitou durante muito tempo, maior conhecimento sobre os hemoplasmas (WOODS et al., 2005). Com o desenvolvimento de testes moleculares sensíveis para o diagnóstico da infecção obteve-se uma melhor compreensão da patogenia e da epidemiologia dos micoplasmas hemotrópicos (WILLI et al., 2007b).

A via natural de transmissão desses agentes entre os felinos ainda não está bem determinada (WILLI et al., 2007b). O material genético do *M. haemofelis* e

“*Candidatus M. haemominutum*” foi detectado em pulgas (*Ctenocephalides felis*) e suas fezes, evidenciando o possível papel desses vetores hematófagos como agentes transmissores dos hemoplasmas (SHAW et al., 2004; WOODS et al., 2005; LAPPIN et al., 2006). A transmissão iatrogênica ocorre ao se transfundir sangue infectado por esses agentes a um animal sadio (HARVEY, 2006; WILLI et al., 2006a). Uma fêmea com MHF pode transmitir *M. haemofelis* para seus filhotes, contudo ainda não está estabelecida se a transmissão ocorre por via uterina, durante o parto ou nos cuidados de limpeza e higiene da fêmea para com os filhotes (HARVEY, 2006). Willi et al. (2007a) isolaram DNA do “*Candidatus M. turicensis*” da saliva e fezes de dois felinos experimentalmente infectados por essa espécie de hemoplasma por até nove semanas após a infecção. Contudo, são necessários maiores estudos para avaliar a possibilidade de transmissão de hemoplasmas entre os felinos em decorrência de brigas, comportamento de lambeduras ou da utilização conjunta de comedouros e bebedouros. A transmissão experimental dos hemoplasmas foi descrita por via intravenosa, intraperitoneal ou oral, utilizando-se sangue fresco de animais infectados (TASKER, 2006).

Vários fatores de risco para a infecção por micoplasmas hemotrópicos foram relatados, como sexo, idade e acesso à rua. Os felinos machos são mais freqüentemente acometidos (TASKER et al., 2003; LURIA et al., 2004; WILLI et al., 2006b; SYKES et al., 2008). Alguns autores (GRINDEM et al., 1990; SYKES et al., 2008) observaram maior predisposição dos felinos jovens à infecção por esses agentes e outros (TASKER et al., 2003; BAUER et al., 2008), em animais mais velhos. A taxa de infecção é maior em felinos que têm acesso à rua, em comparação aos que vivem em confinamento (GRINDEM et al., 1990; JENSEN et al., 2001). A infecção pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou da leucemia felina (FeLV) também é considerada por vários autores um fator de risco para a infecções pelos agentes da MHF (GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002; INOKUMA et al., 2004; LURIA et al., 2004; MACIEIRA et al., 2007). Grindem et al. (1990) também associaram a ausência de vacinações e o histórico de abscessos decorrentes de mordeduras com a infecção por hemoplasmas.

A MHF aguda pode variar de uma forma assintomática à doença fatal (HARVEY, 2006) na dependência principalmente, da patogenicidade da espécie envolvida (FOLEY et al., 1998; SYKES et al., 2008), e em parte, da suscetibilidade do hospedeiro (MESSICK, 2004; WILLI et al., 2007b), do estágio da infecção e do

grau e velocidade de desenvolvimento da anemia (TASKER; LAPPIN, 2006). Alguns felinos infectados por *M. haemofelis* apresentam apenas discreta anemia sem outras manifestações clínicas, enquanto em outros observa-se depressão acentuada e anemia grave, que pode resultar em óbito (HARVEY, 2006). Após, o estágio agudo da parasitemia por micoplasmas hemotrópicos, os felinos infectados apresentam períodos alternados de latência e recrudescência (FOLEY et al., 1998). As manifestações clínicas mais comuns em gatos infectados pelo *M. haemofelis* são inespecíficas e basicamente resultantes da anemia. As alterações mais freqüentes são anorexia, perda de peso, depressão, taquicardia, taquipnéia, desidratação e letargia (VANSTEENHOUSE et al., 1993; FOLEY et al., 1998; TASKER; LAPPIN, 2002; SYKES, 2003; TASKER, 2006). Outras anormalidades no exame físico podem ser encontradas; como hepato e esplenomegalia, murmúrios cardíacos e icterícia (FOLEY et al., 1998; SYKES, 2003). A esplenomegalia ocorre como consequência da hematopoese extramedular. Pirexia intermitente é comumente observada, principalmente na fase aguda da infecção (TASKER; LAPPIN, 2006), contudo, os felinos moribundos apresentam-se hipotérmicos (SYKES, 2003). As outras duas espécies de micoplasmas hemotrópicos que acometem os felinos não são considerados agentes primários de anemia. O potencial patogênico dessas espécies depende de condições de imunossupressão ou co-infecção com outra espécie de micoplasma hemotrópico (WILLI et al., 2007b).

A infecção micoplásmica causa anemia regenerativa (TASKER; LAPPIN, 2006), macrocítica e normocrômica (FOLEY et al., 1998), porém a macrocitose pode ser decorrente da co-infecção por FeLV (TASKER, 2006). Embora a anemia resultante da MHF seja de caráter regenerativo, em alguns felinos é observada uma regeneração medular discreta ou até mesmo ausente (TASKER, 2006), provavelmente devido a fase da infecção ou a infecções retrovirais concomitantes (WILLI et al., 2007b). Durante a fase aguda da infecção, o hematócrito observado rotineiramente está abaixo de 20% e freqüentemente abaixo de 10% antes dos sinais clínicos da doença serem percebidos pelo proprietário (HARVEY, 2006). O valor do hematócrito é bem flutuante, pois os eritrócitos parasitados são seqüestrados pelo baço para a remoção dos microrganismos de sua superfície, em seguida retornam para a circulação e, conseqüentemente, ocorre aumento do hematócrito sem reticulocitose (HARVEY, 2006; TASKER; LAPPIN, 2006). Em outros casos, o hematócrito permanece baixo ou declina durante um ou mais dias

após o aparecimento dos microrganismos na circulação, provavelmente como resultado da destruição eritrocitária (HARVEY, 2006). Episódios parasitêmicos repetitivos são responsáveis por danos eritrocitários progressivos e diminuição do tempo de vida das hemácias. O dano ao eritrócito pode ser causado diretamente pelo parasito, mas os mecanismos imunomediados são, aparentemente, os mais importantes. A adesão do microrganismo à superfície da hemácia resulta na exposição de antígenos ocultos da própria célula ao sistema imune ou induz à ocorrência de alterações nos antígenos eritrocitários. Conseqüentemente, há a produção de anticorpos antieritrocitários. Também a produção de anticorpos diretamente contra o microrganismo, pode resultar na lesão da membrana eritrocitária como um “expectador inocente” (HARVEY, 2006; TASKER, 2006; WILLI et al., 2007b). Quando ocorre o envolvimento de mecanismos imunológicos, a autoaglutinação dos eritrócitos pode ser notada nos esfregaços sangüíneos (HARRUS et al., 2002; SYKES, 2003), além de resultar no teste de Coombs positivo (ALLEMAN et al., 1999), indicando a presença de anticorpos associados aos eritrócitos (TASKER, 2006). Entretanto, a hemólise intravascular que ocorre é mínima. A anemia decorre primariamente como resultado da eritrofagocitose extravascular pelos macrófagos do baço, pulmões, fígado e medula óssea. O baço apresenta um papel principal na eliminação de antígenos presentes no sangue, por ser rico em linfócitos e monócitos (HARVEY, 2006; TASKER, 2006). Em esfregaços sangüíneos, pode ser observada a eritrofagocitose por monócitos e macrófagos (HARVEY, 2006).

A contagem de leucócitos é bastante variável durante a infecção e de pouco valor diagnóstico (VANSTEENHOUSE et al., 1993; FOLEY et al., 1998; HARRUS et al., 2002). O número de plaquetas normalmente não está alterado (HARVEY, 2006).

Sinais de hemólise e hiperbilirrubinemia são observados um a dois dias após a rápida diminuição do hematócrito durante a infecção (HARVEY, 2006; TASKER, 2006), entretanto, em muitos animais nem sempre são observados (SYKES, 2003), já que os eritrócitos podem ser seqüestrados pelo baço sem serem destruídos (HARVEY, 2006). Outras alterações encontradas na bioquímica sérica são: o aumento da atividade sérica das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além de azotemia e hiperproteinemia. O aumento da atividade das enzimas hepáticas é creditado à hipóxia (SYKES, 2003;

TASKER, 2006). A desidratação observada nesses animais implica na azotemia observada nos felinos com MFH (SYKES, 2003; HARVEY, 2006).

A pesquisa do agente na superfície dos eritrócitos, em esfregaços sangüíneos constituiu-se, até recentemente, no único meio de diagnóstico disponível (TASKER; LAPPIN, 2006), Entretanto esse método é pouco sensível (JENSEN et al., 2001; TASKER; LAPPIN, 2002) e resultados negativos falso são comuns, dado o caráter de parasitemia cíclica dos micoplasmas (SYKES, 2003) ou devido à altas concentrações de EDTA, que promovem o desprendimento dos hemoplasmas da superfície eritrocitária (BERENT et al., 1998; ALLEMAN et al., 1999). Segundo Tasker e Lappin (2006), como precaução, os esfregaços sangüíneos devem ser confeccionados no máximo em uma hora após a coleta. Pela natureza cíclica da parasitemia, a ausência de hemoplasmas nos esfregaços sangüíneos não exclui o diagnóstico de MHF (HARVEY, 2006). Segundo Tasker (2006), o método de reação em cadeia pela polimerase (PCR), quando utilizado adequadamente, é extremamente sensível e específico para o diagnóstico da infecção por micoplasmas hemotrópicos. Alguns autores (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001) observaram que os resultados da PCR foram positivos após quatro a 15 dias da infecção experimental com hemoplasmas e os resultados permaneceram positivos até o início da antibioticoterapia adequada. A sensibilidade dos métodos baseados na pesquisa de material genético de *Mycoplasma* spp. foi comprovada em um estudo, em que o microrganismo foi observado em apenas 37,5% dos esfregaços de sangue periférico dos animais que apresentaram resultados positivos na pesquisa do material genético (WESTFALL et al., 2001). O encontro de hemoplasmas no esfregaço sangüíneo ou a detecção de seu material genético por PCR deve ser analisado em conjunto com as alterações clínicas e laboratoriais, pois a simples presença dos microrganismos na circulação sangüínea pode ser um achado ocasional (HARVEY, 2006).

Os micoplasmas hemotrópicos são sensíveis às tetraciclinas, que inibem a síntese protéica dos procariontes. A doxiciclina é a medicação de escolha devido ao reduzido efeito colateral (TASKER; LAPPIN, 2002). A dose recomendada da doxiciclina é de 5,0mg/Kg, por via oral, a cada 24 horas durante 21 dias (HARVEY, 2006). Contudo, uma atenção especial deve ser dada a essa medicação, pois foi relatada a ocorrência de estenose esofágica resultante da administração de comprimidos de doxiciclina por via oral (MCGROTTY; KNOTTENBELT, 2002;

GERMAN et al., 2005), e como precaução é indicada a administração de uma pequena quantidade de água ou alimento imediatamente após a medicação (TASKER, 2006). Alternativamente ao uso de doxiciclina, a enrofloxacina pode ser utilizada na dose de 5,0 a 10,0mg/Kg, por via oral, a cada 12 horas durante 15 dias (TASKER et al., 2004b). Degeneração retiniana difusa e perda da visão aguda foram observadas como conseqüências de tratamentos com enrofloxacina (GELATT et al., 2001). Glicocorticóides, como a prednisona (1,0 a 2,0mg/Kg, por via oral, a cada 12 horas), atuam como coadjuvantes na terapia contra a MHF, pois em parte a anemia induzida por esses microrganismos é mediada imunologicamente, porém seu valor não está comprovado (HARVEY, 2006; TASKER, 2006). Em casos de desidratação grave, faz-se necessária a administração de fluidos como terapia de suporte. A transfusão sangüínea pode ser necessária, se o hematócrito estiver abaixo de 12% ou se a queda do valor do hematócrito for muito rápida (TASKER; LAPPIN, 2006). Sem o tratamento, mais de um terço dos felinos com infecção aguda por *M. haemofelis* morrem em decorrência de anemia grave (HARVEY, 2006).

A eliminação de artrópodes hematófagos dos felinos é recomendada como prevenção da infecção por micoplasmas hemotrópicos e outros agentes infecciosos (HARVEY, 2006). Os fatores de risco para a infecção micoplásmica devem ser considerados e eliminados, como por exemplo, a redução ou eliminação de contatos agressivos com outros felinos (TASKER; LAPPIN, 2006). A transmissão iatrogênica pode ser evitada com a utilização de testes moleculares como forma de triagem de animais doadores de sangue (HARVEY, 2006).

### **3 Materiais e métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram incluídos no estudo 270 felinos, com idade superior a seis meses, provenientes do atendimento clínico do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), de gatil não comercial, de abrigos, ou encaminhados por outros profissionais autônomos, de fevereiro de 2006 a outubro de 2007. Foram incluídos no estudo felinos que apresentavam número de eritrócitos  $\leq 5,0 \times 10^6/\mu\text{L}$  ou hematócrito  $\leq 29\%$ . Felinos sadios (n=53), sem alterações clínicas ou hematológicas, pertencentes a diferentes proprietários foram incluídos como controles. O projeto obedeceu aos princípios de bioética e bem-estar animal, estabelecidos pela Comissão de Bioética da Unidade de Ensino (Parecer 780/05, datado de 26/10/05) e a coleta de material foi realizada mediante anuência dos proprietários ou responsáveis pelos felinos.

