

**ANA RITA AUGUSTO VICENTE**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL  
DE GATOS CONSIDERADOS SUSPEITOS DE *Mycoplasma  
haemofelis***

**Orientador:** Professora Doutora Joana de Oliveira

**Co-orientador:** Professora Dra. Odete Almeida

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa 2015

**ANA RITA AUGUSTO VICENTE**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL  
DE GATOS CONSIDERADOS SUSPEITOS DE *Mycoplasma  
haemofelis***

**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: Professora Doutora Joana de Oliveira**

**Co-orientador: Professora Dra. Odete Almeida**

**Arguente: Professora Doutora Ana Munhoz**

**Presidente do Júri: Professora Doutora Sofia Van  
Harten**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa 2015

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer à minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio incondicional e por tornarem este sonho possível.

Ao meu marido e filha, pelo incentivo e força transmitida, por estarem sempre aqui.

À Filipa, Isabel, Joana, Natália, por me terem acompanhado neste percurso e, especialmente, à Raquel, por todo o incentivo e ajuda que me trouxeram até onde estou hoje.

À Sónia, pelo companheirismo e encorajamento.

À Dra. Sónia Monteiro e a toda a equipa do hospital veterinário CASVET pelos conhecimentos transmitidos, ajuda e amizade ao longo de todo o estágio, em especial à minha orientadora, Dra. Lúcia Gonçalves, pela disponibilidade e amizade.

À Liga Portuguesa dos Direitos do Animal e corpo clínico, principalmente à Dra. Célia Palma, que orientou o meu estágio e transmitiu ensinamentos que levo para o futuro. Não poderia deixar de agradecer à Dra. Teresa Landeiro pelos conselhos e amizade, por tudo, ao longo destes anos de formação.

À Professora Inês Viegas, pela disponibilidade e prontidão demonstradas e pela ajuda valiosa na parte estatística.

À Professora Joana Oliveira e Professora Odete Almeida, pela paciência, auxílio e sobretudo incentivo, na concretização deste trabalho.

Obrigado.

## Resumo

A *Mycoplasma haemofelis* é uma bactéria gram-negativa que infecta gatos domésticos ou selvagens. Os animais que recuperam da infecção aguda permanecem cronicamente infectados durante meses, anos ou até mesmo durante toda a sua vida, não apresentando quaisquer sinais clínicos. Neves (2013) testou em Portugal 58 gatos para *Mhf* (sem sinais clínicos compatíveis com infecção por esta bactéria) e verificou uma prevalência de 20.7%, tendo sido utilizada a técnica de PCR nas amostras sanguíneas.

Este estudo retrospectivo teve como objectivo geral investigar a presença de diferenças entre o perfil clínico, hematológico e bioquímico e possíveis factores de risco em animais clinicamente suspeitos de infecção por *Mycoplasma haemofelis*, que foram consultados no Hospital Veterinário CASVET, Parede. A pesquisa do agente foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) em amostras sanguíneas.

Verificou-se presença estatisticamente significativa de trombocitopenia em animais positivos para *Mycoplasma haemofelis* [*Mhf* (+)]. Por outro lado, estes animais cujo diagnóstico foi positivo apresentaram normoproteinémia estatisticamente significativa em relação aos animais *Mhf* (-) que apresentavam hiperproteinémia. Não se encontraram quaisquer outras diferenças para os restantes parâmetros hematológicos, bioquímicos e de caracterização dos animais não existindo também relação estatística entre a presença de anemia nos animais infectados e o seu estado retroviral.

Este trabalho é muito sugestivo da elevada prevalência da infecção por *Mhf* na clínica em estudo, sendo muitos animais portadores assintomáticos. Deste modo, a pesquisa do *Mhf* em contexto clínico deverá ter em conta pelo menos mais do que um dos sinais clínicos, uma vez que a maioria dos mesmos não são patognomónicos. Outros testes de diagnóstico antes da realização do teste de PCR são imprescindíveis para uma melhor detecção de animais com a fase aguda da doença.

Palavras-Chave: *Mycoplasma haemofelis*, portadores assintomáticos, sinais clínicos, caracterização hematológica, caracterização bioquímica.

## Abstract

*Mycoplasma haemofelis* is a gram-negative bacteria which infects both domestic and wild cats. Animals that recover from acute infection remain chronically infected for months, years or even throughout his life, showing no clinical signs. Neves, 2013, tested in Portugal 58 cats for *Mhf* (without clinical signs consistent with infection by this bacteria) and found a prevalence of 20.7%, having been used PCR in blood samples.

This retrospective study had as a general objective investigate the presence of differences between the clinical, hematological and biochemical profile and possible risk factors for animals clinically suspected of infection with *Mycoplasma haemofelis*, who were consulted at CASVET, a veterinary hospital in Parede, Portugal. Search agent was performed by real time PCR (RT-PCR) in blood samples.

There was a statistically significant presence of thrombocytopenia in animals positive for *Mycoplasma haemofelis* [*Mhf* (+)]. Moreover, this animals whose diagnosis was positive showed a statistically significant normproteinaemia compared to [*Mhf* (-)] that had hyperproteinemia. They did not match any other differences for the remaining hematological and biochemical parameters and characterization of the animals. There was also no statistical relationship between the presence of anemia and the retroviral state.

