

ANA CLÁUDIA SOARES DE ALMEIDA E NEVES PAIS

**PREVALÊNCIA DE BASE HOSPITALAR DE
MYCOPLASMA HAEMOFELIS TENDO POR BASE UM
HOSPITAL VETERINÁRIO NA COVA DA PIEDADE -
ALMADA**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Medicina Veterinária no
curso de Mestrado Integrado em Medicina
Veterinária conferido pela Universidade
Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientador: Doutor Pedro Faísca

Co-Orientador: Dra. Odete Almeida

Responsável externo: Dra. Joana Sousa

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

Ana Cláudia Neves, Prevalência de Base Hospitalar de *Mycoplasma haemofelis* tendo por base um hospital veterinário na Cova da Piedade - Almada

Dedico este trabalho aos meus pais que me apoiaram incondicionalmente.

Agradecimentos:

Queria agradecer aos meus pais, pelo carinho e paciência que dedicaram ao longo destes anos todos de educação que me proporcionaram.

Ao meu marido Mário, pela força e coragem que me deu todos os dias assim como os empurrões para conseguir terminar este trabalho.

Ao Dr. João e Dra. Ana por me deixarem estagiar no SOSVet assim como a todo o corpo clínico que me ajudou na recolha das amostras e na minha primeira apresentação à vida clínica.

À Prof. Odete Almeida e ao Prof. Pedro Faísca pelo apoio e orientação enquanto escrevia esta tese.

À Dra. Joana Sousa, pelo apoio incondicional que teve desde que se tornou minha responsável no hospital e depois grande amiga.

À DNATech pela atenção e simpatia assim como pela elaboração dos testes que uso neste trabalho.

Ao Prof. Mauro pela paciência, atenção e participação que teve na parte estatística deste trabalho sem o qual teria sido muito complicado.

Resumo:

O *Mycoplasma haemofelis* é um agente patogénico com distribuição mundial que afeta felídeos domésticos e selvagens alterando significativamente o seu estado de saúde e podendo colocar em risco a vida do animal

Neste estudo teve-se como objetivo determinar a prevalência de base hospitalar de *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) de 58 gatos que foram atendidos no Hospital Veterinário SOSVet usando a técnica de PCR assim como avaliar a relação entre a infeção e os seus fatores de risco. A prevalência de Mhf foi de 20.7% (12/58). A infeção foi estatisticamente significativa em relação ao estado reprodutivo mas não se verificou relação com a idade, género, habitat, periodicidade de desparasitação externa, leucose felina/ imunodeficiência felina e estado de saúde atual. A prevalência de Mhf foi mais alta do que a encontrada noutros países da Europa, foi inclusive mais alta que a encontrada noutro estudo feito em Portugal. Este estudo permitiu que se adquira-se mais um dado acerca prevalência desta doença no nosso país.

Abstract:

Mycoplasma haemofelis is a worldwide pathogen that affects domestic and wild cats, causing a life-threatening disease.

The aim of this study was to determine the hospital prevalence of *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) in 58 cats that were assisted in SOSVet veterinary hospital using PCR, as well as to evaluate the relationship between the infection and its risk factors. The Mhf frequency was 20.7% (12/58). The infection was found statistically significant with the fertility status, but no significant association was found with age, gender, habitat, ectoparasites deworming, FIV/FelV and health condition. The Mhf prevalence was higher than those reported in other European countries, it was even higher than another study made in Portugal. This study gave us another data about the prevalence of this disease in this country.

Key-words:

Abreviaturas, Siglas e Símbolos:

Ac – Anticorpos

Adm. – Administração

ADN – ácido desoxirribonucleico

ALT – Alanina Transaminase

ARNr – ácido ribonucleico ribossomal

AST – Aspartato Transaminase

bp – pares de bases, sigla anglosaxónica de base pair

Br-Et – Brometo de Etídio

CC – Condição Corporal

CMhm – Candidatus *Mycoplasma haemominutum*

CMt – Candidatus *Mycoplasma turicensis*

C. felis – *Ctenocephalides felis*

CDSs – Codões

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

dl – decilitro

dnTPs - Desoxirribonucleótidos trifosfatos

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – acrónimo do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

FeLV – Vírus da Leucemia Felina, sigla anglo-saxónica de *Feline Leukemia Virus*

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina, sigla anglo-saxónica de *Feline Immunodeficiency Virus*

FLUTD – acrónimo de *Feline Lower Urinary Tract Disease*

°C – Graus Celsius

g – grama

GC – Guacina-Citosina

HBN –F – *Haemobartonella felis*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana, sigla anglo-saxónica de Human Immunodeficiency Virus

Ht – Hematócrito

HRP – Horseradish Peroxidase

IBD – acrónimo de *Inflammatory Bowel Disease*

IR – Insuficiência Renal

IV – Intravenoso

kg – kilograma

Mhf – *Mycoplasma haemofelis*

> - Maior

< - Menor

µl – microlitro

mg – miligrama

ml – mililitro

PCR – reação em cadeia da polimerase, sigla anglo-saxónica de *Polymerase Chain Reaction*

PCR-TR – Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

PO – *Per os*

% - Percentagem

q.b. – quanto basta

SOD – Superóxido Dismutase

UV – Ultravioleta

VCM – Volume Corpuscular Médio

V – Volts

8 – MOP - 8-methoxypsoralen

Índice Geral

1.	Introdução	12
1.1	Etiologia:	12
1.2.	Epidemiologia:	13
1.2.1.	Transmissão por vectores:	14
1.2.2.	Transmissão vertical e iatrogénica:	15
1.3.	Fisiopatologia:	15
1.3.1.	Fase Aguda:	16
1.3.2.	Fase crónica:	16
1.3.3.	Portador:	16
1.3.4.	Fatores de Risco:	17
1.4.	Sintomatologia:	17
1.4.1.	Achados laboratoriais:	18
1.4.2.	Achados de necrópsia:	19
1.4.3.	Presença de retrovírus e a sua influência:	19
1.5.	Constituição celular e suas implicações na doença:	19
1.6.	Métodos de Diagnóstico:	20
1.7.	Tratamento:	21
1.8.	Implicações na saúde pública:	22
1.9.	Objetivos:	22
2.	Materiais e métodos:	23
2.1.	Amostra:	23
2.2.	Anamnese:	23
2.3.	Inquérito:	24
2.4.	Pesquisa de Mhf por PCR:	24
2.5.	FIV e FeLV:	26
2.6.	Análise Estatística:	27
3.	Resultados:	28
3.1.	Caracterização da população geral	28
3.1.1.	Género:	28
3.1.2.	Idade:	28
3.1.3.	Habitat:	28

3.1.4. Habitat Materno:.....	28
3.1.5. Desparasitação:	29
3.1.6. Condição corporal:	29
3.1.7. FIV e FeLV:.....	30
3.1.8. Doenças anteriores:	30
3.1.9. Estado de saúde atual:.....	30
3.2. Caracterização da população positiva.....	31
3.2.1. Género:.....	31
3.2.3. Habitat:.....	32
3.2.4. Habitat Materno:.....	32
3.2.5. Desparasitação:	32
3.2.6. CC:.....	33
3.2.7. FIV e FeLV:.....	33
3.2.8. Doenças anteriores:	33
3.2.9. Estado de saúde atual:.....	33
4. Discussão:	35
5. Conclusão:	38
6. Bibliografia:	39
7. Apêndices:	42

Índice de Figuras:

Figura 1 - Exemplo de imagem de Mhf em eritrócitos	13
Figura 2 - Escala de avaliação da CC.....	24

Índice de Tabelas:

Tabela 1 – Prevalências Mundiais de Mhf:.....	14
Tabela 2 - Diagnósticos diferenciais em gatos com anemia infetados com Mhf.....	17
Tabela 3 - Drogas usadas no tratamento de <i>Mycoplasma haemofelis</i>	22
Tabela 4 - Descrição das condições de PCR para Mhf	25
Tabela 5 – Descrição das condições de PCR para o gene MYBPC3.....	25
Tabela 6 - Grupos etários usados no estudo	28
Tabela 7 - Histórico de doenças/sintomas anteriores do grupo de estudo	30
Tabela 8 – Doenças/sintomas identificados nos gatos do estudo na altura da recolha	31
Tabela 9 - Estado reprodutivo do grupo positivo	31
Tabela 10 - Idades dos pacientes positivos do grupo de estudo.	32
Tabela 11 - Periodicidade de administração e marcas usadas pelo grupo positivo a Mhf	33

Índice de Gráficos:

Gráfico 1 - Periodicidade de administração de desparasitantes externos	29
--	----

1. Introdução

O *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), inicialmente classificado como uma rickettsia, foi descrito pela primeira vez por Clark na África do Sul em 1942 num gato anémico; nessa altura atribuiu-se ao género *Eperythrozoon spp* (Sykes, 2010; Barker et al., 2011). Aproximadamente 10 anos depois foram identificados organismos semelhantes em gatos nos Estados Unidos da América no estado do Colorado (Sykes, 2010). Em 1955, baseando-se na sua morfologia o nome *Haemobartonella felis* foi proposto por Flint (Sykes, 2010). Em meados dos anos 90 com o desenvolvimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), foi possível ampliar e comparar o ácido desoxirribonucleico (ADN) dos géneros *Haemobartonella spp* e *Eperythrozoon spp*. Em 2001 a informação sequenciada do gene de ADN amplificado 16S de ácido ribonucleico ribossómico (ARNr) permitiu descobrir semelhanças elevadas entre estes géneros e os organismos micoplasmares passando então a *Haemobartonella felis* a designar-se por *Mycoplasma haemofelis* e passou a pertencer à classe *Mollicutes* (Sykes, 2010; Barker et al., 2011).