Todos os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HOVET – FMVZ – USP, com exceção dos testes moleculares que foram executados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) – FMVZ – USP.

#### **3.2 Coleta do material biológico**

As amostras sangüíneas foram coletadas, por meio de punção da veia jugular, cefálica ou femoral. Uma alíquota de 1mL de sangue de cada felino foi acondicionada em frasco com anticoagulante EDTA – K<sub>3</sub> 7,5% (Vacutainer<sup>®</sup> Becton Dickinson, USA). Para obtenção do soro sangüíneo, 2mL de sangue foram acondicionados em

tubo de vidro siliconizado, contendo gel ativador de coágulo (Vacutainer<sup>®</sup> Becton Dickinson, USA).

### 3.3 Avaliação hematológica

O número de hemácias, leucócitos e plaquetas, a concentração de hemoglobina e o hematócrito, foram determinados em contador automático (ABC Vet<sup>®</sup>, ABX Diagnostics, França). Os esfregaços sangüíneos, confeccionados “*in natura*” e os preparados para a contagem de reticulócitos, com a mistura de sangue e azul de cresil brilhante em quantidades iguais, foram corados com corante de Rosenfeld (May-Grünwald modificado). A avaliação morfológica das células sangüíneas e a pesquisa de hemácias parasitadas foram realizadas em microscópio óptico, com objetiva de imersão (1.000X). Somente os reticulócitos agregados foram incluídos na contagem dos reticulócitos (FERNANDEZ; GRINDEM, 2000). A anemia foi caracterizada em arregenerativa ou regenerativa leve, moderada ou acentuada, segundo Brockus e Andreasen (2003).

### 3.4 Bioquímica sangüínea

Para a determinação do perfil bioquímico renal e hepático, foram mensuradas as concentrações séricas de uréia, creatinina, proteína total, albumina, bilirrubinas e a atividade das enzimas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA) em analisador bioquímico automático (LIASYS<sup>®</sup>, AMS – Analyser Medical System, Roma, Itália).



### 3.5 Testes para o diagnóstico da infecção pelos retrovírus

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção da infecção pelos retrovírus (FIV e FeLV) e o teste de imunofluorescência indireta para detecção do antígeno do FeLV (JUNQUEIRA-JORGE, 2005) e as técnicas moleculares de detecção do DNA viral do FIV (HOHDATSU et al., 1998) foram realizados em todos os felinos.

#### 3.5.1 Reação imunoenzimática

A presença da infecção pelos retrovírus nos felinos foi avaliada nas amostras de soro sanguíneo submetidas ao ELISA. Foram utilizados *kits* comerciais (SNAP Combo<sup>®</sup> FeLV/FIV, Lab. IDEXX, EUA) para a detecção de antígenos virais p27 do FeLV e anticorpos contra o FIV, segundo recomendações do fabricante.

#### 3.5.2 Teste de imunofluorescência indireta para detecção do antígeno do vírus da leucemia felina

O antígeno viral (p27) do FeLV foi detectado pela técnica de imunofluorescência, descrita por Junqueira-Jorge (2005). Em cada lâmina de esfregaço sanguíneo foram demarcadas duas áreas circulares de aproximadamente um centímetro de diâmetro, utilizando-se caneta esferográfica de tinta metálica. O círculo da esquerda correspondia ao controle negativo, no qual foram adicionados 10 $\mu$ L de tampão PBS com 1% de soroalbumina bovina. No círculo da direita foram colocados 10 $\mu$ L de anticorpos anti-FeLV (Primary reagente for FeLV IFA,VMRD, Inc., EUA). Para cada grupo de lâminas testadas foi utilizada uma lâmina sabidamente

positiva, como controle positivo da reação. As lâminas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 30 minutos, a seguir mergulhadas rapidamente em tampão de lavagem diluído em água destilada na proporção 1:4, para retirar o excesso de reagente, e imersas neste tampão por mais 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água destilada, e posicionadas de forma inclinada para drenagem do excesso de líquido. Após a secagem, foram adicionados 10µL do conjugado anti-IgG-fluoresceína (Anti-IgG-FITC Conjugate, VMRD Inc., EUA) em cada sítio, repetindo-se as etapas de incubação e lavagem. Terminada a reação, as lâminas foram cobertas com uma gota de glicerina tamponada e sobre esta, lamínulas de vidro. Para a leitura da reação foi utilizado microscópio de fluorescência (Microscópio OLYMPUS BX60) com epi-iluminação. A amostra foi considerada positiva quando os leucócitos e plaquetas apresentaram nítida fluorescência.

### 3.5.3 Reação em cadeia pela polimerase para o vírus da imunodeficiência felina

O DNA viral do FIV foi detectado pela técnica de Nested-PCR, descrita por Hohdatsu et al. (1998). Para a PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) FIV - A (antisense) 5' TTTTCTTCTAGGGTACTTTCTGG 3' e FIV - S (senso) 5' AATATGGCTGTATCTACTGC 3' (Integrated DNA Technologies, Inc., EUA). E na Nested-PCR, os *primers* FIV NESTED - A (antisense) 5' CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT 3' e FIV - S (sense) 5'TATTCAAACAGTAAATGGAG 3' (Integrated DNA Technologies, Inc., EUA). Os *primers* utilizados na Nested-PCR são capazes de gerar fragmentos de 329 pares de bases (bp).

As reações de PCR e Nested-PCR foram realizadas com 2,5µL de tampão de PCR 10X (Invitrogen, Brasil), 4µL de dNTPs 1,25mM (Illustra™ dNTP Set, GE Healthcare, Reino Unido), 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1,25 µL de cada primer 10µM, 0,25µL Platinum Taq polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Brasil) 5U/µL e água ultrapura q.s.p. 25µL. Foram utilizados 5µL da amostra de DNA extraído e 2µL do produto da PCR na reação de PCR e Nested-PCR, respectivamente.

As condições de reação no termociclador (Bio-Rad DNA Engine<sup>®</sup>, Peltier Thermal Cycler, EUA) foram de 94°C durante 5 minutos para a desnaturação do DNA, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 58°C por 1 minuto para a hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores, 72°C por 1 minuto e 30 segundos para a extensão das fitas, e um ciclo final de 72°C durante 5 minutos para extensão final.

Como controle positivo das reações moleculares para a detecção do DNA do FIV foi utilizado o material genético extraído do sangue de um felino positivo para esse vírus por meio de teste imunoenzimático (SNAP Combo<sup>®</sup> FeLV/FIV, Lab. IDEXX, EUA). Foi utilizada água ultra pura livre de DNase e RNase (UltraPure<sup>™</sup> DEPC – Treated Water, Invitrogen, EUA) como controle negativo das reações.

### **3.6 Extração do material genético**

O material genético das amostras de sangue total foi extraído utilizando-se um *kit* comercial de extração (Illustra<sup>™</sup> Blood GenomicPrep mini Spin Kit<sup>®</sup>, GE Healthcare, Reino Unido), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

### **3.7 Reação em cadeia pela polimerase para *Mycoplasma* spp.**

Todas as amostras foram submetidas à PCR e Nested-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) descritos por Messick et al. (1998). Na PCR foram utilizados os *primers* *H. felis*-f1 (senso) 5' - GACTTTGGTTTCGGCCAAGG - 3' e *H. felis*-r2 (antisenso) 5' - ATGTATTTTTAAATGCCCACTC - 3' (Integrated DNA Technologies, Inc., USA). Outros dois *primers* foram utilizados para a Nested-PCR, fHf5 (senso) 5' - AGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC - 3' e rHf6 (antisenso) 5' - TGCACCACCTGTCCACCTCGATAAC - 3' (Integrated DNA Technologies, Inc., USA). Os *primers* selecionados permitiram a amplificação de 1316bp na PCR do gene que

codifica o RNA ribossômico 16S dos micoplasmas hemotrópicos que acometem os felinos, e 675bp na Nested-PCR.

As reações de PCR e Nested-PCR foram realizadas com 2,5µL de tampão de PCR 10X, 4µL de dNTPs 1,25mM (Illustra™ dNTP Set, GE Healthcare, Reino Unido), 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,625µL de cada *primer* 10µM, 0,125µL Platinum Taq polimerase 5U/µL (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Brasil) e água ultrapura q.s.p. 25µL. Foram utilizados 5µL da amostra de DNA extraído e 0,5µL do produto da PCR na reação de PCR e Nested-PCR, respectivamente.

As condições térmicas da reação de PCR foram de 94°C durante 10 minutos para a desnaturação do DNA, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 50°C por 30 segundos para a hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores, 72°C por 1 minuto e 30 segundos para a extensão das fitas, e um ciclo final de 72°C durante 5 minutos para extensão final. Para a reação de Nested-PCR foi utilizada a temperatura de 57,5°C para a hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores.

Como controle positivo foi utilizado o material extraído a partir de uma amostra de sangue em que havia sido observado elevado número de hemácias parasitadas. O produto amplificado desse material (1316bp) foi seqüenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB – USP) e caracterizado como *M. haemofelis*. Foi utilizada água ultra pura livre de DNase e RNase (UltraPure™ DEPC – Treated Water, Invitrogen, EUA) como controle negativo das reações.

### **3.8 Avaliação dos resultados das reações em cadeia pelo polimerase**

Os produtos amplificados nas reações de Nested-PCR para FIV e *Mycoplasma* spp. juntamente com um marcador de peso molecular (100bp DNA ladder, Invitrogen, EUA) foram dispostos em um gel de agarose a 1,5% em cuba horizontal com solução tampão de TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M: EDTA 0,001M) e submetidos à eletroforese. Em seguida, o gel foi corado após imersão em uma

solução de brometo de etídio (0,5µg/mL), e visualizado com o auxílio de um transiluminador ultravioleta. As bandas observadas foram comparadas com o marcador de peso molecular e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram banda de tamanho específico de 329bp para FIV e de 675bp para *Mycoplasma* spp. As imagens obtidas foram documentadas, armazenadas e analisadas utilizando-se equipamento de fotodocumentação (Alpha Imager™ Imaging System, Alpha Innotech, EUA).

### 3.9 Seqüenciamento de DNA

As bandas correspondentes aos produtos amplificados de *Mycoplasma* spp. na Nested-PCR foram recortadas do gel e em seguida purificadas, utilizando-se um *kit* comercial (GFX PCR DNA and gel band purification kit, Amersham Biosciences, GE Healthcare, EUA) segundo instruções do fabricante. Após a purificação, o DNA amplificado foi quantificado visualmente por meio de comparação das bandas obtidas com um padrão de peso molecular (Low Mass DNA Ladder, Invitrogen, EUA) em gel de agarose 1,5%, segundo instruções do fabricante. Para a reação de seqüenciamento de DNA utilizou-se 4µL de BigDye 3 (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, EUA), 4µL de tampão 5X, 0,4µL de cada oligonucleotídeo iniciador 10µM (fHf5 e rHf6) em reações separadas, 40ng do DNA alvo e água ultrapura livre de DNase q.s.p. para uma reação final de 20µL. As condições da reação de seqüenciamento no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, EUA) foram de 96°C durante 1 minuto, 40 ciclos de 96°C durante 15 minutos, 50°C 15 minutos e 60°C durante 4 minutos, com rampa de 1°C por segundo entre cada temperatura. Após a reação de seqüenciamento, foi realizada a precipitação do DNA amplificado com adição de 80µL de isopropanol 75%, seguido de homogeneização e incubação por 25 minutos em temperatura ambiente. Em seguida o material foi centrifugado em 25.000Xg durante 25 minutos a 12°C. O sobrenadante foi descartado e em seguida adicionou-se 300µL de etanol 70%. Após nova homogeneização, o material foi centrifugado em 25.000Xg durante 10 minutos

a 12°C e em seguida, o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* permaneceu por 5 minutos a 90°C e mais 5 minutos em temperatura ambiente para secagem completa. Após a precipitação, o resultado do seqüenciamento foi obtido em seqüenciador automático (ABI Prism™ 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, EUA).

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra foram avaliados com relação à sua qualidade no aplicativo Phred online (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Os cromatogramas foram analisados e editados manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) com a finalidade de observar e corrigir possíveis erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciadas. A seqüência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-contig do programa computacional BioEdit v. 5.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), e submetida à pesquisa de homologia com outras seqüências depositadas no GenBank, utilizando-se o programa Blast 2.0.10 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

### 3.10 Análise estatística

Para as análises estatísticas dos dados utilizou-se o programa computacional MiniTab® Release 14.12.0.

Para sumarizar os valores hematológicos e bioquímicos séricos obtidos a mediana, primeiro e terceiro quartil de cada parâmetro foram determinados.

O grau de concordância entre a citologia do esfregaço sangüíneo e a técnica de Nested-PCR para a detecção da infecção por micoplasmas hemotrópicos foi avaliado por meio do teste Kappa.

A verificação da hipótese de associação da infecção por *M. haemofelis* com a faixa etária, sexo, características raciais foi realizada por meio do teste do qui-quadrado.

Os valores referentes ao hemograma e bioquímica sangüínea foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smimov e à análise de variância (teste F) seguida pelo teste de Tukey, para as variáveis com distribuição normal e pelo teste

de Mann-Whitney, para as variáveis com distribuição não-paramétrica, sendo  $\alpha < 0,05$ .

A verificação da hipótese de associação da infecção pelo *M. haemofelis* com a infecção por FIV ou FeLV foi realizada por meio do teste do qui-quadrado. A estatística descritiva foi aplicada às variáveis faixa etária e sexo de acordo com a infecção por *M. haemofelis* e os retrovírus, devido ao número reduzido de animais co-infectados não foi possível a utilização de outro método estatístico para analisar tais dados.

Os dados referentes a outras espécies de micoplasmas hemotrópicos encontradas foram apenas descritos sem nenhum tratamento estatístico devido ao número muito reduzido de animais.

## 4 Resultados

Os valores hematológicos e bioquímicos séricos dos felinos do grupo experimental (A) diferiam consideravelmente dos valores observados nos felinos do grupo controle (C) e dos valores da literatura, considerados como referência. A mediana, primeiro e terceiro quartis de cada parâmetro hematológico e bioquímico sérico do grupo A e C estão apresentados na tabela 1, juntamente com os valores de referência adotados.



Tabela 1 – Mediana, primeiro e terceiro quartis\* das variáveis hematológicas e bioquímicas séricas dos felinos anêmicos (grupo A), saudáveis (grupo C) e valores de referência. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Parâmetros	Felinos anêmicos (n=270)	Felinos saudáveis (n=53)	Valores de referência
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	5,5 (4,5; 6,3)	8,8 (8,1; 9,8)	5,0 – 10,0
Hematócrito (%)	26 (22; 28)	39 (36; 42)	30 – 45
Hemoglobina (g/dL)	8,6 (7,3; 9,4)	13,3 (12,4; 14,9)	9,8 – 15,4
VCM (fL)	45 (42; 50)	43 (41,5; 48)	39 – 55
HCM (pg)	15 (14; 17)	15 (14;16)	13 – 17
CHCM (%)	34 (32; 35)	35 (34; 36)	30 – 36
Reticulócitos ( $/\mu\text{L}$ )	6.700 (5.500; 20.800)	–	$\geq 50.000$
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	17.950 (11.695; 26.125)	12.800 (7.350; 17.950)	5.500 – 19.500
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	259.500 (159.00; 446.000)	176.000 (135.500; 351.000)	300.000 – 800.000
Uréia (mg/dL)	69,3 (48,0; 120,3)	65,20 (53,7; 71,9)	40 – 73
Creatinina (mg/dL)	1,5 (1,2; 2,1)	1,4 (1,3; 1,6)	0,9 – 2,2
Proteínas Totais (g/dL)	7,1 (6,4; 8,0)	6,8 (6,2; 7,3)	6,0 – 7,9
Albumina (g/dL)	2,6 (2,4; 2,9)	2,9 (2,7; 3,1)	2,8 – 3,9
ALT (U/L)	27,6 (16,6; 53,2)	33,6 (23,9; 50,2)	25 – 97
AST (U/L)	24,0 (16,2; 45,0)	19,0 (14,0; 24,8)	7 – 38
FA (U/L)	24,8 (12,4; 52,3)	45,0 (27,7; 65,2)	0 – 45
GGT (U/L)	0 (0; 0,8)	0 (0; 0)	–
Bilirrubina Total (mg/dL)	0 (0; 0,3)	–	0 – 0,1
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0 (0; 0,2)	–	0 – 0,1
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0 (0; 0,3)	–	0

\* Os valores referentes ao primeiro e terceiro quartis estão apresentados entre parênteses e separados por ponto e vírgula, respectivamente.

O número de reticulócitos não foi determinado nos felinos saudáveis.

As concentrações das bilirrubinas não foram mensuradas nos felinos que não apresentaram soro icterico.

ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, FA: fosfatase alcalina, GGT: gamaglutamil transferase, HCM: hemoglobina corpuscular média, VCM: volume corpuscular médio.

Na análise do esfregaço sangüíneo dos felinos do grupo A, foram observadas estruturas epicelulares identificadas como possível hemoplasma (Figura 1) nas hemácias de 11 animais, do total de 270 amostras analisadas, o que não ocorreu com os felinos do grupo C.

As mesmas amostras sangüíneas submetidas à PCR e Nested-PCR para a detecção do material genético de *Mycoplasma* spp. possibilitaram a identificação de 25 felinos infectados no grupo A (Figura 2), enquanto que no grupo C não foi identificada nenhuma amostra positiva.

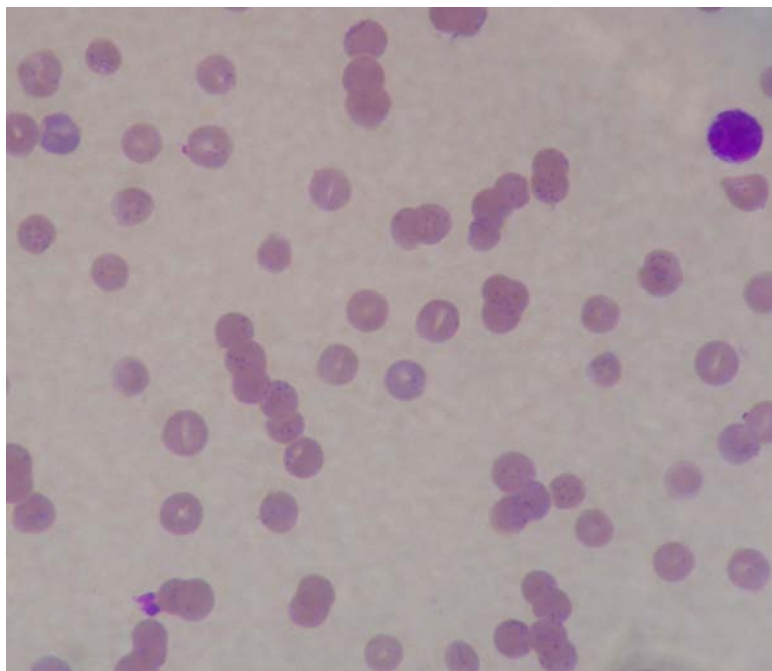


Figura 1 – Esfregaço sangüíneo de um felino anêmico. As estruturas epitelulares dos micoplasmas hemotrópicos são observadas como formas cocóides na superfície das hemácias (1.000x). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

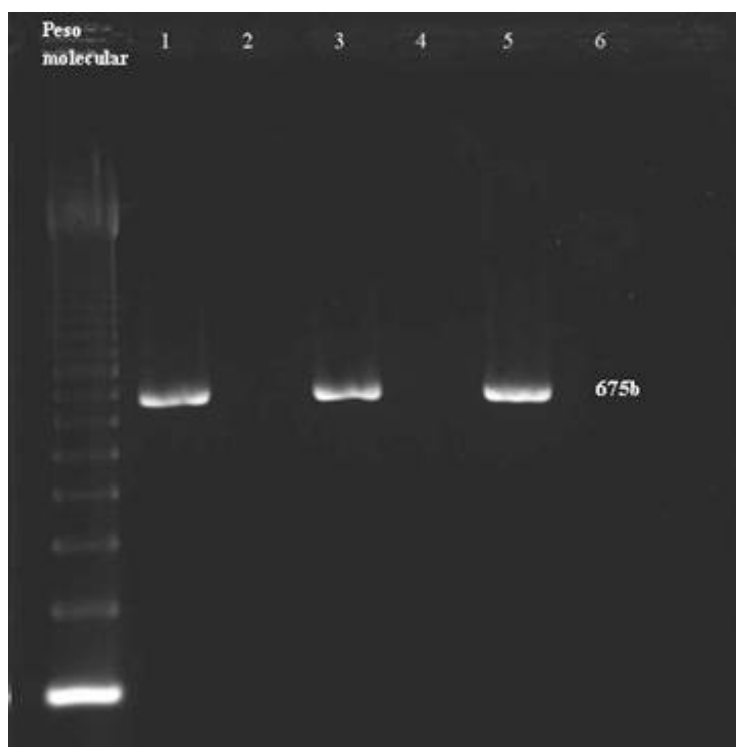


Figura 2 – Gel de agarose 1,5% após eletroforese. Resultado da Nested-PCR (675bp) para *Mycoplasma* spp. Linha 1: controle positivo; linha 2: controle negativo, linhas, linhas: 3 e 5 amostras positivas; linhas 4 e 6: amostras negativas. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Houve concordância entre a técnica molecular e a técnica citológica em apenas seis felinos (6/25) correspondendo a 24% das amostras positivas a Nested-PCR. Nos demais, correspondendo a 76% dos animais infectados, a infecção por *Mycoplasma* spp. foi identificada apenas por técnica molecular. Das 11 amostras positivas pela avaliação citológica, seis não foram confirmadas pela Nested-PCR (Tabela 2). Fleiss et al. (2003) classificam a concordância em excelente quando  $Kappa \geq 0,75$  e fraca quando  $Kappa \leq 0,40$ . O grau de concordância das técnicas de citologia e Nested-PCR obtido por meio do teste Kappa foi de 0,293, portanto esses testes apresentaram fraca concordância.

Tabela 2 – Frequência de positivos aos testes moleculares e à pesquisa citológica de *Mycoplasma* spp. nas amostras sanguíneas dos felinos anêmicos (n=270). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Método de pesquisa de <i>Mycoplasma</i> spp.	Citologia +		Citologia -		TOTAL
	n	%	n	%	
<b>Nested-PCR +</b>	6	24,0	19	76,0%	25
<b>Nested-PCR -</b>	5	2,0	240	98,0%	245
<b>TOTAL</b>	11		259		270

+: positivo, -: negativo.

Dentre as 25 amostras amplificadas por Nested-PCR, o seqüenciamento dos amplicons permitiu a identificação de *M. haemofelis* (n=23), *M. haemocanis* (n=1) e “*Candidatus M. turicensis*” (n=1), correspondendo a 8,5%, 0,4% e 0,4%, respectivamente do total de felinos anêmicos estudados. As seqüências de nucleotídeos encontradas nesse estudo foram depositadas no GenBank, sob os números de acesso EU442616 a EU442640, dos quais EU442629 e EU442623, são

referentes ao “*Candidatus M. turicensis*” e *M. haemocanis*, respectivamente (Anexos A, B, C e D).

Com a finalidade de caracterizar a anemia resultante da infecção por hemoplasmas, principalmente por *M. haemofelis*, considerada patogênica, os felinos infectados por esse agente infeccioso compuseram o grupo Mhf + (n=23), e os demais felinos anêmicos, o grupo Mhf – (n=245). O felino infectado por *M. haemocanis* e aquele infectado por “*Candidatus M. turicensis*” não foram incluídos em nenhum dos dois grupos por serem únicos.

A distribuição dos felinos Mhf + e Mhf – quanto à faixa etária, encontra-se disposta no gráfico 1. A infecção por *M. haemofelis* foi observada nos animais estudados, independentemente da faixa etária (p=0,100).

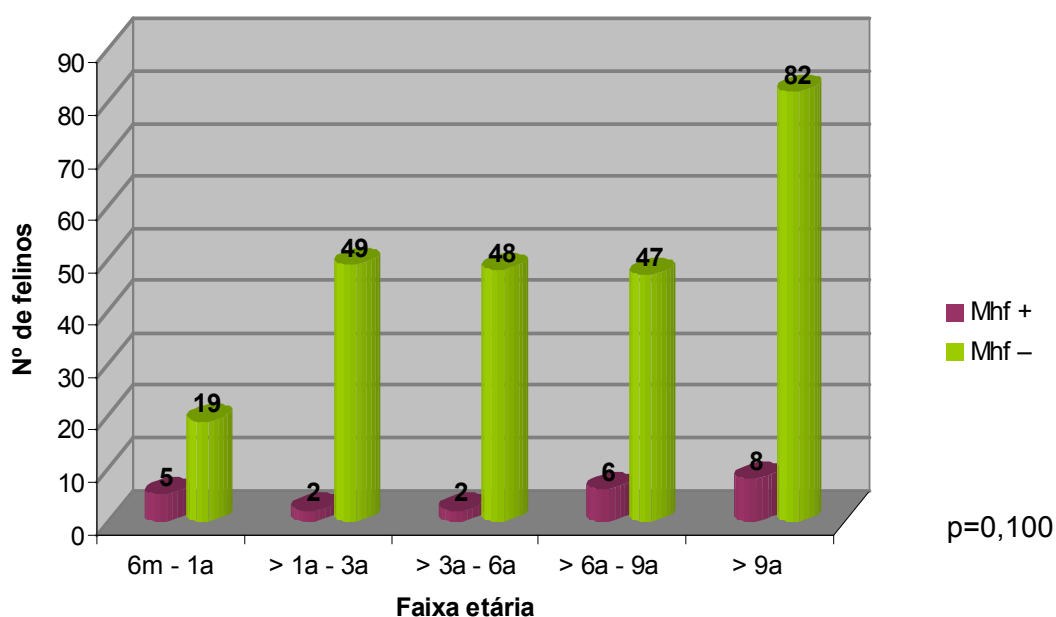


Gráfico 1 – Distribuição dos felinos anêmicos de acordo com a faixa etária e a infecção por *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

**Mhf +:** positivo para *M. haemofelis*, **Mhf -:** negativo para *M. haemofelis*.

A distribuição dos felinos quanto às características raciais encontra-se no gráfico 2. Entre os felinos positivos, encontravam-se tanto os animais com raças definidas, quanto aqueles sem raça definida, demonstrando-se que ambos são igualmente suscetíveis à infecção ( $p=0,122$ ).