Os Micoplasmas são bactérias pequenas com tamanhos entre 0.3 a 0.8 µm. São bactérias hemotrópicas, o que significa que parasitam a superfície glóbulos vermelhos, existem várias espécies que parasitam gatos entre elas o Mhf. As outras espécies de micoplasmas hemotrópicos são: o *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm, anteriormente designado *H. felis* de cadeia pequena, variante California) e o *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMt) descrito pela primeira vez em 2004 na Suíça (Peters et al., 2008; Gentilini et al., 2009; Tanahara et al., 2010).

Recentemente toda a sequência genética de *M. haemofelis* (variante Langford 1) foi publicada demonstrando que esta cadeia de curta passagem induz anemia hemolítica em gatos imunocompetentes experimentalmente infetados (Barker et al., 2011^a)

1.1 Etiologia:

Os micoplasmas são bactérias Gram negativas extracelulares com capacidades pleomórficas sem parede celular que têm a capacidade de se agregar às paredes dos eritrócitos (fig. 1) (Bauer et al., 2008; Godelind et al., 2010; Santos et al., 2011) à observação do esfregaço sanguíneo (40x), Podem ter uma forma cocóide, anelar ou de bastonete podendo ainda encontrar-se a formar ocasionalmente correntes de 3 a 6 organismos (Haefner et al., 2003; Bernstein, 2011). O Mhf (anteriormente designado *H. felis*

de cadeia grande, variante Ohio) é o mais virulento e clinicamente relevante do grupo de micoplasmas hemotrópicos descritos até ao momento.

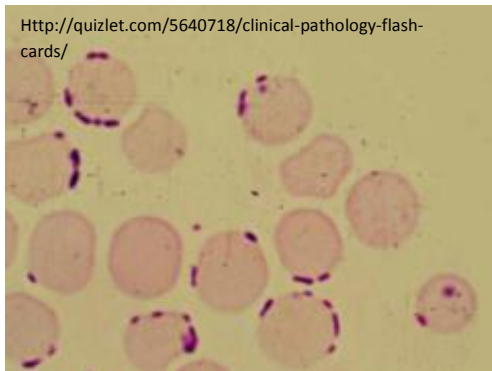


Figura 1 – exemplo de imagem de Mhf em eritrócitos

1.2. Epidemiologia:

O *Mycoplasma haemofelis* é um agente patogénico com distribuição mundial que afeta felídeos domésticos e selvagens alterando significativamente o seu estado de saúde e podendo colocar em risco a vida do animal (Barker et al., 2011). Os estudos envolvendo a sua prevalência e distribuição são inúmeros e a nível mundial a maior prevalência foi detetada no Japão em 2003 com 67% de animais positivos a Mhf (Watanabe M, 2003) embora mais recentemente, em 2010 outro estudo realizado no Japão tenha obtido uma prevalência de 2.4% (Tanahara et al., 2010). O país com a prevalência mais baixa atualmente são os Estados Unidos da América com 0.4% (Sykes et al., 2007). Outras distribuições mundiais podem ser encontradas na tabela 1. Os resultados dos estudos sobre a transmissão de micoplasmas hemotrópicos são ainda hoje controversos. Ainda assim grande parte dos investigadores aceita que a transmissão pode ocorrer por via horizontal e vertical. Na Suíça, a realização de testes de PCR em gatos experimentalmente infetados confirmaram a presença de *M. turicensis* nas glândulas salivares, assim como nas fezes até 9 semanas depois da infeção inicial (Willi et al., 2007). Este estudo indica que a transmissão direta entre gatos pode ocorrer e faz ainda a associação entre as infeções por micoplasma e gatos machos inteiros com acesso ao exterior devido aos seus hábitos territoriais (disputas territoriais) e sociais (hábitos de higiene). Uma vez que o número de micoplasmas na saliva e fezes é baixo, a transmissão por contacto oro-nasal ou pela partilha de comida parecem ser insuficientes para haver transmissão. Os comportamentos agressivos como dentadas e arranhões são necessários para a contaminação direta devido à entrada do agente na corrente sanguínea (Willi et al., 2007). A anemia infecciosa felina já foi diagnosticada em gatos algumas semanas após comportamentos agressivos e brigas territoriais. A associação entre abscessos pós dentada e a presença da doença tem sido identificada desde há duas

décadas, podendo no entanto estas situações representarem apenas a reativação da doença num gato já portador devido ao stress e não uma infeção primária (Sykes, 2010).

Tabela 1 – Prevalências Mundiais de Mhf:

Localização:	Ano:	Prevalência %	n
África do Sul (Lobetti e Tasker 2004)	2004	12.8 ^a	1
Alemanha (Bauer et al., 2008)	2008	4.5	
Austrália (Willi et al., 2006)	2006	4,8	7
Canadá (Kewish, et al. 2004)	2004	26.6	12
China (Q.J.Zhuang 2010)	2010	1.15	1
Espanha (Barcelona) (Roura et al., 2010)	2010	3.7	7
Estados Unidos da América (Califórnia)			
(Hackett et al., 2006)	2003	3.4	
(Sykes et al., 2007)	2006	0.4	1
Itália (Gentilini et al., 2009)	2008	5.9	18
Japão			
(Watanabe M 2003)	2003	67 ^b	12
(Tanahara et al., 2010)	2008	2.4 ^c	42
Portugal (Martínez-Díaz et al., 2013)	2013	12.81	41
Reino Unido			
(Tasker et al., 2003)	2003	1.4	6
(Peters et al., 2008)	2006	2.8	45
Suiça (Willi et al., 2006)	2005	1.5	11

Legenda: ^a resultado conjunto de infeções positivas a Mhf isolado e de Mhf+ CMhm; ^b foram usados apenas animais anémicos com suspeita clínica de micoplasmose; ^c resultado aborda somente infeções isoladas de Mhf

1.2.1. Transmissão por vectores:

Relativamente à transmissão por vectores hematófagos como *Ctenocephalides felis*, um estudo de Barbara Willi et al., 2007 não identificou a presença de Mhf em vectores como *Ixodes sp*, *Ctenocephalides felis* e *Rhipicephalus sp* através de estudos de PCR admitindo no entanto que o resultado podia ser associado à baixa prevalência da doença no país do estudo (Suiça) ou ao grupo de estudo em questão (Willi et al., 2007). No entanto o Mhf já foi detectado em alguns exemplares da espécie *Ixodes ricinus* na Europa (Sykes, 2010) embora na Suiça a pesquisa em 2000 exemplares de *Ixodes spp* não tenha revelado a presença de ADN de Mhf usando PCR (Sykes, 2010). Nos Estados Unidos amostras de *Ctenocephalides felis* recolhidas de 92 gatos dos estados do Alabama, Maryland e Texas permitiram identificar a presença de Mhf por testes de PCR (Lappin et al., 2006). Num

estudo de Woods et al., em 2005, conseguiu infetar-se experimentalmente com Mhf um gato não portador através de uma pulga da espécie *C. felis* infetada, indicando que a infestação por este parasita hematófago poderia ser um risco na transmissão da bactéria (Woods et al., 2005). Em 2006 o mesmo autor demonstrou experimentalmente que a transmissão da doença através a ingestão de *C. felis* infetados não provocava doença em gatos saudáveis (Woods et al., 2006).

Os mosquitos também são suspeitos de serem vectores da doença embora um estudo feito em Colorado nos Estados Unidos da América (EUA) tenha detetado apenas a presença de uma espécie micoplasmar infectante de bovinos, não sendo por isso possível com os estudos actuais identificar positivamente o mosquito como uma ameaça na transmissão da doença (Sykes, 2010).

1.2.2. Transmissão vertical e iatrogénica:

A transmissão vertical pode ocorrer por via intrauterina assim como durante o parto devido à ingestão de sangue contaminado ou a lactação segundo alguns autores (Harvey, 2006; Bernstein, 2011). A via iatrogénica, através de transfusões sanguíneas ou uso de agulhas com sangue contaminado é outra via de transmissão conhecida (Willi et al., 2007; Bernstein, 2011).

A transmissão experimental de Mhf já foi feita com sangue infectado de outros gatos por injeção via intraperitoneal e intravenosa assim como a administração oral de cerca de 5 ml sangue infectado (Harvey, 2006; Sykes, 2010).

1.3. Fisiopatologia:

De forma a melhor perceber a patogenia, a fisiopatologia foi dividida em 4 fases: pré-bacteriemia, aguda, crónica e de portador assintomático (Harvey, 2006).