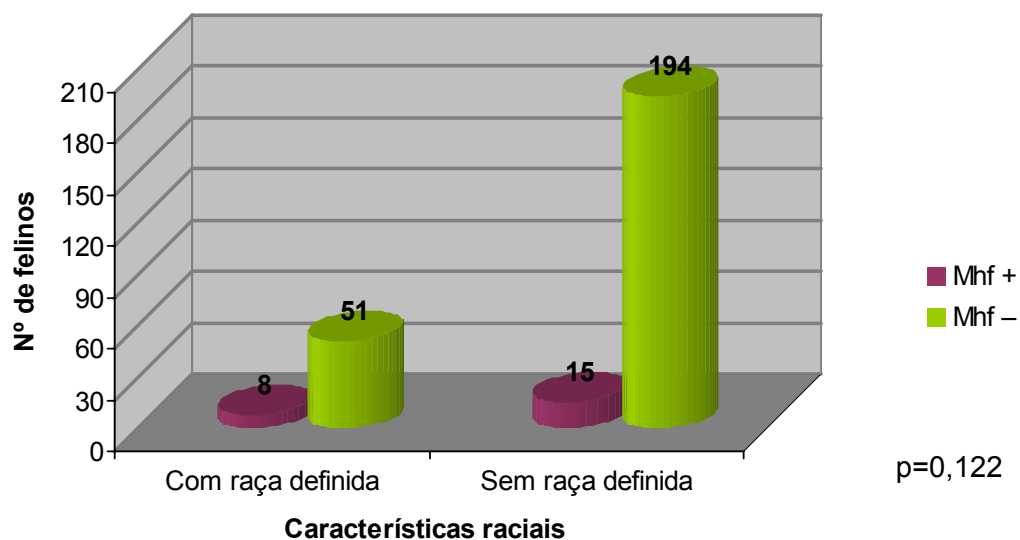


Gráfico 2 – Distribuição dos felinos anêmicos de acordo com as características raciais e a infecção por *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

**Mhf +**: positivo para *M. haemofelis*, **Mhf -**: negativo para *M. haemofelis*.

Em relação ao sexo (Gráfico 3), a infecção por *M. haemofelis* foi encontrada em maior número entre os machos ( $p=0,039$ ).

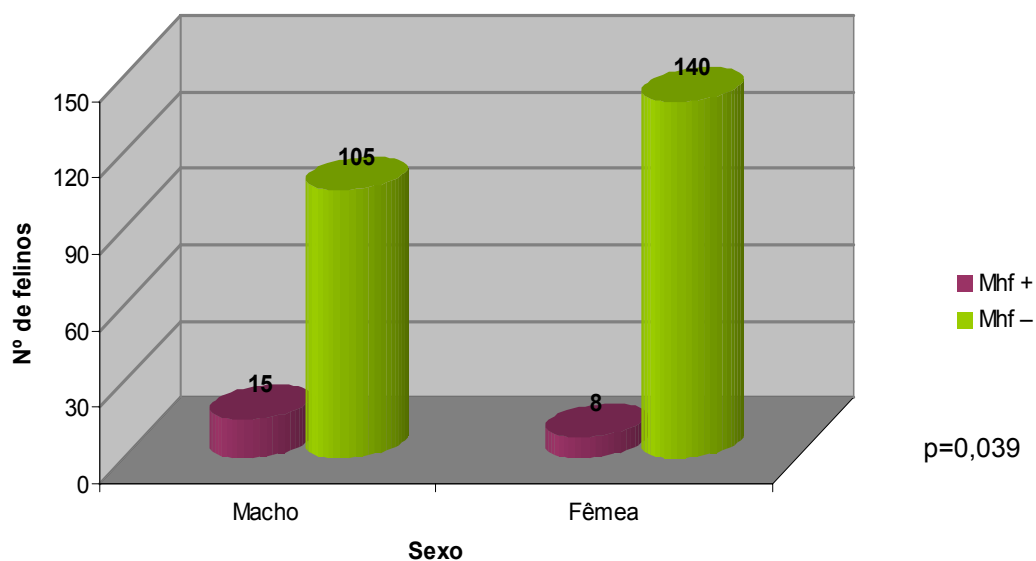


Gráfico 3 – Distribuição dos felinos de acordo com o sexo e a infecção pelo *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007  
**Mhf +**: positivo para *M. haemofelis*, **Mhf -**: negativo para *M. haemofelis*.

Na tabela 3, estão apresentados mediana, primeiro e terceiro quartis das variáveis hematológicas e bioquímicas dos felinos do grupo Mhf + (Apêndices A e B) e Mhf -. Diferenças estatísticas foram observadas entre os grupos em relação ao número de hemácias ( $p=0,0002$ ), hematócrito ( $p=0,0370$ ), hemoglobina ( $p=0,0094$ ), volume corpuscular médio ( $p=0,0001$ ). Portanto, a anemia foi mais intensa entre os felinos infectados.

Tabela 3 – Mediana, primeiro e terceiro quartis, e nível de significância (p) das variáveis hematológicas e bioquímicas séricas dos felinos anêmicos de acordo com a infecção por *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Parâmetros	Mhf + (n= 23)	Mhf – (n=245)	p	Valores de referência (LATIMER et al., 2003)
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	4,3 (3,8; 5,3)	5,7 (4,7; 6,4)	0,0002	5,0 – 10,0
Hematócrito (%)	24 (18; 27)	26 (22; 28)	0,0370	30 – 45
Hemoglobina (g/dL)	7,5 (5,8; 8,9)	8,7 (7,4; 9,4)	0,0094	9,8 – 15,4
VCM (fL)	51 (45; 56)	45,0 (42; 49)	0,0001	39 – 55
HCM (pg)	16 (15; 18)	15 (14; 17)	0,678	13 – 17
CHCM (%)	32 (31; 34)	34 (33; 35)	0,584	30 – 36
Reticulócitos (/μL)	15.900 (4.500; 224.00)	6.600 (5.500; 17.850)	0,3494	≥ 50.000
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)	16.100 (8.300; 24.500)	18.000 (11.950; 26.700)	0,4300	5.500 – 19.500
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	165.000 (107.000; 219.000)	286.000 (168.500; 455.500)	0,0001	300.000 - 800.000
Uréia (mg/dL)	62,0 (43,8; 185,9)	69,5 (48,1; 120,2)	0,8560	40 – 73
Creatinina (mg/dL)	1,5 (1,2; 2,8)	1,5 (1,2; 2,1)	0,9505	0,9 – 2,2
Proteínas Totais (g/dL)	7,5 (6,4; 8,9)	7,1 (6,4; 8,0)	0,2496	6,0 – 7,9
Albumina (g/dL)	2,8 (2,4; 3,1)	2,6 (2,4; 2,8)	0,1543	2,8 – 3,9
ALT (U/L)	35,9 (29,0; 108,0)	26,7 (15,7; 52,7)	0,0207	25 – 97
AST (U/L)	37,1 (17,5; 61,5)	23,3 (16,0; 44,7)	0,1782	7 – 38
FA (U/L)	23,8 (9,1; 58,0)	25,0 (13,0; 52,5)	0,6628	0 – 45
GGT (U/L)	0,0 (0,0; 0,8)	0,0 (0,0; 0,7)	0,3535	–
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0090	0 – 0,1
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0108	0 – 0,1
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0073	0

\* Os valores referentes ao primeiro e terceiro quartil estão apresentados entre parênteses e separados por ponto e vírgula, respectivamente.

**Mhf +:** positivo para *M. haemofelis*, **Mhf -:** negativo para *M. haemofelis*, **p:** nível de significância.

O número de reticulócitos não foi determinado nos felinos saudáveis.

As concentrações das bilirrubinas não foram mensuradas nos felinos que não apresentaram soro icterico.

**ALT:** alanina aminotransferase, **AST:** aspartato aminotransferase, **CHCM:** concentração de hemoglobina corpuscular média, **FA:** fosfatase alcalina, **GGT:** gamaglutamil transferase, **HCM:** hemoglobina corpuscular média, **VCM:** volume corpuscular médio.



Quanto ao grau de regeneração medular entre ambos os grupos, observou-se que mais da metade dos felinos Mhf + (15/23) não apresentou sinais de regeneração medular (Tabela 4). Apenas seis (6/23) felinos apresentaram anemia com acentuada regeneração. Entre os felinos Mhf –, a ausência de regeneração medular foi observada na maioria dos animais.

Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa de felinos de acordo com diferentes graus de regeneração medular (nenhuma, leve, moderada e acentuada) de acordo com a infecção por *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Classificação*		Mhf +		Mhf –		TOTAL
Grau de regeneração	Reticulócitos (/μL)	n	%	n	%	
Nenhum	< 50.000	15	65,2	209	85,3	224
Leve	≥ 50.000 – 100.000	2	8,7	25	10,2	27
Moderada	> 100.000 – 200.000	0	0	6	2,5	6
Acentuada	>200.000	6	26,1	5	2,0	11
<b>TOTAL</b>		<b>23</b>	<b>100</b>	<b>245</b>	<b>100</b>	<b>268</b>

\*Brockus e Andreasen (2003).

**Mhf +:** positivo para *M. haemofelis*, **Mhf -:** negativo para *M. haemofelis*.

Em relação ao número de plaquetas, os felinos Mhf + apresentaram discreta plaquetopenia ( $p=0,0001$ ). Não houve variação no número de leucócitos ( $p=0,4300$ ) entre os felinos Mhf + e Mhf – (Tabela 3).

Quanto à bioquímica sérica, as concentrações séricas de bilirrubinas (Gráfico 4) total ( $p=0,0090$ ), direta ( $p=0,0108$ ) e indireta ( $p=0,0073$ ), e a atividade sérica de ALT (Gráfico 5) foram maiores nos felinos infectados ( $p=0,0207$ ).

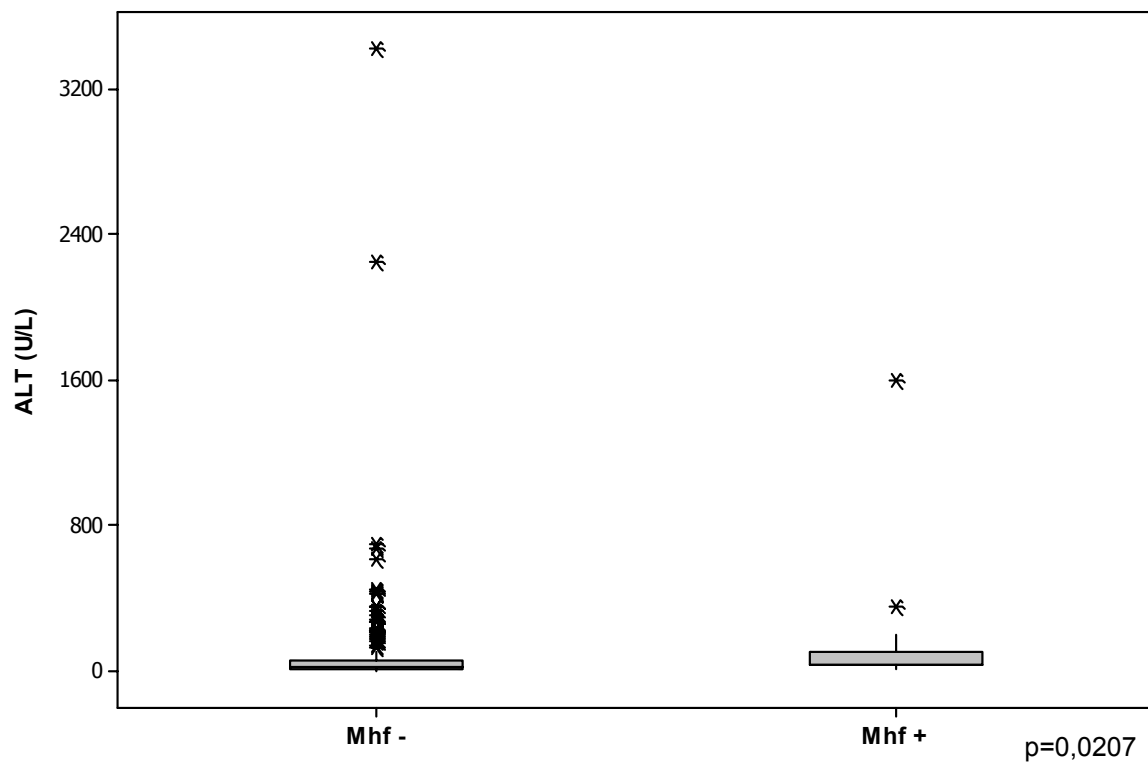


Gráfico 4 – *Box-plot* dos felinos anêmicos da atividade sérica da ALT de acordo com a presença do *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007  
**Mhf +**: positivo para *M. haemofelis*, **Mhf -**: negativo para *M. haemofelis*.