A espécie Mhf é causadora de anemias hemolíticas graves. O intervalo de tempo entre a infeção e os primeiros sinais de doença são de 2 a 34 dias, mas na média a bacteriemia é mais elevada entre o 14^o-15^o dia pós-infeção ($10^{8.6}$ – $10^{9.6}$ bactérias/ml de sangue). No entanto, a multiplicação bacteriana pode ter variações acentuadas ao longo do tempo, sendo necessários mais estudos para se compreender os mecanismos que estão envolvidos na sua multiplicação. Algumas das hipóteses para relacionar os sinais clínicos com a quantidade de bactérias na superfície eritrocitária são: o sequestro das bactérias por parte dos macrófagos do baço, fígado e pulmões seguido da sua libertação mais uma vez na corrente sanguínea. Esta hipótese foi já confirmada com a presença de Mhf em vários tecidos de animais infetados embora não na proporção esperada, que seria de maior

número de bactérias nos tecidos de animais com um elevado número de bactérias em circulação sanguínea. Outra hipótese para a flutuação do número de bactérias em circulação é a remoção rápida dos organismos seguida de rápida multiplicação das bactérias em circulação sanguínea, ou o efeito de variação antigénica cíclica usada por algumas espécies hemotrópicas e micoplasmas para evadir a resposta imunitária do hospedeiro (Tasker et al., 2009; Sykes, 2010).

1.3.1. Fase Aguda

A fase aguda pode durar cerca de 3 a 4 semanas sem tratamento e é associada com anemia e grave bacteriemia. As bacteriemias repetidas podem ser a causa da destruição progressiva de eritrócitos e diminuição do seu tempo de vida. Embora alguma lesão possa ser causada diretamente pelas bactérias a lesão imuno-mediada parece ser a mais importante. O teste de Coomb's direto pode ter resultado positivo indicando a presença de anticorpos (Ac) na superfície dos glóbulos vermelhos no intervalo de uma semana depois da primeira bacteriemia e mantém-se positivo durante toda a fase aguda da doença (Harvey, 2006; Sykes, 2010). Durante a infeção aguda o número de organismos aumenta gradualmente podendo desaparecer rapidamente de circulação e passar de 90% para 1% em cerca de 3 horas (Sykes, 2010; Bernstein, 2011).

1.3.2. Fase crónica:

Sendo o Mhf uma bactéria extracelular deveria ser eliminada por mecanismos imunitários como a fagocitose, mas organismos intactos foram já descritos em vacúolos fagocíticos de macrófagos no baço e pulmões (Harvey, 2006). Este pode ser o motivo da existência de infeções crónicas. Nos animais infetados cronicamente o número de bactérias é baixo e pode aparecer na corrente sanguínea esporadicamente em grupos pequenos visíveis em citologias de esfregaços sanguíneos ou não haver presença de bactérias durante meses a anos. O hematócrito (Ht) pode ser normal ou apresentar uma anemia regenerativa leve a moderada. A infeção não garante imunização e o animal pode voltar a ter sintomatologia. Uma parte significativa da população de gatos pode ser portadora assintomática de uma infeção latente que acontece pelo fato do organismo destes gatos criar um equilíbrio entre a multiplicação bacteriana e a remoção de circulação não permitindo o aparecimento da doença (Harvey, 2006; Sykes, 2010).

1.3.3. Portador:

O *Mycoplasma haemofelis* é um agente oportunista que pode existir em animais aparentemente saudáveis mas pode causar a doença em casos de stresse agudo, baixa de imunidade, período pós-operatório, gestação ou doença oncológica (Harvey, 2006; Sykes, 2010; Bernstein, 2011). Em alguns estudos foi identificada a prevalência de hemoplasmas

em animais saudáveis como por exemplo no estudo de Lappin(2006) nos EUA onde houve uma prevalência de 7.6% de Mhf em gatos saudáveis (Lappin et al., 2006).

1.3.4. Fatores de Risco:

Os fatores de risco reconhecidos são: o género dos gatos, a idade, o habitat, a infeção concomitante com FIV/ FeLV (embora ainda controversa pois em alguns estudos causou uma alteração significativa na sintomatologia nos casos de coinfeção mas noutros estudos não influenciou em nada a sintomatologia) e a coinfeção com várias espécies micoplasmares (Harvey, 2006; Willi et al., 2006; Sykes, 2010). A infeção foi associada em alguns estudos a machos geralmente com acesso ao exterior. Num estudo realizado nos EUA cerca de 90% dos gatos infetados eram machos. Em relação à idade embora os estudos variem bastante no que diz respeito à associação idade e Mhf. No estudo de Grindem,1990 o maior número de gatos infetados estava em idades iguais ou inferiores a 3 anos enquanto que no estudo de Gentilini, et al. 2009 a doença estava mais presente em gatos com idades compreendidas nos 10 anos. No estudo de Martínez Díaz et al., 2013 foi considerado relevante a associação entre a infeção com Mhf e a presença de FIV e FeLV.

1.4. Sintomatologia:

A sintomatologia dos gatos infetados com Mhf é variada mas todos os gatos com anemia devem ter como um dos diagnósticos diferenciais a infeção por Mhf assim como os apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Diagnósticos diferenciais em gatos com anemia infetados com Mhf

Anemia hemolítica primária imunomediada	Vírus da leucemia felina
Vírus da imunodeficiência felina	Vírus da peritonite infecciosa felina
Infeção com <i>Cytauxzoon felix</i>	Anemia hemolítica com corpos de Heinz (cebola, alho, zinco, propofol)
Deficiência em piruvato kinase	Tumores que causem hemorragias
Hemorragia gastrointestinal oculta	Linfoma
Insuficiência renal crónica	

Tabela adaptada de Sykes, 2010.

Em casos agudos a febre aparece intermitente em picos entre os 39°C e os 41°C. A sintomatologia comum inclui: icterícia, taquipneia, taquicardia, anorexia, letargia, depressão, mucosas pálidas, desidratação e esplenomegália. Ocasionalmente em anemias graves ou agudas síncope e sintomatologia neurológica pode estar presente. Em doentes crónicos ou moribundos pode haver normo ou hipotermia, fraqueza, depressão, perda de

peso ou emaciação mas é menos provável haver esplenomegália e icterícia (Haefner et al., 2003; Harvey, 2006; Sykes, 2010; Bernstein, 2011).

1.4.1. Achados laboratoriais:

Dependendo da gravidade da anemia, esta pode ser regenerativa com reticulócitos e policromasia ou não regenerativa com um Ht abaixo de 20% e em alguns casos abaixo de 10% (valor de referência - 30-45%) (Sykes, 2010). Os eritrócitos são geralmente macrocíticos, com um volume corpuscular médio (VCM) superior a 50 fl (valor de referência - 42-53 fl) com a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) inferior a 31 g/dl (valor de referência - 30-34 g/dl) (Harvey, 2006). Embora a anisocitose e um aumento dos corpos de Howell-Jolly possam ser visto com frequência na fase aguda da doença, não são bons indicadores de uma resposta regenerativa na anemia felina uma vez que os corpos de Howell-jolly são observados com frequência em gatos normais e os eritroblastos, responsáveis pela anisocitose, podem aparecer numa variedade de doenças felinas (Harvey, 2006)

A anemia não regenerativa pode estar presente em casos onde ainda não houve tempo para uma resposta regenerativa ou em caso de infeção concomitante com FeLV (Sykes, 2010).

As contagens de glóbulos brancos podem estar normais, aumentadas ou diminuídas em gatos com Mhf; pode ainda ser observado um aumento de monócitos reativos (Sykes, 2010).

Nas bioquímicas séricas podemos verificar um aumento ligeiro da alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) (Harvey, 2006). Estas alterações podem dever-se a uma hipóxia secundária causada pela anemia ou a uma lipidose hepática devido à anorexia. O plasma icterico não é observado consistentemente embora possa ser identificado 1 a 2 dias depois de uma rápida descida do hematócrito (Harvey, 2006). Neste sentido, a concentração de bilirrubina pode não estar aumentada uma vez que pode haver sequestro de glóbulos vermelhos no baço sem que haja a sua destruição. As proteínas totais estão geralmente dentro do intervalo de referência (6-8 g/dl) a não ser em alguns gatos onde se encontrem aumentadas devido à desidratação (Harvey, 2006). Pode também verificar-se um aumento da ureia sérica associada à desidratação não havendo no entanto alteração dos valores de creatinina. Gatos em estado terminal podem ter hipoglicemia (Harvey, 2006).

1.4.2. Achados de necrópsia:

Os achados de necrópsia incluem emaciação em cerca de 75% dos gatos, esplenomegália leve a marcada em 50% dos casos e icterícia leve a moderada em alguns gatos (Harvey, 2006).

Os achados de histopatologia incluem hiperplasia medular eritróide e em alguns casos também mielóide. Outros exemplos de lesões identificadas em gatos com Mhf aquando da necrópsia são a c passiva, hematopoiese extramedular, hiperplasia folicular, eritrofagocitose e elevada quantidade de hemossiderina no baço. Em alguns casos identificam-se também lesões hepáticas como degeneração gorda e necrose centrolobular do fígado (Harvey, 2006).

1.4.3. Presença de retrovírus e a sua influência:

Os retrovírus como FeLV ou FIV e ainda outras doenças debilitantes podem ser diagnosticados juntamente com o *Mycoplasma haemofelis* em pacientes exacerbando a doença. De acordo com estudos entre 20 a 40% de gatos doentes ou com anemia estão infetados com Mhf e cerca 40% a 50% dos gatos infetados com sintomatologia de Mhf são FeLV positivos (Harvey, 2006; Santos et al., 2011). Como a infeção com FeLV pode suprimir a resposta imunitária normal esta infeção pode aumentar a suscetibilidade de gatos à infeção com micoplasmas hemotrópicos uma vez que pode não ser necessária uma carga bacteriana elevada para causar a doença ou ainda converter uma infeção latente de Mhf em uma infeção activa (Harvey, 2006; Santos et al., 2011).

Independentemente de como ocorre a interação entre estas duas doenças geralmente um gato infetado com FeLV e Mhf tem sinais clínicos mais exacerbados e um prognóstico mais reservado do que quando tem apenas uma das doenças. No entanto, uma infeção concorrente de Mhf e FIV não parece causar uma anemia mais severa do que quando o animal tem apenas Mhf (Harvey, 2006).

1.5. Constituição celular e suas implicações na doença:

Embora os Micoplasmas tenham um tamanho genético pequeno perdendo a capacidade de sintetizar muitas enzimas e produtos metabólicos, mantiveram genes importantes para a sua sobrevivência, virulência e patogénese (Santos et al., 2011).

O *Mycoplasma haemofelis* tem um genoma que consiste num único cromossoma circular de tamanho 1.155.937 bp (base pairs) com uma percentagem de Guanina e Citosina (GC) de 38.8%. Este valor encontra-se dentro do esperado nos géneros micoplasmas cujo GC vai de 23.8% a 40% (Santos et al., 2011).

As bactérias desenvolveram vários fatores de virulência que lhes permitem causar uma infeção nos quais estão incluídos a produção de citolisinas, toxinas e invasinas. O genoma do Mhf contém poucos genes para estas funções, no entanto foram identificados 2 codões (CDSs) de genes de virulência primária (Santos et al., 2011). O primeiro destes é a endopeptidase-sialoglicoproteína. Esta enzima pode estar envolvida diretamente com a lise de eritrócitos devido à divisão de glicoproteínas como a glicoforina A que é um componente abundante nas membranas celulares dos eritrócitos. Foi ainda encontrado o CDS do superóxido dismutase (SOD) o que pressupõe que o SOD tem um papel significativo na proteção do Mhf de lesão oxidativa causada pelo ambiente eritrocitário (Santos et al., 2011).

O Mhf tem mais genes organizados em família parálogas do que todos os outros micoplasmas sequenciados até à data; existe uma forte indicação de que estes genes estão envolvidos no desenvolvimento de diversidade antigénica e capacidade do organismo evitar a resposta imunitária do hospedeiro indicando que a evasão à resposta imunitária é uma das maiores prioridades desta bactéria (Santos et al., 2011).

Apenas um gene relacionado com resistência antimicrobiana foi encontrado, uma família de proteínas ribossomais de ARN adenina dimetilase. O produto desse gene é a metilase que origina a resistência à kasugamicina, um aminoglicosídeo. Se esta enzima tem algum papel na resistência antimicrobiana do Mhf é algo ainda não provado e que precisa de ser experimentalmente confirmado (Santos et al., 2011).

A apresentação da doença assim como a evidência do genoma indicam que a fisiopatologia da bactéria está também ligada ao dinamismo antigénico da sua superfície celular resultando nas bacteriemias cíclicas e na persistência do organismo mesmo após instituição de um tratamento correto. A recombinação das famílias parálogas pode formar uma nova variante antigénica sendo esse o motivo para haver os episódios cíclicos e a persistência da doença (Santos et al., 2011).

1.6. Métodos de Diagnóstico:

A sua identificação pode ser feita através de esfregaços sanguíneos corados com Whright-Giemsa onde aparecem com uma cor violeta-avermelhada escura e na coloração May-Grunwald-Giemsa aparece corada de roxo a azulado. Este método é considerado pouco sensível uma vez que apenas se consegue identificar a bactéria nos esfregaços em menos de 50% dos gatos infectados na fase aguda da doença. Outros métodos que também conseguem identificar com sucesso o Mhf são a imunofluorescência directa, western immunoblot e o mais específico e sensível é o PCR, sendo o método de eleição para o

diagnóstico destes organismos pois permite não só a diferenciação entre espécies através da utilização de kits comerciais específicos para identificação das diferentes espécies micoplasmares, mas também, através do RT-PCR permite fazer a quantificação bacteriana (Haefner et al., 2003; Tasker et al., 2003; Willi et al., 2007; Bernstein, 2011). Enquanto que a utilização do PCR se mantém como uma ferramenta essencial no diagnóstico dos gatos sintomáticos ou com doença aguda, em casos crónicos pode não ter resultados consistentes, originando falsos-negativos, estes resultados podem ocorrer em animais portadores assintomáticos e em gatos a efetuar tratamento com doxiciclina (Messick et al., 2011).

Ainda nenhum teste “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) foi desenvolvido devido à impossibilidade de criar este organismo em culturas não havendo por isso fontes de antigénio suficientes e estabilizadas para a elaboração de um teste imunológico desta técnica (Messick et al., 2011).

1.7. Tratamento:

O tratamento deve ser administrado apenas a gatos com sintomatologia clínica e alterações laboratoriais compatíveis com infeção por micoplasmas hemotrópicos e sempre que possível deve-se efetuar o PCR específico para Mhf (Sykes, 2010). Uma vez que é a espécie mais virulenta e os testes que envolvam a pesquisa de todas as espécies micoplasmares podem dar resultados positivos não sendo na verdade o motivo da anemia já que as outras espécies micoplasmares raramente causam anemias clinicamente significativas (Sykes, 2010). O tratamento com antibioterapia pode não eliminar completamente o agente. Por isso, os gatos com diagnóstico de Mhf devem ser automaticamente eliminados de programas de doação de sangue. Existem várias opções no tratamento do Mhf, a doxiciclina é o antibiótico de eleição por não causar nefrotoxicidade, tem a excreção pelas fezes sem grande envolvimento biliar tendo por isso uma hepatotoxicidade baixa no gato e tem menor fixação de cálcio que outras tetraciclinas (Laboratorios Mayors Especialidades Veterinárias; Tasker, 2006). É também apenas necessária uma toma diária. (Tasker, 2006) A tetraciclina/oxitetraciclina ou doxiciclina deve ser administrada durante 3 semanas (tabela 3) mas ter em atenção que em gatos o uso destes antibióticos pode causar febre e doenças gastrointestinais (como rutura esofágica e esofagites) ou ambas sendo aconselhável depois da administração do antibiótico administrar também água ou, se possível, usar suspensão em vez de comprimidos. A transfusão sanguínea em casos de anemia grave está também aconselhada. O uso de enrofloxacin pode ser uma alternativa eficaz no tratamento de hemoplasmas em gatos que não tolerem

tetraciclinas no entanto pode causar lesões graves a nível da retina quando administrada em doses superiores a 5 mg/kg/dia. Quando disponível, a pradofloxacin também é uma alternativa aconselhável. A administração de glucocorticoides como a prednisolona é controversa. É usado na prática em animais severamente anémicos para diminuir a eritrofagocitose de resposta imuno-mediada, mas deve ser apenas utilizado em casos onde o tratamento antibiótico isolado não está a obter resposta (Harvey, 2006; Sykes, 2010).

Tabela 3 - Drogas usadas no tratamento de *Mycoplasma haemofelis*

Princípio Ativo:	Dose (mg/kg) ^a	Via de adm.	Intervalo (horas)	Duração (dias)
Tetraciclina	20	PO, IV	8	21
Oxitetraciclina	20	PO, IV	8	21
Doxiciclina	10	PO	24	21
Doxiciclina	5	PO	12	21
Enrofloxacin	5-10 ^b	PO	24	14
Prednisolona	1-2	PO	12	q.b.

Tabela adaptada de Harvey 2006

Legenda: mg – miligrama; kg – kilos; adm – administração; PO - Per os; IV – Intravenoso; qb - quanto basta; ^a dose de administração para intervalo de 3 semanas de tratamento; ^b doses superiores a 5mg/kg/dia em gatos podem causar toxicidade na retina e cegueira consequente, por isso deve ser usada com cuidado e se possível substituir com outro princípio ativo.

1.8. Implicações na saúde pública:

Já foram identificados organismos que se assemelham a hemoplasmas foram ocasionalmente identificados em exames citológicos humanos. Inclusive em pacientes anémicos infetados com o com vírus da imunodeficiência humana (HIV) como ocorreu no Brasil em que um paciente teve o diagnóstico de Mhf confirmado por PCR sugerindo o potencial zoonótico da espécie (Sykes, 2010).

1.9. Objetivos:

Este estudo tem como objetivo geral determinar a prevalência de base hospitalar de *Mycoplasma haemofelis* num hospital veterinário localizado na Cova da Piedade, Almada.

Os objetivos específicos são avaliar a influência de vários fatores já estudados nesta população de animais positivos como é o caso da idade, género, o tipo de habitat dos gatos do estudo, assim como o habitat das suas progenitoras. Verificar se o uso de

desparasitante externo assim como se a periodicidade de administração têm alguma influência na prevenção da doença.

Associar o estado de saúde atual assim como a presença de FIV e/ou FeLV aos resultados positivos por PCR de Mhf neste estudo.

2. Materiais e métodos:

2.1. Amostra:

Este estudo teve lugar no Hospital Veterinário SOSVet na Cova da Piedade, Almada, entre o dia 05/Março/2012 e o dia 08/Maio/2012.

Foram incluídos neste estudo todos os gatos que se apresentaram para consulta de rotina, cirurgias e internamentos nesse período de tempo e aos quais foi colhido sangue perfazendo um total de 58 gatos.