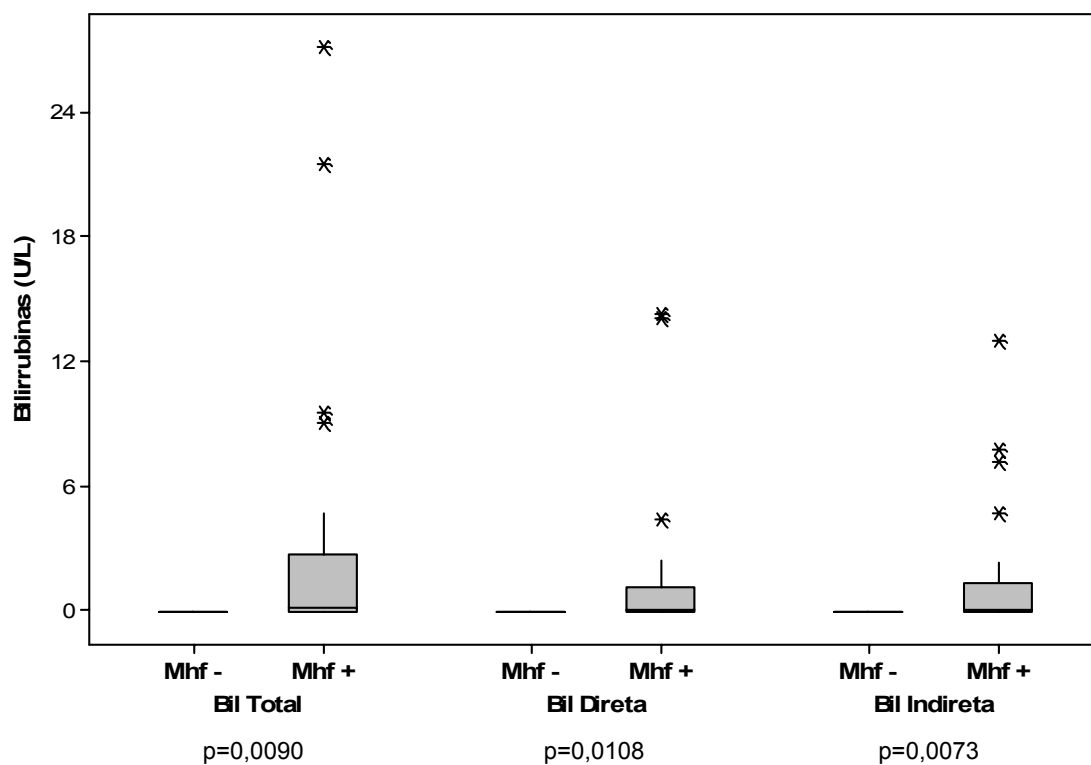


Gráfico 5 – *Box-plot* dos felinos anêmicos de acordo com as concentrações séricas de bilirrubinas total, direta e indireta e com a presença do *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

**Mhf +:** positivo para *M. haemofelis*, **Mhf -:** negativo para *M. haemofelis*.

A infecção pelos retrovírus da leucemia felina (FeLV) e/ou da imunodeficiência felina (FIV) foi observada no grupo dos felinos anêmicos (n=270). No grupo controle, não foi encontrado nenhum animal infectado por esses vírus.

Na tabela 5, encontra-se apresentada a freqüência dos animais infectados pelos retrovírus. Um dos animais com infecção concomitante por ambos os retrovírus encontrava-se infectado por *M. haemocanis*. Quando se considera a infecção por apenas um dos retrovírus em relação à infecção por *M. haemofelis*, foi evidenciada a associação entre *M. haemofelis* e FIV (p=0,009) e entre o *M. haemofelis* e FeLV (p=0,015).

Tabela 5 – Freqüência absoluta e relativa de felinos de acordo com a infecção pelos retrovírus (FIV e/ou FeLV) e a presença de *M. haemofelis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Infecção	Mhf +		Mhf -		TOTAL
	n	%	n	%	
FIV +	6	26,1	29	11,3	35
FeLV +	6	26,1	32	12,4	37
FIV e FeLV +	1	4,3	6*	2,3	7
FIV e FeLV -	10	43,5	190**	73,9	190
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>100</b>	<b>257</b>	<b>100</b>	<b>270</b>

Mhf +: positivo para *M. haemofelis*, Mhf -: negativo para *M. haemofelis*, +: positivo, -: negativo.

\* *M. haemocanis* + (n=1).

\*\* "*Candidatus M. turicensis*" + (n=1).

Todos os felinos co-infectados por *M. haemofelis* e FIV apresentavam idade superior a 8 anos (Tabela 6), enquanto que os felinos positivos para *M. haemofelis* e FeLV eram predominantemente jovens, sendo 66,67% (4/6) deles com idade inferior a 2 anos e 33,37% (2/6) com idade entre 6 e 8 anos.

Tabela 6 – Distribuição dos felinos de acordo com a faixa etária e as infecções por *M. haemofelis* e retrovírus (FIV e/ou FeLV). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Idade	<i>M. haemofelis</i> positivo				<i>M. haemofelis</i> negativo				TOTAL
	FIV+	FeLV +	FIV e FeLV +	FIV e/ou FeLV -	FIV+	FeLV +	FIV e FeLV +	FIV e/ou FeLV -	
6m – 1a	-	3	-	2	-	4	-	15	24
> 1a – 3a	-	1	-	1	3	20	2	24	51
> 3a – 6a	-	-	-	2	11	2	1	34	50
> 6a – 9a	2	2	1	1	5	5	-	37	53
> 9a	4	-	-	4	10	1	2	69	90
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>29</b>	<b>32</b>	<b>5</b>	<b>179</b>	<b>268</b>

+: positivo, -: negativo.

a: ano (s); m: mês (es).

A infecção por FIV e/ou FeLV foi mais acentuada nos felinos Mhf + machos do que nos felinos negativos para essa espécie de hemoplasma (Tabela 7).

Tabela 7 – Frequência absoluta e relativa de felinos de acordo com o sexo e as infecções por *M. haemofelis* e retrovírus (FIV e/ou FeLV). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Sexo	<i>M. haemofelis</i> positivo				<i>M. haemofelis</i> negativo				TOTAL
	FIV e/ou FeLV +		FIV e/ou FeLV -		FIV e/ou FeLV +		FIV e/ou FeLV -		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
<b>Fêmea</b>	3	23,1	5	50,0	27	40,9	113	63,1	148
<b>Macho</b>	10	76,9	5	50,0	39	59,1	66	36,9	120
<b>TOTAL</b>	<b>13</b>		<b>10</b>		<b>66</b>		<b>179</b>		<b>268</b>

+: positivo, -: negativo.

Reportando-se à característica regenerativa ou não da anemia apresentada pelos felinos Mhf +, observa-se que a anemia foi predominantemente arregenerativa quando ocorreu a infecção por *M. haemofelis* associada a qualquer um dos retrovírus, contudo quando a co-infecção não era detectada, a regeneração medular foi observada mais freqüentemente (Tabela 8).

Tabela 8 – Freqüência absoluta e relativa de felinos positivos para *M. haemofelis* com relação à infecção pelos retrovírus (FIV e/ou FeLV) e a regeneração medular. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Retrovírus	Anemia regenerativa		Anemia arregenerativa		TOTAL
	n	%	n	%	
<b>FeLV+</b>	1	16,7	5	83,3	6
<b>FIV+</b>	1	16,7	5	83,3	6
<b>FIV e FeLV+</b>	-	-	1	100,0	1
<b>Negativo</b>	6	60,0	4	40,0	10
<b>TOTAL</b>	8		15		23

+: positivo, -: negativo.

Na tabela 9, encontram-se apresentados a resenha dos felinos infectados por micoplasmas hemotrópicos, resultado da pesquisa de inclusões no esfregaço sangüíneo, o número de reticulócitos e o *status* em relação aos retrovírus.

Tabela 9 – Identificação, idade, sexo, características raciais, espécie de micoplasma hemotrópico, pesquisa de estruturas epiteliais de *Mycoplasma* spp., número de reticulócitos e infecção pelos retrovírus (FIV e/ou FeLV) nos felinos anêmicos positivos para os hemoplasmas (n=25). São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Felino	Idade	Sexo	Raça	Hemoplasma	Esfregaço sangüíneo	Número de reticulócitos ( $\mu$ L)	Retrovírus
132611	10a 3m	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	33.000	FIV
172419	9m	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Positivo	370.800	FeLV
171489	10a 4m	Fêmea	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	268.000	Negativo
174298	6m	Fêmea	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Positivo	17.200	FeLV
174509	12a 1m	Fêmea	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	61.200	Negativo
94533	17a	Macho	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	4.000	Negativo
175048	8a 3m	Fêmea	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	3.800	FIV
174357	3a	Macho	SRD	<i>M. haemocanis</i>	Negativo	67.600	FIV e FeLV
175878	1a	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	67.200	Negativo
176370	6a	Fêmea	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	540.000	Negativo
Bu	1a	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Positivo	224.000	Negativo
180081	6a 2m	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	5.900	FeLV
165947	8a 3m	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	3.800	FIV
181630	8a 1m	Fêmea	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	3.400	Negativo
183063	5a 3m	Macho	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	4.100	Negativo
P9	4a	Macho	SRD	" <i>C. M. turicensis</i> "	Negativo	6.800	Negativo
184774	11a 6m	Macho	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	431.200	FIV
184256	10a 4m	Fêmea	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	7.000	Negativo
185466	1a	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Positivo	15.900	FeLV
185612	2a	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Positivo	336.600	Negativo
185584	8a	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	4.900	FeLV
187318	1a 9m	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Positivo	48.000	FeLV
186546	7a 11m	Macho	SRD	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	5.500	FIV e FeLV
125130	16a 3m	Fêmea	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	4.900	FIV
62062	13a 7m	Macho	Siamês	<i>M. haemofelis</i>	Negativo	4.500	FIV

a: ano (s); m: mês (es); SRD: sem raça definida.

Quanto aos felinos infectados por “*Candidatus M. turicensis*” ou *M. haemocanis*, ambos eram machos, de 4 anos e 3 anos de idade, respectivamente. O primeiro apresentou discreta diminuição do hematócrito e ausência de sinais de regeneração e o segundo, anemia mais profunda com sinais de regeneração medular. Em ambos, a trombocitopenia foi discreta (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores de hemograma e bioquímica sérica dos felinos positivos para “*Candidatus M. turicensis*” e *M. haemocanis*. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

Parâmetros	“ <i>Candidatus M. turicensis</i> ” + (n=1/270)	<i>M. haemocanis</i> + (n=1/270)	Valores de referência (LATIMER et al., 2003)
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6,8	2,6	5,0 – 10,0
Hematócrito (%)	29	18	30 – 45
Hemoglobina (g/dL)	10,2	5	9,8 – 15,4
VCM (fL)	43	69	39 – 55
HCM (pg)	15	19	13 – 17
CHCM (%)	35	28	30 – 36
Reticulócitos (/ $\mu\text{L}$ )	6.800	67.600	$\geq 50.000$
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	19.700	19.700	5.500 – 19.500
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	100.000	156.000	300.000 – 800.000
Uréia (mg/dL)	64,7	120,6	40 – 73
Creatinina (mg/dL)	1,2	1,3	0,9 – 2,2
Proteínas Totais (g/dL)	6,1	9,0	6,0 – 7,9
Albumina (g/dL)	2,3	2,3	2,8 – 3,9
ALT (U/L)	39,4	18,5	25 – 97
AST (U/L)	17,2	28,3	7 – 38
FA (U/L)	27,7	3,7	0 – 45
GGT (U/L)	0	1,8	–
Bilirrubina Total (mg/dL)	–	0,6	0 – 0,1
Bilirrubina Direta (mg/dL)	–	0,4	0 – 0,1
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	–	0,2	0

+: positivo, -: negativo.

As concentrações das bilirrubinas não foram mensuradas nos felinos que não apresentaram soro icterico.

**ALT:** alanina aminotransferase, **AST:** aspartato aminotransferase, **CHCM:** concentração de hemoglobina corpuscular média, **FA:** fosfatase alcalina, **GGT:** gamaglutamil transferase, **HCM:** hemoglobina corpuscular média, **VCM:** volume corpuscular médio.



## 5 Discussão

A pesquisa do agente em hemácias parasitadas, único critério de diagnóstico etiológico utilizado antes do surgimento das técnicas moleculares, é um teste de pouca sensibilidade e especificidade (WESTFALL et al., 2001; TASKER; LAPPIN, 2002; TASKER et al., 2003). Por esse método, foram identificados apenas seis felinos anêmicos (n=6/270) que apresentaram estruturas epicelulares eritrocitárias; as quais foram classificadas como *M. haemofelis* após o seqüenciamento produto da Nested-PCR. Em cinco felinos adicionais, foram visualizadas estruturas semelhantes em raros eritrócitos, porém repetidas extrações de material genético das amostras sangüíneas e análises moleculares não confirmaram a infecção por *Mycoplasma* spp. A especificidade diagnóstica é muitas vezes prejudicada pela semelhança dos microrganismos com precipitados do corante ou corpúsculos de Howell-Jolly (TASKER; LAPPIN, 2002). As diferenças de sensibilidade e especificidade entre essas duas técnicas foram evidenciadas pelo baixo grau de concordância obtido no teste Kappa (K=0,293). Além disso, por meio do diagnóstico citológico não é possível a diferenciação entre as espécies de micoplasmas hemotrópicos (WILLI et al., 2007b). Já a reação de Nested-PCR permitiu a identificação de 25 amostras positivas dentre os felinos anêmicos, das quais vinte e três foram confirmadas pelo seqüenciamento dos *amplicons* obtidos como sendo *M. haemofelis*, e duas outras, como “*Candidatus M. turicensis*” e *M. haemocanis*, respectivamente.