O sangue dos gatos usado neste estudo foi colhido através de venopunção da veia jugular e todas as amostras foram retiradas para análises internas do hospital das quais se aproveitou uma parte do sangue para o estudo.

Nenhuma das amostras foi retirada propositadamente para a elaboração deste estudo.

De cada gato retirou-se cerca de 1 ml de sangue que foi imediatamente colocado em um tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tendo sido identificado com a data, nome do animal, idade, sexo e nome do proprietário sendo de seguida armazenado a -20 °C até ser analisado no laboratório DNATech.

2.2. Anamnese:

A todos os gatos que entraram no estudo foi recolhida uma anamnese e foi realizado um exame físico.

A condição corporal (CC) foi avaliada numa escala de 1 a 5 (figura 2) segundo a tabela de Khuly, 2009.



Figura 2. - Escala de avaliação da CC.

2.3. Inquérito:

Foi adaptado um inquérito elaborado pela Dra. Odete Almeida e Dr. Pedro Almeida da FMV-ULHT. Todas as respostas foram dadas pelos proprietários no dia em que o gato se apresentou no hospital ou por telefone nos casos em que foi impossível completar o mesmo na hora (Apêndice 1).

2.4. Pesquisa de Mhf por PCR:

O ADN foi extraído das amostras de sangue total segundo as instruções do fabricante com um extrator automático da RBC Bioscience Corp, Modelo - MgCore HF16 (Taiwan), usando o kit de extração para sangue total – MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit .

Para efetuar a amplificação de ADN usou-se um kit comercial específico, “*Mycoplasma haemofelis* detection kit - one-step PCR (Intron Biotechnology Inc)”. Este kit permitiu amplificar uma sequência de ADN que codifica uma região específica do ARN ribossomal 16s de Mhf (Tabela 4).

Para cada amostra preparou-se um volume total de 20µl de solução que continha o premix de PCR do kit, composto pela polimerase de ADN i-StarTaq™, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), tampão de reação de PCR, estabilizador químico, tampão de gel, 8-methoxypsoralen (8-MOP) (dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO)) usado para prevenir a contaminação cruzada, assegurando que apenas se amplifica ADN de Mhf

proveniente da extração do ADN do sangue dos gatos em estudo, primers para *Haemobartonella felis* 2µl do ADN molde extraído e 18µl de água desionizada estéril.

Tabela 4 - Descrição das condições de PCR para Mhf

Ciclo PCR		Temperatura	Tempo
1 Ciclo	Desnaturação inicial	94 °C	5 Minutos
40 Ciclos	Desnaturação	94 °C	30 Segundos
	<i>Anealling</i>	52 °C	30 Segundos
	Extensão	72 °C	40 Segundos
1 Ciclo	Extensão	72 °C	5 Minutos

Legenda: °C – Graus Celsius

A presença de inibidores de ADN foi confirmada através de um PCR adicional com *primers* que amplificam uma pequena região do gene *MYBPC3* que codifica para a proteína C cardíaca de ligação à miosina. A amplificação positiva do fragmento do gene *MYBPC3*, em todas as amostras de ADN extraído (Tabela 5), serviu de controlo interno e garantiu que mesmo nas amostras cujo resultado foi negativo para a presença de *Mycoplasma haemofelis*, o ADN extraído estava livre de qualquer inibidor. Para se efetuar o PCR deste gene adicionou-se 2µl de ADN de cada amostra a uma preparação de 15.8 µl de água estéril, 2.5 µl de solução tampão, 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl de dnTPs (10mM), 1 µl de primer Fw (10 µM), 1 µl de primer Ver (10 µM), 0.2 µl de *Taq* polymerase, o produto esperado tinha um peso molecular de 183 bp.

Tabela 5 – Descrição das condições de PCR para o gene MYBPC3

Ciclo PCR		Temperatura	Tempo
1 Ciclo	Desnaturação inicial	94 °C	5 Minutos
33 Ciclos	Desnaturação	94 °C	1 Minuto
	<i>Anealling</i>	58 °C	1 Minuto
	Extensão	72 °C	10 Segundos
1 Ciclo	Extensão	72 °C	5 Minutos

Legenda: °C – Graus Celsius

Foi ainda usado um controlo positivo do kit onde em lugar da amostra foi usado *Hemobartonella felis* (HBN-F) *positive control* e um controlo negativo proveniente de ADN genómico de um gato anteriormente testado como negativo para o produto de PCR a amplificar.

Realizou-se o processo de PCR das amostras de acordo com as indicações da tabela 3 no termociclador Labnet International, Inc, Modelo – Multigene Gradiente

A avaliação dos produtos de PCR foi feita usando um gel de agarose de 1.5% contendo brometo de etídio (Br-Et). O peso molecular esperado nas amostras positivas a Mhf foi de 322 bp.

2.5. FIV e FeLV:

2.5.1. FIV:

O teste usado para pesquisa de FIV foi o Virachek®/FIV que é um teste ELISA para deteção de Ac de FIV. Cada pocilho está revestido com a proteína A, uma proteína com capacidade de capturar Ac. Preparou-se o primeiro e o segundo pocilho para ser o controlo positivo e negativo respetivamente e os restantes pocilhos para cada uma das amostras. Colocou-se 3 gotas de conjugado peptídico de HRP FIV (Horseradish peroxidase) em cada pocilho, depois no primeiro e no segundo pocilho colocou-se uma gota de controlo positivo de Ac de FIV e controlo negativo de Ac de FIV respetivamente. Nos restantes pocilhos colocou-se 1 microlitro (0.001ml) de sangue de cada amostra. Deixou-se a incubar durante 10 minutos em temperatura ambiente (21-25°C) e descartou-se o líquido dos pocilhos invertendo os mesmos sobre uma toalha de papel.

Diluiu-se o concentrado de lavagem numa diluição de 1:10 com água desionizada e lavou-se até extravasar os pocilhos com a solução e descartou-se novamente o líquido dos pocilhos. Esta operação foi repetida 5 vezes depois das quais lavou-se com água destilada mais uma vez de maneira a remover bolhas e deixou-se a secar.

Colocou-se uma gota de agente cromogénico em cada pocilho seguido de uma gota de buffer, misturou-se gentilmente batendo no suporte e deixou-se incubar durante 5 minutos depois dos quais se bateu gentilmente no suporte e fez-se a interpretação.

Nas reações positivas o pocilho com a amostra ficou azul e nas negativas o pocilho não ficou com a cor azul.

2.5.2. FeLV:

O teste usado para pesquisa de FeLV foi o ViraCHEK®/FeLV. Este teste tem Ac direcionados para os antígenos específicos de FeLV, os p27. Nos primeiros 2 pocilhos adicionou-se uma gota de controlo positivo de FeLV e uma gota de controlo negativo de FeLV respetivamente. Adicionou-se 50 microlitros de cada amostra em cada pocilho seguido de 1 gota de conjugado de Ac monoclonais HRP em cada pocilho e bateu-se ligeiramente

durante 15 segundos no suporte para misturar; aguardou-se de seguida 5 minutos para incubação.

Descartou-se os fluidos que estavam nos pocilhos numa toalha de papel e com uma solução salina normal lavou-se os pocilhos e removeu-se o excesso de água, repetindo este processo 5 vezes. Depois das 5 lavagens utilizou-se água destilada para uma última lavagem e secou-se os pocilhos com o auxílio de uma toalha de papel.

Adicionou-se 2 gotas do agente cromogénico em cada pocilho, agitou-se o suporte sem deixar transbordar durante 15 segundos e esperou-se mais 5 minutos depois dos quais se fez a interpretação.

Os resultados positivos tinham a cor azul que podia variar a nível de intensidade de acordo com a quantidade de antigénio da amostra e os resultados negativos eram transparentes.

2.6. Análise Estatística:

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada no Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 16.0, no qual se criou uma base de dados e foi feito um output descritivo da amostra no qual se fez a descrição da população de acordo com as variáveis usadas no inquérito e os resultados do PCR e um output inferencial no qual foi usado o teste exato de Fisher para avaliar a relação entre género, estado reprodutivo, periodicidade de administração, FIV, FeLV e estado de saúde atual com o resultado positivo ou negativo de Mhf obtido por PCR. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando o p-value (significância) <0.05 . Para os resultados em que houve uma relação estatisticamente significativa no teste exato de Fisher foi efetuada a análise de resíduos de maneira a estudar os valores esperados na amostra.

3. Resultados:

3.1. Caracterização da população geral

Foram usadas 58 amostras na pesquisa por PCR de Mhf, das quais a população positiva foi de n=12, dando uma prevalência de 20,7% com um intervalo de confiança (IC) de 95%.

3.1.1. Género:

O grupo tinha 53.4% (n=31) Machos dos quais 46.5% (n=27) eram castrados e 46.6% (n=27) fêmeas das quais 34.5% (n=20) eram esterilizadas (tabela 4).

3.1.2. Idade:

A idade foi avaliada em grupos etários sendo que variou do grupo dos 0-6 meses até ao grupo dos 12-16 anos (tabela 6). O grupo com maior número de animais foi de 1 a 3 anos de idade seguido pelo grupo dos 8 aos 12 anos. Não foi identificada qualquer relação estatisticamente significativa quer pesquisando cada grupo etário individualmente quer pesquisando com o critério animais com mais de cinco anos e animais com menos de cinco anos.

Tabela 6 - Grupos etários usados no estudo

Grupo etário:	Número de animais:
0 – 6 Meses	1
6 – 12 Meses	9
1 – 3 Anos	13
3 – 5 Anos	7
5 – 8 Anos	8
8 – 12 Anos	12
12 – 16 Anos	7
>16 Anos	1

3.1.3. Habitat:

O grupo continha gatos *indoor* 77.6% (n=45), mistos 20.7% (n=12) e *outdoor* com apenas 1 gato.

3.1.4. Habitat Materno:

O habitat das progenitoras foi também alvo de inquérito sendo 10.3% (n=6) *indoor*, 20.7% (n=12) *outdoor*, 17.2% (n=10) misto e 51.7% (n=30) de habitat materno desconhecido. Não foi possível pesquisar uma relação estatística com o grupo de

progenitoras de habitat desconhecido, mas relativamente às restantes progenitoras não foi identificada qualquer relação estatisticamente significativa.

3.1.5. Desparasitação:

O uso de desparasitantes externos assim como a sua periodicidade de administração foram também alvo de inquérito nos quais 51.7% (n=30) faziam desparasitação externa pelo menos uma vez por ano enquanto 48.3% (n=28) não faziam ou nunca tinham feito nenhum tipo de desparasitação externa (gráfico 1). Em relação aos desparasitantes usados, 56.7% (n=17) usavam Advantage®, 26.7% (n=8) usavam Frontline® Spot On, 6.7% (n=2) Frontline® Spray, 6.7% (n=2) usavam outras marcas e finalmente 1 gato usada Stronghold®.

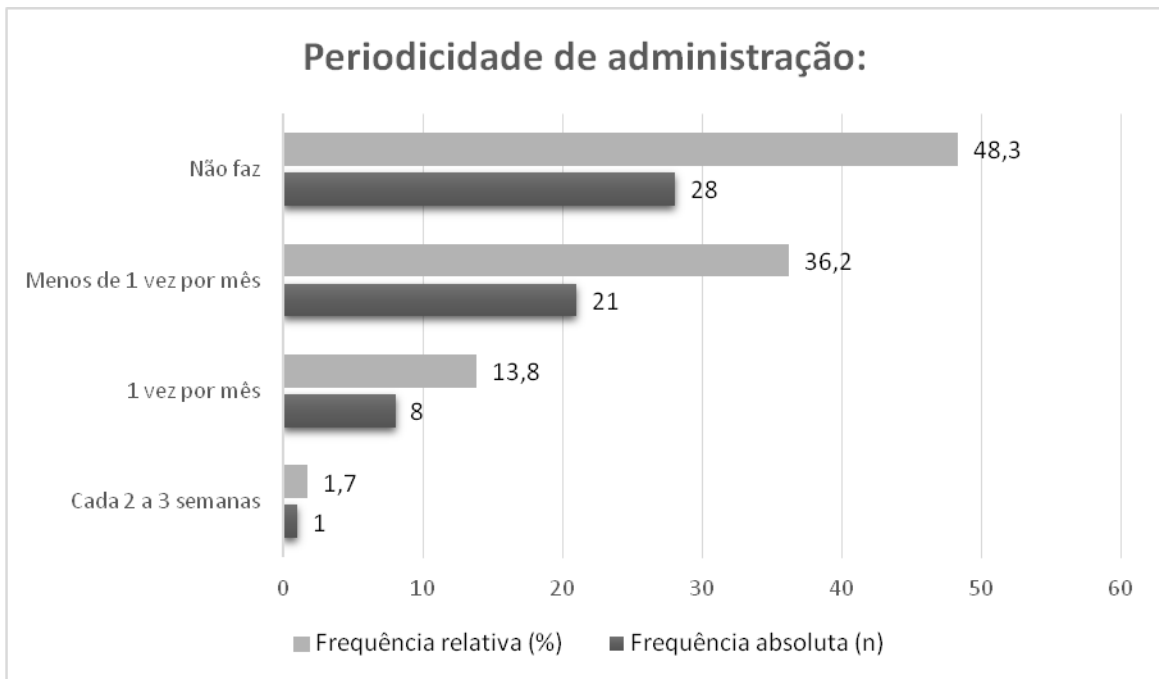


Gráfico 1 periodicidade de administração de desparasitantes externos

A relação entre a periodicidade de administração e o paciente ser positivo ou negativo foi analisada concluindo que não há nenhuma relação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis $p > 0.05$

3.1.6. Condição corporal:

Em relação à CC do grupo em estudo: 3.4% (n=2) tinham CC de 1; 17.2% (n=10) tinham CC de 2, 46.6% (n=27) tinham CC de 3; 27,6% (n=16) tinham CC de 4 e 5,2% (n=3) tinham CC de 5.

3.1.7. FIV e FeLV:

Relativamente à presença de retrovírus, 5.2% (n=3) eram FIV positivos, 87.9% (n=51) eram FIV negativos e 6.9% (n=4) não eram testados. Em relação ao FeLV, 82.8% (n=48) eram FeLV negativos, 10.3% (n=6) FeLV positivos e 6.9% (n=4) não tinham despiste de FeLV.

A nível estatístico verificou-se que não há nenhuma relação estatisticamente significativa entre o FIV e o Mhf nem em relação ao FeLV e ao Mhf ($p>0.05$)

3.1.8. Doenças anteriores:

Relativamente a doenças ou sintomas de doenças anteriores na população em geral 36.2% (n=21) já tinham tido doenças/sintomas anteriores (crónicas ou agudas) independentemente de terem sido doenças/sintomas recentes ou não enquanto 63.8% (n=37) não tinha histórico de doenças/sintomas (tabela 7)

Tabela 7 - Histórico de doenças/sintomas anteriores do grupo de estudo

Doenças/sintomas:	Nº de gatos:
Vómitos e/ou obstipação	2
FLUTD ^a	2
Coriza	4
Avulsão do plexo braquial	1
Dermatite miliar	1
Asma	1
Tinha	1
Calicivírus	2
Cristalúria	1
Pielonefrite	2
IBD ^b e Sopro	1
Lipidose hepática	1
Conjuntivite	1
Carcinoma sublingual	1

Legenda:^a Feline Lower Urinary Tract Disease; ^b Inflammatory Bowel Disease

3.1.9. Estado de saúde atual:

Os 58 gatos foram ainda avaliados em estado de saúde atual dos quais 39.7% (n=23) estavam saudáveis e 60.3% (n=35) estavam doentes na altura da recolha. As doenças/sintomas estão descritas na tabela 8.

Tabela 8 – Doenças/sintomas identificados nos gatos do estudo na altura da recolha

Doenças/sintomas:	Nº de animais	% De animais
Vómitos	3	10.3%
Doença renal	9	31%
Doença estomatológica	2	6.9%
Processo oncológico	6	20.7%
Traumas	1	3.4%
FLUTD	2	6.9%
Coriza	2	6.9%
Dermatopatia	1	3.4%
Tosse	1	3.4%
Piometra	1	3.4%
Diabetes	1	3.4%

Legenda: FLUTD, Feline Lower Urinary Tract Disease

Segundo o teste exato de Fisher usado para avaliar a relação entre o estado de saúde atual e o Mhf, a análise final determinou que não há nenhuma relação significativa entre estas variáveis ($p > 0.05$).

3.2. Caracterização da população positiva.

3.2.1. Género:

Do grupo positivo $n=12$, 41.7% ($n=5$) eram machos e 58.3% ($n=7$) eram fêmeas. Dos 5 machos 16.6% ($n=2$) eram inteiros e 25% ($n=3$) eram castrados. Das 7 fêmeas, 25% ($n=3$) eram fêmeas inteiras e 33% ($n=4$) eram fêmeas esterilizadas (Tabela 9).

Tabela 9 - Estado reprodutivo do grupo positivo

Machos % (n)	Machos inteiros % (n)	Machos castrados % (n)	Fêmeas % (n)	Fêmeas inteiras % (n)	Fêmeas Castradas % (n)
41.7 (5)	16.6% (2)	25% (3)	58.3% (7)	25% (3)	33% (4)

Legenda: %, Percentagem; n, Número de animais

Avaliou-se a relação entre o sexo e o Mhf assim como o estado reprodutivo da amostra e o resultado do teste de Mhf. Esta análise indicou que não existe nenhuma relação

para a variável género mas existe uma relação entre o resultado de Mhf e o estado reprodutivo para uma significância de 5%. Depois da análise de resíduos para a relação estado reprodutivo e Mhf verificou-se mais gatos positivos inteiros do que gatos positivos castrados com Mhf. De entre todos os gatos esterilizados (machos e fêmeas), 15% (7/47) eram Mhf positivos, enquanto que de entre todos os gatos inteiros (machos e fêmeas) 42% (5/12) eram Mhf positivos.

3.2.2. Idade:

Da população positiva as idades estavam compreendidas entre os 6 meses até aos 16 anos como se pode ver na tabela 10.

Tabela 10 - Idades dos pacientes positivos do grupo de estudo.

Idade:	Nº animais Mhf positivos% (n)
6-12 Meses	8.3 (1)
1-3 Anos	25 (3)
3-5 Anos	16.7 (2)
5-8 Anos	8.3 (1)
8-12 Anos	16.7 (2)
12-16 Anos	25 (3)

Legenda: Nº, Número; %, Percentagem

3.2.3. Habitat:

Relativamente ao habitat, não havia nenhum gato positivo *outdoor*, dentro dos gatos *indoor* 15% (7/45) estão infetados e dentro dos gatos mistos 42% (5/12) estão infetados.