A amostra de felinos sadios estudada, oriunda de uma população de felinos com adequado manejo nutricional e sanitário, domiciliados e mantidos como animais de estimação único ou em pequenos grupos pode ter influenciado na ausência da infecção por *Mycoplasma* spp. A inexistência de infecção por *M. haemofelis* entre os felinos do grupo controle coincide com as observações de Jensen, Lappin et al. (2001) e Inokuma (2004), para os quais a infecção por *M. haemofelis* é raramente encontrada em felinos hígidos. Como agente oportunista, é encontrado associado a condições de estresse, em que a infecção pode resultar no desenvolvimento de um grave processo anêmico, pela destruição dos eritrócitos parasitados (HARVEY, 2006). O mesmo não ocorre com “*Candidatus M. haemominutum*”, que pode ser encontrado em felinos aparentemente hígidos, sem nenhum comprometimento físico ou alterações hematológicas (JENSEN et al., 2001; TASKER, 2006). Entretanto, na

população estudada, o material genético do último microrganismo não foi encontrado, tanto nos felinos hígdos quanto no grupo dos felinos anêmicos.

O “*Candidatus M. haemominutum*” passou a ser detectado em amostras de sangue de felinos, com o advento das técnicas moleculares que permitem distingui-lo do *M. haemofelis* (JENSEN et al., 2001). A infecção pelo “*Candidatus M. haemominutum*” é amplamente citada na literatura (FOLEY et al., 1998; JENSEN et al., 2001; TASKER et al., 2003; BATISTA, 2004; LURIA et al., 2004; WILLI et al., 2006a; MACIEIRA et al., 2007; SYKES et al., 2008), porém ainda não se conhece o real significado da presença desses microrganismos no sangue circulante dos felinos, nem o papel patogênico desempenhado na gênese dos processos anêmicos (TASKER, 2006). A presença desse microrganismo em felinos domésticos do Brasil foi revelada por técnicas moleculares (BATISTA, 2004; BAUMANN et al., 2006; MACIEIRA et al., 2007), sendo a prevalência da infecção da ordem de 5% a 12%, na dependência da população estudada e da técnica molecular utilizada.

Em estudos de casuística hospitalar realizados em 149 gatos da cidade do Rio de Janeiro (MACIEIRA et al., 2007) e em 74 gatos da cidade de Botucatu (BATISTA, 2004), a frequência de infecção por *M. haemofelis* variou, de 6 a 14,9%. Quando comparado aos resultados de Bauman et al. (2006), que encontraram 34,5% (n=14/37) dos felinos anêmicos infectados por *M. haemofelis*, o percentual de 8,5% (n=23/270) de infecção, encontrado neste estudo é bastante baixo. Essa discrepância pode ser creditada ao critério de inclusão adotado, de hematócrito  $\leq 29\%$ , enquanto no estudo retro mencionado, foram incluídos felinos com hematócrito  $\leq 25\%$ , além disso, o número de animais utilizados em cada estudo também pode contribuir com essa diferença. A frequência de 8,5% é mais próxima do percentual de 4,8% (n=15/310) observado por Sykes et al. (2008), que avaliaram felinos anêmicos dos Estados Unidos e utilizaram como critério de inclusão a presença dos microrganismos em esfregaços sanguíneos e/ou hematócrito  $\leq 29\%$ .

Alguns autores (GRINDEM et al., 1990; SYKES et al., 2008) observaram maior predisposição dos felinos jovens à infecção por micoplasmas hemotrópicos, enquanto outros (TASKER et al., 2003; BAUER et al., 2008) relatam maior associação desses agentes com animais mais velhos. Na amostragem estudada não foi comprovada associação por meio do teste do qui-quadrado de qualquer faixa etária com a infecção por *M. haemofelis* (p=0,100). Assim como observado por Tasker et al. (2004a) nenhuma associação foi evidenciada entre a infecção por *M.*

*haemofelis* e as características raciais dos felinos ( $p=0,122$ ). A infecção micoplásmica é relatada mais frequentemente em machos (JENSEN et al., 2001; HARRUS et al., 2002; SYKES et al., 2008), assim como foi observado no presente estudo ( $p=0,039$ ), provavelmente devido ao comportamento (acesso ao meio externo e brigas) que aumenta a exposição dos gatos à infecção pelo *M. haemofelis* (HARVEY, 2006).

Embora o critério de inclusão no estudo tenha sido a presença de anemia, as alterações hematológicas e bioquímicas observadas somente nos felinos infectados por *M. haemofelis* evidenciaram o potencial patogênico dessa espécie de micoplasma hemotrópico. O grau de anemia foi mais intenso nos felinos infectados por *M. haemofelis*. Inokuma et al. (2004) também observaram anemia mais grave em felinos infectados por *M. haemofelis*. No curso da infecção micoplásmica, os eritrócitos geralmente são macrocíticos, com VCM maior que 50fL (HARRUS et al., 2002; HARVEY, 2006; SYKES et al., 2008), indicando o caráter regenerativo da anemia. Apesar de não ter sido observada evidente macrocitose, o VCM dos felinos infectados foi maior do que nos felinos não-infectados. Sykes et al. (2008) observaram número de reticulócitos significativamente maior nos felinos positivos para *M. haemofelis*, em concordância com outros autores (SYKES, 2003; TASKER, 2006; WILLI et al., 2007b) que caracterizam a infecção micoplásmica como causa de anemia regenerativa. Ao se classificar os animais do grupo Mhf + em relação ao tipo de anemia de acordo com a regeneração medular, observou-se uma maior frequência de anemia arregenerativa (65,2%) nesse grupo e em apenas 26,1% desses felinos foi observada regeneração medular do tipo regenerativa acentuada (número de reticulócitos  $>200.000/\mu\text{L}$ ).

Segundo Harrus et al. (2002), a leucocitose foi uma alteração hematológica evidente nos felinos com MHF, entretanto, no presente estudo não foi observado alteração com relação à contagem de leucócitos no grupo Mhf +. O número de plaquetas comumente está dentro da faixa de normalidade nos felinos infectados por esse agente (HARVEY, 2006). Quanto ao número de plaquetas, foi observada diferença significativa entre os grupos Mhf + e Mhf – ( $p=0,0001$ ), os felinos positivos para *M. haemofelis* apresentaram contagens menores. Porém, esse valor reduzido possivelmente decorre do fato da agregação plaquetária ser um problema comum em amostras sangüíneas de felinos (LATIMER et al., 2003).

Aumentos da atividade sérica de ALT e das concentrações séricas das bilirrubinas, também citados por outros autores (HARRUS et al., 2002; HARVEY, 2006; SYKES et al., 2008), foram observados nos felinos infectados por *M. haemofelis*, indicando o comprometimento hepático. Os aumentos da atividade sérica das enzimas hepáticas (ALT e AST) em casos de MHF podem ser atribuídos a hipóxia hepática secundária à anemia, ou a lipidose hepática secundária à anorexia (HARVEY, 2006). O aumento das concentrações séricas de produtos azotados, também relatados por Harrus et al. (2002) e por Sykes et al. (2008), pode ser creditado à desidratação, tendo ocorrido tanto nos felinos infectados como não-infectados. Já a hiperproteinemia, deve-se ao estímulo antigênico, resultante do aumento da resposta imune pela presença do agente infeccioso. Cabe ressaltar que apenas a atividade sérica da enzima hepática ALT ( $p=0,0207$ ) e as concentrações das bilirrubinas (total,  $p=0,0090$ ; direta,  $p=0,0108$ ; indireta,  $p=0,0073$ ) apresentaram significância estatística entre os grupos Mhf + e Mhf –.

A associação entre a infecção pelos micoplasmas hemotrópicos e o FeLV é observada mais freqüentemente (BOBADE et al., 1988; GRINDEM et al., 1990; HAGIWARA et al., 1997; GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002) do que a associação com o FIV, contudo Luria et al. (2004) descrevem uma freqüência maior de hemoplasmas nos felinos infectados por FIV. Macieira et al. (2007), observaram em felinos do Rio de Janeiro uma forte associação entre FIV e "*Candidatus M. haemominutum*". No presente estudo a associação entre FIV e *M. haemofelis* ( $p=0,009$ ) foi discretamente mais presente do que a associação com o FeLV ( $p=0,015$ ), evidenciando que os felinos positivos para FIV e/ou FeLV, independente do retrovírus envolvido, apresentam maiores chances de adquirir a infecção micoplásmica quando comparados ao felinos não infectados por FIV e/ou FeLV.

A infecção por FeLV geralmente acomete animais mais jovens (HARTMANN, 2006), enquanto o FIV predomina em felinos mais velhos (MUIRDEN, 2002). Apesar de não ter sido possível a utilização de outro tipo de análise estatística que não a descritiva, pode-se observar que a distribuição dos felinos co-infectados por *M. haemofelis* e os retrovírus obedeceu à faixa etária de risco para os retrovírus, o que possivelmente seja um indicativo de que a disfunção imunológica resultante da infecção pelos retrovírus pode predispor à infecção por micoplasmas hemotrópicos, especificamente pelo *M. haemofelis*, não se excluindo a possibilidade de infecção por outros hemoplasmas. Como observado por outros autores (JUNQUEIRA-

JORGE, 2005; HARTMANN, 2006), a infecção por FIV ou FeLV foi freqüente em felinos machos, do mesmo modo, a positividade para os hemoplasmas (JENSEN et al., 2001; HARRUS et al., 2002; SYKES et al., 2008), devido ao comportamento dos machos de brigas e acessos constantes a rua, os mesmos tornam-se mais expostos a diversos agentes infecciosos.

Na maioria das vezes, a anemia causada por micoplasmas hemotrópicos apresenta caráter regenerativo (KEWISH et al., 2004; TASKER, 2006), porém em alguns felinos com doenças concomitantes a anemia pode ser arregenerativa (TASKER, 2006), conforme observado; a resposta reticulocitária foi evidente nos felinos do grupo Mhf + que não apresentavam infecção pelos retrovírus, contudo naqueles co-infectados por retrovírus, não observou-se presença de regeneração medular.

A co-infecção de *M. haemofelis* e FeLV geralmente resulta em anemia e manifestações clínicas mais graves do que a infecção só com o micoplasma hemotrópico (BOBADE et al., 1988; HARRUS et al., 2002). De acordo com Luria et al. (2004), a associação das infecções pelos retrovírus (FIV e FeLV) com os micoplasmas hemotrópicos sugere que o efeito imunossupressor desses vírus aumente a patogenicidade dos hemoplasmas como infecção secundária ou que os fatores de riscos são similares à esses vírus e bactérias. Contudo, devido ao número reduzido de felinos co-infectados por *M. haemofelis* e os retrovírus não foi possível avaliar por meio de metodologia estatística se esses animais apresentaram alterações bioquímicas e hematológicas mais significantes do que os felinos infectados apenas por *M. haemofelis*.

O agente "*Candidatus M. turicensis*" foi identificado apenas recentemente e tem sido descrito em felinos domésticos na Suíça (WILLI et al., 2006a), Reino Unido (TERRY et al., 2007), Estados Unidos (TERRY et al., 2007), África do Sul (WILLI et al., 2006b), Austrália (WILLI et al., 2006b) e Japão (FUJIHARA et al., 2007), e em um felídeo silvestre no Brasil (WILLI et al., 2007c). Esse é o primeiro relato da infecção por "*Candidatus M. turicensis*" em felino doméstico no Brasil. O felino infectado por "*Candidatus M. turicensis*" desse estudo era um macho de quatro anos de idade sem raça definida, proveniente de um abrigo de animais de rua, negativo para os retrovírus. Segundo Willi et al. (2006b), felinos machos são mais freqüentemente infectados por essa espécie de hemoplasma.

A pesquisa de inclusões epicelulares dos hemoplasmas no esfregaço sangüíneo desse felino foi negativa, conforme observado no estudo relatado por Willi et al. (2006b), que relataram poucos microrganismos do “*Candidatus M. turicensis*” encontrados no sangue quando comparados aos em felinos infectados por *M. haemofelis* ou “*Candidatus M. haemominutum*”. Desta maneira, as chances de visualização de tais estruturas nos esfregaços sangüíneos são reduzidas. O potencial patogênico do “*Candidatus M. turicensis*” depende principalmente de cofatores, como imunossupressão iatrogênica ou secundária à infecção por retrovírus (WILLI et al., 2006a). Entretanto, o felino infectado com “*Candidatus M. turicensis*” com um quadro grave de hemólise intravascular descrito por Willi et al. (2005) não era positivo para nenhum dos retrovírus, assim como os felinos infectados experimentalmente, os quais também desenvolveram anemia que variou de moderada a grave. Um outro estudo realizado por Willi et al. (2006) relatou a ocorrência do “*Candidatus M. turicensis*” em apenas seis felinos dos 627 doentes testados, entretanto, metade desses felinos estava co-infectado com o “*Candidatus M. haemominutum*”, o que prejudica a interpretação do potencial patogênico dessa nova espécie de hemoplasma. Com exceção da discreta anemia de caráter não-regenerativo que o felino infectado por “*Candidatus M. turicensis*” desse estudo apresentava, não foi observada nenhuma alteração hematológica ou bioquímica que indicasse algum comprometimento orgânico. Entretanto, por ter sido observada em apenas uma oportunidade, não é possível extrair qualquer conclusão sobre o significado patológico do encontro desse microrganismo, como também mencionado por Sykes et al. (2008).

A observação de *M. haemocanis* em hemácias de um felino na população estudada pode ser explicada pelo fato dos micoplasmas hemotrópicos de felinos apresentam uma forte relação filogenética com os hemoplasmas de cães e roedores (LUMB, 2001; WILLI et al., 2007b). Em um estudo experimental, sangue de cão infectado com hemoplasma foi inoculado em felinos, que permaneceram assintomáticos. Entretanto, quando o sangue desses felinos foi inoculado em cães esplenectomizados, esses desenvolveram bacteremia (LUMB, 2001), sugerindo que os gatos podem ser portadores dos hemoplasmas de cães. Em um outro estudo, a presença de micoplasma hemotrópico de roedores foi observada em gatos (WILLI et al., 2007a). A transmissão interespecies deve ser investigada e o potencial zoonótico dos hemoplasmas não deve ser excluído (WILLI et al., 2007b). O felino em que foi

observada a infecção por esse microrganismo, apresentou anemia profunda; entretanto não se evidenciou a resposta eritróide, como ocorre nas infecções por *M. haemofelis*. Anemias não regenerativas são observadas na hipoplasia eritróide, na deficiência de eritropoietina nos processos renais crônicos e nas infecções por retrovírus (LATIMER et al., 2003). Possíveis reações idiossincrásicas a fármacos e a insuficiência renal crônica foram excluídas como prováveis causas da anemia. Foi observada nesse felino a infecção concomitante pelos retrovírus felinos, FIV e FeLV. A imunodeficiência resultante da infecção simultânea por ambos os vírus pode estar envolvida na gênese da anemia e ter possibilitado a infecção de forma oportunista por *M. haemocanis*.

## 6 Conclusões

A análise do esfregaço sangüíneo não é um teste sensível e específico para o diagnóstico da infecção pelos micoplasmas.

As informações obtidas das alterações hematológicas e bioquímicas correlacionadas à infecção pelo *M. haemofelis* evidenciaram o potencial patogênico dessa espécie de micoplasma hemotrópico.

A disfunção imunológica resultante da infecção pelos retrovírus pode predispor à infecção por micoplasmas hemotrópicos, especificamente pelo *M. haemofelis*, não se excluindo a possibilidade de infecção por outros hemoplasmas.

A MHF causada por *M. haemofelis* é uma doença de importância clínica, principalmente quando em associação com as retrovirose (FIV e/ou FeLV) que acometem os felinos. Portanto, felinos anêmicos, independente da presença ou não de regeneração medular, devem ser avaliados quanto à infecção por micoplasmas e/ou retrovírus.

Esse é o primeiro relato de infecção pelo "*Candidatus M. turicensis*" em felino doméstico no Brasil, que deve ser incluído como um agente no diagnóstico da micoplasmose hemotrópica em felinos.

Poucas informações estão disponíveis a cerca do "*Candidatus M. turicensis*", conseqüentemente, são necessários estudos mais abrangentes sobre a patogenia dessa espécie de hemoplasma que acometem os felinos domésticos.

Devido à possibilidade de infecção por espécies de hemoplasmas que acometem outros animais, no diagnóstico da infecção deve-se determinar a espécie de micoplasma hemotrópico envolvida, possibilitando uma melhor interpretação de um resultado positivo para a infecção.

A transmissão interespecies dos micoplasmas hemotrópicos necessita ser mais bem estudada.



## Referências

ALLEMAN, A. R.; PATE, M. G.; HARVEY, J. W.; GASKIN, J. M.; BARBET, A. F. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1474-1479, 1999.

ALMOSNY, N. R. P. O gênero *Haemobartonella*. In: ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária Ltda, 2002. p. 89-109.

BATISTA, T. N. ***Mycoplasma haemofelis* e "Candidatus Mycoplasma haemominutum" em gatos (*Felis catus*)**. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2004.

BAUER, N.; BALZER, H. J.; THURE, S.; MORITZ, A. Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 3, p. 252-258, 2008.

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

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infection and Immunology**, v. 71, n. 6, p. 3657-3662, 2003.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B.; COOPER, S. K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 10, p. 1215-1220, 1998.

BOBADE, P. A.; NASH, A. S.; ROGERSON, P. Feline haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus. **Veterinary Records**, v. 122, n. 2, p. 32-36, 1988.

BROCKUS, C. W.; ANDREASEN, C. B. Erythrocytes. In: LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, A. E.; W., P. K. **Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 3-45.

DUARTE, M. I. S.; OLIVEIRA, M. S.; SHIKANAY-YASUDA, M. A.; MARIANO, O. N.; TAKAKURA, C. F. H.; PAGLIARI, C.; CORBETT, C. E. T. Haemobartonella-like microorganism infection in HIV patients; ultrastructural pathology. **The Journal Infectious Diseases**, v. 165, n. 5, p. 976-977, 1992.

FERNANDEZ, F. R.; GRINDEM, C. B. Reticulocyte response. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia, 2000. p. 110-116.

FLEISS, J. L.; LEVIN, B.; PAIK, M. C. **Statistical Methods for Rates and Proportions**. New York: Wiley Interscience, 2003. 800 p.

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, 1998.

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

FUJIHARA, M.; WATANABE, M.; YAMADA, T.; HARASAWA, R. Occurrence of '*Candidatus* Mycoplasma turicensis' infection in domestic cats in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 10, p. 1061-1063, 2007.

GELATT, K. N.; VAN DER WOERDT, A.; KETRING, K. L.; ANDREW, S. E.; BROOKS, D. E.; BIROS, D. J.; DENIS, H. M.; CUTLER, T. J. Enrofloxacin-associated retinal degeneration in cats. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 2, p. 99-106, 2001.

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.

GERMAN, A. J.; CANNON, M. J.; DYE, C.; BOOTH, M. J.; PEARSON, G. R.; REAY, C. A.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Oesophageal strictures in cats associated with doxycycline therapy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 7, n. 1, p. 33-41, 2005.

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.

HAGIWARA, M. K. Anemia. In: SOUZA, H. J. M. **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, 2003. p. 15-24.

HAGIWARA, M. K.; RECHE JÚNIOR, A.; LUCAS, S. R. R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 35-38, 1997.

HARRUS, S.; KLEMENT, E.; AROCH, I.; STEIN, T.; BARK, H.; LAVY, E.; MAZAKI-TOVI, M.; BANETH, G. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. **Veterinary Records**, v. 151, n. 3, p. 82-85, 2002.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. St. Louis: Elsevier, 2006. p. 105-131.

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

HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M.; AMIOKA, M.; OKADA, S.; KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **Journal of Virological Methods**, v. 70, n. 1, p. 107-111, 1998.

INOKUMA, H.; TAROURA, S.; OKUDA, M.; HISASUE, M.; ITAMOTO, K.; UNE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Molecular survey of *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' infection in cats in Yamaguchi and surrounding areas. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 8, p. 1017-1020, 2004.

JENSEN, W. A.; LAPPIN, M. R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W. J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 604-608, 2001.

JUNQUEIRA-JORGE, J. J. **Estudo dos fatores de risco da leucemia viral felina no município de São Paulo**. 2005. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

KEWISH, K. E.; APPELYARD, G. D.; MYERS, S. L.; KIDNEY, B. A.; JACKSON, M. L. *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 9, p. 749-752, 2004.

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.

LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, A. E.; PRASSE, K. W. **Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. Iowa: Iowa State Press, 2003. 488 p.

LUMB, W. W. More information on haemobartonellosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 6, p. 732-733, 2001.

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.

MACIEIRA, D. B.; DE MENEZES, R. D.; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R.; MCLANE, H. L.; DAGGY, J. K.; MESSICK, J. B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro - Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 2, p. 120-129, 2007.

MCGROTTY, Y. L.; KNOTTENBELT, C. M. Oesophageal stricture in a cat due to oral administration of tetracyclines. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, n. 5, p. 221-223, 2002.

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

MESSICK, J. B.; BERENT, L. M.; COOPER, S. K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 462-466, 1998.

MUIRDEN, A. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. **Veterinary Records**, v. 150, n. 20, p. 621-625, 2002.

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, n. Pt 3, p. 891-899, 2001.

\_\_\_\_\_. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. Pt 2, p. 683, 2002.

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.

SHAW, S. E.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouche) in the United Kingdom. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 3-4, p. 183-188, 2004.

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

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

TASKER, S.; BINNS, S. H.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A.; HELPS, C. R.; JENSEN, W. A.; OLVER, C. S.; LAPPIN, M. R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. **Veterinary Records**, v. 152, n. 7, p. 193-198, 2003.

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

TASKER, S.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; HARBOUR, D. A.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; LAPPIN, M. R. Use of a Taqman PCR to determine the response of *Mycoplasma haemofelis* infection to antibiotic treatment. **Journal of Microbiology Methods**, v. 56, n. 1, p. 63-71, 2004b.

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.

\_\_\_\_\_. Update on hemoplasmosis. In: AUGUST, J. R. **Consultations in Feline Internal Medicine**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006. p. 605-609.

TERRY, J.; OWENS, S.; LINDSAY, L. L.; SYKES, J. E. Epidemiology of hemoplasma infections in cats with suspected hemoplasmosis using conventional and real-time PCR. In: Congress Proceedings of the ACVIM Forum, 2007, **Proceedings**. Seattle, p. 824.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Colorado: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 83-120 p.

VANSTEENHOUSE, J. L.; TABOADA, J.; MILLARD, J. R. Feline hemobartonellosis. **Compendium of Continuing Education Practice Veterinary**, v. 15, n. 4, p. 535-545, 1993.

WESTFALL, D. S.; JENSEN, W. A.; REAGAN, W. J.; LAPPIN, M. R. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 5, p. 687-691, 2001.

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

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

WILLI, B.; FILONI, C.; CATAO-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, 2007c.

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 pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4430-4435, 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.



APÊNDICE A – Valores dos parâmetros hematológicos dos felinos infectados por *M. haemofelis* (n=23) de acordo com a infecção pelos retrovírus. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

	Identificação	Hemácias x 10 <sup>6</sup> /L	Hematócrito %	Hemoglobina x g/dL	VCM fL	HCM pg	CHCM %	Reticulócitos / $\mu$ L	Leucócitos x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	Plaquetas X 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L
FIV +	132611	5,5	29	8,9	53	16	31	33.000	16.100	129.000
	165947	3,8	19	6,0	50	16	32	3.800	7.600	119.000
	184774	2,8	13	4,0	46	14	31	431.200	58.400	216.000
	125130	4,9	21	7,0	43	14	33	4.900	7.200	235.000
	62062	4,5	24	7,7	53	17	32	4.500	9.400	171.000
	175048	3,8	17	5,2	45	14	31	3.800	46.300	119.000
FeLV +	172419*	1,8	12	3,8	67	21	32	370.800	28.700	481.000
	174298*	4,3	24	7,5	56	17	31	17.200	18.018	165.000
	180081	5,9	29	9,3	49	16	32	5.900	7.700	311.000
	185466*	5,3	27	8,8	51	17	33	15.900	11.000	84.000
	185584	4,9	22	7,9	45	16	36	4.900	7.900	51.000
	187318*	4,0	21	6,4	53	16	30	48.000	16.100	315.000
FIV e FeLV +	186546	5,5	27	8,7	49	16	32	5.500	8.300	184.000
FIV e FeLV -	171489	4,0	27	8,9	68	22	33	268.000	17.700	383.000
	174509	5,1	27	9,3	53	18	34	61.200	24.500	60.000
	94533	4,0	27	9,6	68	24	36	4.000	20.500	201.000
	185612*	3,3	18	5,8	55	18	32	336.600	25.300	55.000
	175878	4,5	25	8,4	56	19	31	67.200	24.300	101.000
	176370	1,6	12	3,8	75	24	34	540.000	7.256	166.000
	Bu*	3,4	16	5,0	47	15	32	224.000	11.727	107.000
	181630	4,1	18	6,1	44	15	31	3.400	14.100	132.000
	183063	7,0	29	10,0	41	14	34	4.100	32.500	127.000
	184256	3,3	18	5,8	55	18	34	7.000	23.800	219.000
<b>Valores de referência<sup>†</sup></b>		<b>5,0 – 10,0</b>	<b>30 - 45</b>	<b>9,8 – 15,4</b>	<b>39 - 55</b>	<b>13 - 17</b>	<b>30 - 36</b>	<b>≥50.000</b>	<b>5.500 -19.500</b>	<b>300.000 - 800.000</b>

\* Esfregaço sanguíneo positivo para estruturas de *Mycoplasma* spp.

† Latimer et al., 2003.