Relativamente ao habitat e a relação com o gato ser positivo ou negativo a Mhf, verificou-se que estatisticamente não existe nenhuma relação significativa entre este e a doença, $p > 0.05$.

3.2.4. Habitat Materno:

No habitat materno, 8.3% (n=1) era *indoor*, 16.7% (n=2) era *outdoor*, 33.3% (n=4) era misto e 41.7% (n=5) era de habitat desconhecido.

3.2.5. Desparasitação:

Na desparasitação externa 66.6% (n=8) recebia tratamento preventivo, enquanto 33.3% (n=4) não recebia tratamento preventivo para vectores (tabela 11). O desparasitante

mais usado, foi o Advantage® em 50% (n=4) dos gatos seguido do Frontline® spot on usado em 25.5% (n=2) gatos e o Frontline® Spray e “Outras marcas” a ser usado em um gato cada um. Relativamente à periodicidade 50% (n=6) dos gatos recebem o tratamento menos de uma vez por mês enquanto que 1 gato recebe cada 2 a 3 semanas e outro recebe mensalmente.

Tabela 11 - Periodicidade de administração e marcas usadas pelo grupo positivo a Mhf

Periodicidade	Nº	Marcas de desparasitante	Nº
Cada 2 a 3 semanas	1	Frontline® Spot On	2
1 vez por mês	1	Frontline® Spray	1
Menos de 1 vez por mês	6	Advantage®	4
Não faz	4	Outro	1

3.2.6. CC:

No grupo positivo houve apenas um com CC 1, 3 apresentaram-se com CC 2, 5 tinham uma CC ideal de 3 e 3 tinham excesso de peso com CC 4.

3.2.7. FIV e FeLV:

A pesquisa de retrovírus dos 12 animais foi a seguinte: 1 gato positivo a FIV, 1 sem pesquisa efetuada e 83.3% (n=10) negativos para FIV. Relativamente a FeLV, 1 era positivo, 1 não tinha teste efetuada e 83.3% (n=10) eram negativos.

3.2.8. Doenças anteriores:

O histórico de doenças anteriores no grupo foi baixo, apenas 2 dos 12 gatos tinham tido história de doenças anteriores, um com vômitos e obstipação e um com IBD e sopro cardíaco.

3.2.9. Estado de saúde atual:

O estado de saúde atual do grupo positivo era de 16.7% (n=2) gatos saudáveis e 83.3% (n=10) doentes, sendo que 3 tinham insuficiência renal, 1 apresentou-se depois de um trauma com uma fratura vertebral, 1 com pneumonia, 1 tinha uma neoplasia suspeita de linfoma e 1 com vômitos e obstipação. Os 3 gatos cujo diagnóstico não está apresentado (tabela 8) são de um gato que se apresentou à consulta com tosse e foi receitado com antibioterapia, um gato suspeito de micoplasmose que faleceu e um gato que se suspeitava

ter uma neoplasia mas devido a problemas financeiros do proprietário o diagnóstico final não foi possível.

4. Discussão:

Na amostra em estudo a prevalência de base hospitalar determinada por PCR foi de 20.7%, um valor mais elevado que o obtido por PCR-RT no estudo de Martínez-Díaz *et al.*, (2013) feito em Portugal com uma percentagem de 12.81% e mais alto que qualquer valor obtido na Europa por como por exemplo o estudo de Bauer *et al.*, (2008) na Alemanha com 4.5% ou o de Willi, Boretti *et al.*, (2006) na Suíça com 1.5%. A diferença de valores entre este estudo e outros efetuados na Europa pode estar relacionada com as diferenças climáticas, de vectores, na prestação de cuidados de saúde dos animais de companhia e fatores socioeconómicos.

Em relação à idade, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa e o número de animais em cada grupo estava relativamente equilibrado. Para ser possível verificar o risco relativo da idade como em Grindem *et al.*, (2009), ou a associação entre este dado e a infeção de Mhf como no estudo de Bauer *et al.*, (2008) onde a média de idade dos gatos positivos a Mhf era de 10 anos era necessária uma amostra maior.

Em relação ao género da população positiva, não houve uma relação estatisticamente significativa como aconteceu no estudo de Martínez-Díaz *et al.*, (2013) e Tasker *et al.*, (2003). No entanto, no estudo de Gentillini *et al.*, (2009) houve mais machos infetados assim como segundo J.E. Sykes, (2010) que afirma que gatos infetados com Mhf têm 7 vezes mais probabilidades de serem machos. Neste estudo, era necessária uma amostra maior para se conseguir averiguar com mais precisão a relação entre estes 2 fatores.

No que diz respeito ao estado reprodutivo dos gatos verificou-se que há uma significância estatisticamente relevante entre o estado reprodutivo e o Mhf e depois de uma análise de resíduos verificou-se que temos mais animais positivos inteiros e menos animais positivos castrados, isto vai de acordo com o estudo de Martínez-Díaz *et al.*, (2012) onde se verificou também um maior número de animais positivos inteiros do que castrados. Isto terá a ver com o facto de os animais inteiros terem maior tendência para irem à rua e estarem em contacto com os vectores.

Em relação ao habitat, embora não se observem diferenças estatisticamente significativas como no estudo de Martínez-Díaz *et al.*, (2013), observa-se uma maior frequência de gatos mistos infetados do que gatos *indoor*. Esta tendência vai de acordo com o estudo de Hackett *et al.*, (2006), onde todos os animais infectados tinham acesso à rua. Sendo esta uma doença transmitida, embora não exclusivamente, por um vector, um maior

contacto com os mesmos aumentará o risco de infeção. O número de gatos outdoor neste estudo era muito reduzido pelo que não se poderão tirar ilações, quanto ao estado de infeção nesse grupo, sendo no entanto expectável que seja elevado.

O habitat materno foi um dado importante uma vez que um dos métodos de transmissão conhecidos é a via intrauterina e o aleitamento, ainda assim em nenhuma das bibliografias estudadas havia informação acerca do habitat materno e a sua influência na transmissão do Mhf. Estatisticamente, não foi possível mostrar uma associação entre estes 2 dados. Mas 11 das 12 gatas tinham acesso à rua podendo por isso ter funcionado como vectores. Este tópico deverá ser reavaliado em outros estudos de maneira a verificar-se a importância da influência do habitat materno na transmissão da doença.

A desparasitação externa é aconselhada para evitar infestações de ectoparasitas como o *C. felis*, um dos vectores responsáveis pela transmissão de Mhf segundo o estudo de Sykes, (2010) e de Woods *et al.*, (2005). No grupo positivo, 8 dos gatos faziam a desparasitação externa, embora apenas 2 o fizessem com a regularidade mensal aconselhada pelos médicos veterinários. No entanto a maioria dos gatos era indoor sem qualquer acesso à rua e não foram visualizados ectoparasitas transmissores de Mhf em nenhum dos gatos durante os exames físicos. Estatisticamente neste estudo não houve nenhuma relevância entre a infeção e a desparasitação, no entanto no estudo de Lappin *et al.*, (2006) a presença de uma série de doenças transmitidas por pulgas entre elas o Mhf foi identificada em 65.2% das pulgas revelando que a desparasitação externa é uma medida de prevenção aconselhada em áreas endémicas.

A presença de retrovírus no estudo de Martínez-Díaz *et al.*, (2013) foi estatisticamente relevante indicando que há uma associação entre Mhf e FIV/ FeLV e segundo o trabalho de Harvey, (2006) uma percentagem elevada de gatos com Mhf tinham FeLV (40-50%). Neste estudo apenas 2 gatos tinham retrovírus, um com FIV e um com FeLV. Os dados obtidos neste estudo contrariam alguma bibliografia uma vez que um número muito baixo de animais tinha concomitantemente Mhf e FIV ou FeLV assim como não foi identificada nenhuma relação estatística entre as doenças. Este resultado pode ter sido influenciada pela amostra, uma vez que a maior parte dos animais não tinha acesso à rua, logo não teria contacto com outros gatos, e por isso a incidência destas doenças em separado ou em conjunto ser muito baixa.

Na amostra havia 10 gatos doentes na altura da recolha de sangue e apenas 2 animais saudáveis, isto vai de acordo com o estudo de Willi, Boretti *et al.*, (2006) onde

também mais de 50% da amostra com Mhf estava doente. Um dos gatos doentes estava inclusive com suspeita de Micoplasmose que se veio a verificar neste estudo

5. Conclusão:

A realização deste trabalho de mestrado tinha como função, ajudar na compreensão, conhecimento e impacto que esta doença tem na saúde dos gatos.

Verificou-se que a prevalência desta doença pode ser bastante elevada em algumas regiões de Portugal.

Ter esta prevalência elevada numa população maioritariamente *indoor* não vai de encontro com grande parte dos fatores de risco apresentados em bibliografia. Isto pode querer dizer que há algum fator de risco diferente dos que geralmente são abrangidos nos estudos que deverá ser reconhecido em estudos futuros.

De maneira a reconhecer a prevalência real desta doença em Portugal, em estudos futuros seria interessante estudar mais gatos *outdoor* uma vez que estes encontram-se em contacto com os fatores de risco mais conhecidos e funcionam como reservatório da bactéria.

6. Bibliografia:

Barker, E. N., Darby, A. C., Helps, C. R., Peters, I. R., Heesom, K. J., Arthur, C. J., et al. (2011b, 07 12). *Molecular Characterization of the uncultivable hemotropic bacterium Mycoplasma haemo*. Retrieved 2012, from Veterinary Research: <http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/83>

Barker, E. N., Helps, C. R., Peters, I. R., Darby, A. C., Radford, A. D., & Tasker, S. (2011a). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma haemofelis* a Hemotropic *Mycoplasma*. *Journal of Bacteriology*, 193 (8), 20-60-2061.

Bauer, N., Balzer, H.-J., Thure, S., & Moritz, A. (2008). Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 252-258.

Bernstein, M. (2011). *the merck veterinary manual*. Retrieved 11 16, 2012, from <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/10406.htm>

Biotechnology, i. *Mycoplasma haemofelis detection kit user manual*.

Godelind, W.-J., Christian, J., Museux, K., Hoelzle, K., Tasker, S., Lutz, H., et al. (2010). Identification, Characterization, and Application of a Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotropic *Mycoplasma* Infection. *Clinical And Vaccine Immunology*, 17 (12), 1917-1925.

Gentilini, F., Novacco, M., Turba, M. E., Willi, B., Bacci, M. L., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 277-285.

Grindem CB, C. W. (1990). Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. *J Am Vet Med Assoc*.

Hackett, T. B., Jensen, W. A., Lehman, T. L., Hohenhaus, A. E., Crawford, P. C., Giger, U., et al. (2006). Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemoninutum*, *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229 (5), 700-705.

Haefner, M., Burke, T. J., Kitchell, B. E., Lamont, L. A., Schaeffer, D. J., Behr, M., et al. (2003). Identification of *haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) in captive nondomestic cats. *journal of zoo and wildlife medicine*, 139-143.

Harvey, J. W. (2006). Hemotropic Mycoplasmoses. In C. E. Greene, *infectious diseases of the dog and cat* (pp. 252 - 260). elsevier.

Kewish, K. E., Appleyard, G. D., Myers, S. L., Kidney, B. A., & Jackson, M. L. (2004). *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. *Canadian Veterinary Journal*, 45, 749-752.

- Khuly, P. (2009, 05 29). *PetMed*. Retrieved 04 16, 2013, from <http://www.petmd.com/blogs/fullyvetted/2009/may/body-condition-scoring-fat-pets-and-case-one-hefty-dog#.UW3G3LWG2So>
- Lappin, Griffin, M., Brunt, J., Riley, A., Burney, D., Hawley, J., et al. (2006). Prevalence of Bartonella species, Haemobartonella 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 Surgery* , 85-90.
- Lobetti, R. G., & Tasker, S. (2004). Diagnosis os feline haemoplasma infection using a real.time PCR assay. *Journal of South Africa Veterinary Association* , 75 (2), 94-99.
- Mayors Laboratório Especialidades Veterinarias, <http://www.mayorslab.com.ar/productos/doxilina.html>; Acedido em 23/07/2013
- Martínez-Díaz, S. F. (2013). Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by Real-time polymerase chain reaction. *Journal of Feline Medicine and Surgery* .
- Messick, J. B., & Santos, A. P. (2011). Identification, Bioinformatics Analysis, and Expression of Immunoreactive Antigens of Mycoplasma haemofelis. *Clinical and Vaccine Immunology* , 1275-1281.
- Peters, I. R., Helps, C. R., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2008). The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostic service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Veterinary Microbiology* , 126, 142-150.
- Q.J.Zhuang, H. R. (2010). the occurrence of mycoplasma haemofelis and candidatus mycoplasma haemominutum incats in China confirmed by sequence-based analysisnrobosomal DNA. *Journal of animal and veterinary advances* , 635-638.
- Roura, X., IR, P., L, A., MD, T., EN, B., & M, P. (2010). Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnose Investigation* , 270-274.
- Santos, A. P., Guimarães, A. M., Nascimento, N. C., SanMiguel, P. J., MARTin, S. W., & Messick, J. B. (2011). Genome of Mycoplasma haemofelis, unrevelling it's strategies for survival and persistence. *veterinary research* , 42-58.
- Sykes, J. E. (2010). Feline Hemotropic Mycoplasmas. *veterinary clinics of north america* , 40 (6), pp. 1157-1170.
- Sykes, J. E., Drazenovich, N. L., Ball, L. M., & Leutenegger, C. M. (2007). Use of conventional Real-Time Polymerase Chain Reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infection in anemic an nonanemic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* , 21, 685-693.
- Tanahara, M., Miyamoto, S., Nishio, T., Yoshi, Y., Sakuma, M., Sakata, Y., et al. (2010). An Epidemiological Survey od Feline HEmoplasma Infection in Japan. *Journal of veterinary Medicine Science* , 1575-1581.

- Tasker, S., Binns, S., Day, M. J., Gruffidd-Jones, T. J., Harbour, D. A., Helps, C. R., et al. (2003). 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. *the veterinary record* , 193-198.
- Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., & Harbour, D. A. (2003). Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* en "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*" DNA. *Journal of clinical Microbiology* , 439-441.
- Tasker, Séverine (2006). Feline Haemoplasma Infection (haemobartonella) - An Update. NAVC Proceedings 2006, Bristol
- Tasker, S., Peters, I. R., Day, M. J., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffyd-Jones, T. J., et al. (2009). Distribution of *Mycoplasma Haemofelis* in blood and tissues following experimental infection. *Microbial Pathogenesis* , 47, 334-340.
- Watanabe M, H. M. (2003). Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific polymerase chain reaction (SS-PCR). *Journal of veterinary Medicine science* , 1111-1114.
- Willi, B., Boretti, F. S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., CAtoori, V., et al. (2006). Prevalence, Risk Factor Analysis, and follow-up of Infections Caused by three Hemoplasma Species in Cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* , 44 (3), 961-969.
- Willi, B., Boretti, F. S., Meli, M. L., Bernasconi, M. V., Casati, S., Hegglin, D., et al. (2007). Rel-time PCR Investigation of Potential Vectors, Reservoirs, and Shedding Patterns of Feline Hemotropic Mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology* , 73 (12), 3798-3802.
- Willi, B., Tasker, S., Borett, F., Doherr, M. G., Cattori, V., Meli, M. L., et al. (2006). 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* , 44 (12), 4430-4435.
- Woods, J. E., Brewer, M. M., Hawley, J. R., Wisnewski, ., & Lappin, M. R. (2005). Evaluation of experimental transmission of Candidatus *Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *American Journal of Veterinary Research* , 66 (6), 1008-1012.
- Woods, J. E., Wisnewski, N., & Lappin, M. R. (2006). Attempted transmission of Candidatus *Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. *American Journal of Veterinary Research* , 67 (3), 494-497.

7. Apêndices:

Proprietário: _____ Contacto: _____ Data de recolha: _____							
Nome:							
Idade:							
	0-6 meses	<input type="checkbox"/>	3-5 anos	<input type="checkbox"/>	12-16 anos	<input type="checkbox"/>	
	6-12 meses	<input type="checkbox"/>	5-8 anos	<input type="checkbox"/>	>16 anos	<input type="checkbox"/>	
	1-3 anos	<input type="checkbox"/>	8-12 anos	<input type="checkbox"/>			
Sexo:							
	Macho	<input type="checkbox"/>	Fêmea	<input type="checkbox"/>			
	Macho castrado	<input type="checkbox"/>	Fêmea esterilizada	<input type="checkbox"/>			
Habitat:							
	Indoor	<input type="checkbox"/>					
	Outdoor	<input type="checkbox"/>					
	Misto	<input type="checkbox"/>					
Habitat materno:							
	Indoor	<input type="checkbox"/>	Misto	<input type="checkbox"/>			
	Outdoor	<input type="checkbox"/>	Desconhecido	<input type="checkbox"/>			
Desparasitante externo:							
A) marca	Frontline pipeta	<input type="checkbox"/>	Advantage	<input type="checkbox"/>	Capstar	<input type="checkbox"/>	
	Frontline spray	<input type="checkbox"/>	Advocate	<input type="checkbox"/>			
	Frontline combo	<input type="checkbox"/>	Stronghold	<input type="checkbox"/>	Outro:	<hr/>	
B) periodicidade de administração:	Cada 2/3 semanas	<input type="checkbox"/>	- de 1x/ mês	<input type="checkbox"/>			
	1x/mês	<input type="checkbox"/>	Não faz	<input type="checkbox"/>			

Condição corporal:					
	1	2	3	4	5
Fiv/FeLV:					
	Fiv positivo	<input type="checkbox"/>	FeLV positivo	<input type="checkbox"/>	
	Fiv negativo	<input type="checkbox"/>	FeLV negativo	<input type="checkbox"/>	
	Não testado	<input type="checkbox"/>	Não testado	<input type="checkbox"/>	
Anemia:					
	Valor		Não avaliado	<input type="checkbox"/>	
Doenças anteriores:					
	Não	<input type="checkbox"/>			
	Sim, quais?				
Estado actual de saúde:					
	Saudável	<input type="checkbox"/>	Doente	<input type="checkbox"/>	
			Diagnóstico:		

Apêndices 1- Inquérito feito aos proprietários durante a consulta