APÊNDICE B – Valores dos parâmetros bioquímicos séricos dos felinos infectados por *M. haemofelis* (n=23) de acordo com a infecção pelos retrovírus. São Paulo, fevereiro de 2006 a outubro de 2007

	Identificação	Uréia mg/dL	Creatinina mg/dL	Proteína g/dL	Albumina g/dL	ALT U/L	AST U/L	FA U/L	GGT U/L	Bilirrubina Total mg/dL	Bilirrubina Direta mg/dL	Bilirrubina Indireta mg/dL
FIV +	132611	39,40	0,90	3,90	1,60	48,80	362,30	11,10	1,90	1,60	0,90	0,70
	165947	95,40	2,40	7,40	3,00	10,10	5,20	47,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	184774	48,00	1,30	9,50	2,30	21,20	17,40	25,60	0,00	0,00	0,00	0,00
	125130	185,90	1,20	4,70	2,00	1599,60	1247,90	9,10	0,00	0,40	0,20	0,20
	62062	760,20	14,20	73,10	3,30	29,90	37,10	6,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	175048	43,80	1,30	5,70	2,60	31,30	15,20	23,80	0,00	0,50	0,40	0,10
FeLV +	172419*	221,70	3,50	9,60	3,40	151,90	51,00	62,80	1,40	0,30	0,20	0,10
	174298*	90,00	1,20	8,40	1,90	58,90	46,50	112,80	2,30	2,00	1,00	1,00
	180081	43,60	1,60	7,80	2,70	35,90	17,50	74,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	185466*	81,60	1,10	6,40	2,60	29,00	25,60	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00
	185584	45,00	1,60	7,60	2,40	21,50	40,40	39,80	0,80	1,20	0,60	0,60
	187318*	37,00	0,70	3,50	1,80	34,50	39,90	8,80	0,00	4,70	2,40	2,30
FIV e FeLV +	186546	60,60	1,50	8,10	3,20	17,50	3,60	10,40	0,00	0,00	0,00	0,00
FIV e FeLV -	171489	59,00	1,50	9,00	2,40	52,00	32,80	36,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	174509	42,70	8,90	8,90	3,10	40,80	24,70	20,80	0,30	0,00	0,00	0,00
	94533	547,00	7,90	9,80	3,20	198,70	61,50	114,80	1,30	0,00	0,00	0,00
	185612*	72,40	1,80	7,10	3,20	47,40	42,00	12,40	0,00	0,00	0,00	0,00
	175878	38,30	1,00	7,50	3,00	20,80	20,70	7,60	1,70	9,10	4,40	4,70
	176370	62,00	1,20	7,50	3,10	107,80	64,60	9,10	0,00	9,50	1,70	7,80
	Bu*	60,90	1,30	7,10	3,00	30,80	13,90	33,50	0,00	0,00	0,00	0,00
	181630	265,00	2,80	7,10	2,80	33,30	20,90	13,30	0,00	0,00	0,00	0,00
	183063	402,90	5,40	6,40	2,60	353,40	1122,90	96,70	0,00	21,50	14,30	7,20
	184256	76,30	1,20	6,80	2,80	109,30	69,30	58,00	0,00	27,10	14,10	13,00
<b>Valores de referência*</b>		<b>40 - 73</b>	<b>0,9 - 2,2</b>	<b>6,0 - 7,9</b>	<b>2,8 - 3,9</b>	<b>25 - 97</b>	<b>7 - 38</b>	<b>0 - 45</b>	<b>–</b>	<b>0,0 – 0,1</b>	<b>0,0 – 0,1</b>	

\* Esfregaço sangüíneo positivo para estruturas de *Mycoplasma* spp.

\* Latimer et al., 2003.

ANEXO A – Sequência de nucleotídeos disponível no GenBank referente a amostra positiva para *M. haemofelis* utilizada como controle positivo das reações moleculares.

1: [EU442639](#). Reports *Mycoplasma haemof...*[gi:168258691] [Links](#)  
[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS EU442639 1207 bp DNA linear BCT 26-FEB-2008  
 DEFINITION *Mycoplasma haemofelis* strain USP-24 16S ribosomal  
 RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION EU442639  
 VERSION EU442639.1 GI:168258691  
 SOURCE *Mycoplasma haemofelis*  
 ORGANISM [Mycoplasma haemofelis](#)  
 Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae;

*Mycoplasma*.  
 AUTHORS Hora, A.S., Brandao, P.E. and Hagiwara, M.K.  
 FEATURES  
 source 1..1207  
 /organism="Mycoplasma haemofelis"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="USP-24"  
 /specific\_host="Felis catus"  
 /db\_xref="taxon:29501"  
 /country="Brazil"  
 /collection\_date="2007"  
[rRNA](#) <1..>1207  
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1  tgcacctctg  tgggggatag  cgccttgaaa  aagcgattaa  taccccatag  gaagctttat
61  ccatgattta  gcttttaaag  ccttcgggtg  ctgagggatt  gggatatgct  ctattagcta
121  gttggcggga  taaaagccca  ccaaggcaat  gatagatagc  tggctttaga  ggatgaacag
181  ccacaatggg  attgagatac  ggcccatatt  cctacgggaa  gcagcagtag  ggaatcttcc
241  acaatggacg  aaagtctgat  ggagcaatac  catgtgaacg  atgaaggcct  ttttggttgt
301  aaagtctctt  tacgagggat  aattatgata  gtacttcgtg  aataagtgac  agcaaactat
361  gtgccagcag  ctgcggtaat  acataggctc  cgagcattat  tcggatttat  tgggcgtaaa
421  gcaagcgcag  gcggatgtgt  aagttctgtg  ttaaatgcag  ctactcaata  gttgtatgca
481  ccgaatacta  catgtctaga  ttgtggtagg  gagtttcgga  attaagcatg  gagcgggtga
541  atgtgtagat  atgcttaaga  acaccagagg  cgaaggcgga  aactaggccc  ataaatgacg
601  cttaggcttg  aaaagtgtgg  ggagcaaata  ggattagata  cccagtagt  ccacaccgta
661  aacgatgggt  attagatatt  agggctttag  ctttagtgtt  gtagcttacg  cgtaaatac
721  cccgcctggg  tagtacatat  gcaaataatga  aactcaaagg  aattgacggg  gacctgaaca
781  agtgggtggg  catggttctt  aattcgataa  tacacgaaaa  acctaccaaa  ggtttgacat
841  ccctcgcaaa  gctatagaaa  tatagtagag  gttatcgagg  tgacaggtgg  tgcatggctg
901  tcgtcagctc  gtgtcttgag  atggttggtt  aagtcccgca  acgagcgcaa  cccactctt
961  tagttacttg  ttctaaagag  actgcacagt  aatgtagagg  aaggatggga  tcacgtcaag
1021  tcatcatgcc  ccttatgcct  tgggctgcaa  acgtgctaca  atggcgaaac  caatgtgttg
1081  caaacacgag  atggtaagct  aatcaccaaa  tttcgtctca  gttcggatag  gaggtgcaa
1141  ttgcctcct  tgaagttgga  atcaactagta  atcccggtgc  agctatatcg  gggatgaatc
1201  gttccca
    //
    
```

ANEXO B – Seqüência de nucleotídeos disponível no GenBank, referente a uma das amostras positivas para *M. haemofelis*.

NCBI Nucleotide

Search: Nucleotide for [Go] [Clear]

Display: GenBank Show: 5 Send to: Hide:  sequence  all but gene, CDS and mRNA features

Range: from begin to end  Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: [EU442616](#). Reports *Mycoplasma haemof...*[gi:168258668] [Links](#)

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS EU442616 591 bp DNA linear BCT 26-FEB-2008  
 DEFINITION *Mycoplasma haemofelis* strain USP-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION EU442616  
 VERSION EU442616.1 GI:168258668  
 SOURCE *Mycoplasma haemofelis*  
 ORGANISM [Mycoplasma haemofelis](#)  
 Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.  
 AUTHORS Hora, A.S., Brandao, P.E. and Hagiwara, M.K.  
 FEATURES  
 source  
 Location/Qualifiers  
 1..591  
 /organism="Mycoplasma haemofelis"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="USP-01"  
 /specific\_host="Felis catus"  
 /db\_xref="taxon:[29501](#)"  
 /country="Brazil"  
 /collection\_date="2007"  
[rRNA](#)  
 <1..>591  
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN  
 1 acgaaagtct gatggagcaa taccatgtga acgatgaagg cctttttggt tgtaaagttc  
 61 ttttacgagg gataattatg atagtacttc gtgaataagt gacagcaaac tatgtgccag  
 121 cagctgcggt aatacatagg tcgcgagcat tattcggatt tattggcgct aaagcaagcg  
 181 caggcggatg tgtaagttct gtgttaaatg cagctactca atagttgtat gcaccgaata  
 241 ctacatgtct agattgtggt agggagtttc ggaattaagc atggagcggg ggaatgtgta  
 301 gatatgctta agaaccaccag aggcgaaggc ggaacttag gccataaatg acgcttaggc  
 361 ttgaaagtgt ggggagcaaa tgggattaga taccocagta gtccacaccg taaacgatgg  
 421 gtattagata ttagggttt agcttttagt ttgtagctta cgcgttaaat accccgcctg  
 481 ggtagtacat atgcaaatat gaaactcaa ggaattgacg gggacctgaa caagtgggtg  
 541 agcatgttgc ttaattcgat aatacacgaa aaaccttacc aaggtttgac a

//

ANEXO C – Sequência de nucleotídeos disponível no GenBank referente à amostra positiva para “*Candidatus M. turicensis*”.

[1: EU442629](#) Reports *Candidatus Mycopl...*[gi:168258681] [Links](#)  
[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS EU442629 534 bp DNA linear BCT 26-FEB-2008  
 DEFINITION *Candidatus Mycoplasma turicensis* strain USP-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION EU442629

VERSION EU442629.1 GI:168258681  
 SOURCE *Candidatus Mycoplasma turicensis*  
 ORGANISM [Candidatus Mycoplasma turicensis](#)  
 Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.  
 AUTHORS Hora,A.S., Brandao,P.E. and Hagiwara,M.K.

FEATURES  
 Location/Qualifiers  
 source 1..534  
 /organism="Candidatus Mycoplasma turicensis"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="USP-14"  
 /specific\_host="Felis catus"  
 /db\_xref="taxon:[346879](#)"  
 /country="Brazil"  
 /collection\_date="2007"  
[rRNA](#) <1..>534  
 /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN  
 1 acaggtcgta aagttctttt agaggggaaa aatctgatgg taccctctga ataagtgaca  
 61 gcaaaactatg tgccagcagc tgcggtaata cataggtgoc gagcgttatt cggatttatt  
 121 gggcgtaaag caagcgcagg cggatgaata agttctgcat taaaagcagc tgcttaacag  
 181 ttgtttgtgc cgaatactat tcaatctagaa tgtggtagaa agttttggaa ttaaatatgg  
 241 agcggtgtaa tgtgtagata tattaagaa caccagaggc gaaggcgaag acttaggcca  
 301 ttattgacgc ttaggcttga aagtgtgggt agcaaatggg attagatacc ccagtagtcc  
 361 acaccgtaaa cgatgggtat tagatgtcgg gacttgagtt tcggcgttgt agcttacgtg  
 421 ttaaataacc cgctgggta gtacatatgc aaatatgaaa ctcaaaggaa ttgacgggga  
 481 cctgaacaag tgggtgaaca tgttgcttaa ttcgataata cacgaaaaac cttta

//

ANEXO D – Seqüência de nucleotídeos disponível no GenBank, referente à amostra positiva para *M. haemocanis*.

1: [EU442623](#). Reports *Mycoplasma haemoc...*[gi:168258675] Links  
[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS EU442623 589 bp DNA linear BCT 26-FEB-2008  
 DEFINITION *Mycoplasma haemocanis* strain USP-08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION EU442623  
 VERSION EU442623.1 GI:168258675  
 SOURCE *Mycoplasma haemocanis*  
 ORGANISM [Mycoplasma haemocanis](#) Bacteria; Firmicutes; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 589)  
 AUTHORS Hora,A.S., Brandao,P.E. and Hagiwara,M.K.  
 FEATURES  
     Location/Qualifiers  
     source  
         1..589  
         /organism="Mycoplasma haemocanis"  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /strain="USP-08"  
         /specific\_host="Canis familiaris"  
         /db\_xref="taxon:[136241](#)"  
         /country="Brazil"  
         /collection\_date="2007"  
         <1..>589  
         /product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN  
 1 cgaaagtctg atggagcaat accatgtgaa cgatgaaggc ctttttggtt gtaaagttct  
 61 tttacgaggg ataattatga tagtacttog tgaataagtg acagcaaact atgtgccagc  
 121 agctgcggtg atacataggt cgcaagcatt attcggattt attggcgcta aagcaagcgc  
 181 aggcggatgt gtaagttctg tgttaaatgc agtactcaa tagttgtatg caccgaatac  
 241 tacatgtcta gattgtgta gggagtttcg gaattaagca tggagcggtg gaatgtgtag  
 301 atatgcttaa gaacaccaga ggcaaggcg gaaacttagg ccataaatga cgcttaggct  
 361 tgaaagtgtg gggagcaaat gggattagat accccagtag tccacaccgt aaacgatggg  
 421 tattagatat tagggcttta gctttagtgt tgtagcttac gcggttaaata ccccgcttgg  
 481 gtagtacata tgcaaatatg aaactcaag gaattgacgg ggacctgaac aagtgggtga  
 541 gcatgttctg taattcgata atacacgaaa aaccttacca aggtttgac

//

# 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](#)