This work is very suggestive of the high prevalence of infection by *Mhf* in CASVET, with various animals being asymptomatic carriers. *Mhf* research in the clinical setting should take into account at least more than one clinical sign, once most of them are not pathognomonic. Other diagnostic tests prior to the PCR testing are vital for improved detection of animals in the acute phase of the disease.

Keywords: *Mycoplasma haemofelis*, asymptomatic carriers, clinical signs, hematological characterization, biochemical characterization.

## Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ALT - Alanina Aminotransferase

AST - Aspartato Transaminase

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

*CMhm - Candidatus Mycoplasma haemominutum*

*CMt - Candidatus Mycoplasma turicensis*

dL – Decilitro

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FA – Fosfatase Alcalina

FeLV – Vírus da Leucemia felina, do inglês *Feline Leukemia Virus*

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina, do inglês *Feline Immunodeficiency Virus*

Fl – Fentolitro

FLUTD - do inglês *Feline Lower Urinary Tract Disease*

G - Gauge

g - Grama

h - Hora

Ht – Hematócrito

HCM – hemoglobina corpuscular média

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

kg – Quilograma

L - Litro

mg - Miligrama

*Mhf - Mycoplasma haemofelis*

n - Amostra

Nº - Número

PCR - Reacção em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Pg - Picograma

PO – Pela Boca, do latim *per os*

q24h - Todas (quase) as vinte e quatro horas

RDW - *Red Cell Distribution Width*, distribuição do tamanho dos eritrócitos

RT-PCR - Reacção em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

UI – Unidade Internacional

VCM - Volume Corpuscular Médio

% - Percentagem

> - Superior

< - Inferior

## Índice Geral

1. Introdução.....	12
1.1 Descrição do Agente infeccioso.....	12
1.2 Prevalência.....	14
1.2.1 Em Portugal.....	14
1.2.2 No mundo.....	14
1.3 Fisiopatologia.....	15
1.3.1 Fase de pré-bacteriemia.....	15
1.3.2 Fase aguda.....	15
1.3.3 Fase crónica.....	18
1.3.4 Fase de portador.....	18
1.4 Sinais Clínicos.....	18
1.5 Factores de Risco.....	19
1.6 Diagnóstico.....	19
1.7 Modo de transmissão.....	21
1.8 Achados Laboratoriais.....	22
1.9 Tratamento.....	23
1.9.1 Antibioterapia.....	23
1.9.2 Corticoesteróides.....	24
1.9.3 Tratamento de Suporte.....	24
1.10 Risco zoonótico.....	25
1.11 Objectivos.....	25
2. Materiais e Métodos.....	25



2.1	Recolha de dados.....	25
2.2	Animais em estudo.....	26
2.3	Colheita sanguínea.....	26
2.4	Análise de dados.....	26
2.5	Análise estatística .....	28
3.	Resultados.....	30
3.1	Sinais clínicos.....	30
3.2	Género, estado reprodutivo e acesso ao exterior.....	31
3.3	Idade.....	32
3.4	Infecção concomitante com FIV e/ou FeLV.....	33
3.5	Caracterização hematológica dos grupos <i>Mhf</i> (-) e <i>Mhf</i> (+).....	34
3.6	Relação entre anemia e infecção por FIV e/ou FeLV.....	36
3.7	Caracterização bioquímica dos grupos <i>Mhf</i> (-) e <i>Mhf</i> (+).....	36
3.8	Presença de doenças concomitantes e crónicas.....	37
4.	Discussão dos Resultados.....	39
5.	Conclusão.....	44
6.	Bibliografia.....	45

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Classificação da anemia quanto à sua gravidade .....	16
<b>Tabela 2</b> - Intervalos de referência da análise hematológica.....	28
<b>Tabela 3</b> - Intervalos de referência das análises bioquímicas séricas.....	28
<b>Tabela 4</b> – Relação entre as variáveis sexo, estado reprodutivo e acesso ao exterior e infecção por <i>Mhf</i> .....	32
<b>Tabela 5</b> – Relação entre a idade e a infecção por <i>Mhf</i> .....	33
<b>Tabela 6</b> – Relação entre a infecção pelos retrovírus FIV e/ou FeLV e a infecção por <i>Mhf</i> .....	33
<b>Tabela 7</b> – Caracterização hematológica do grupo <i>Mhf</i> (-) e <i>Mhf</i> (+).....	34
<b>Tabela 8</b> – Comparação entre os parâmetros que caracterizam a anemia e a infecção por <i>Mhf</i> .....	35
<b>Tabela 9</b> – Grau de anemia.....	35
<b>Tabela 10</b> – Análise estatística da relação entre a presença de anemia e infecção por FIV e/ou FeLV.....	36
<b>Tabela 11</b> - Análise dos parâmetros de bioquímica sérica nos dois grupos.....	37

## Índice de gráficos

<b>Gráfico 1</b> – Valores de hematócrito e volume corpuscular médio, em gatos, das 0 às 30 semanas.....	17
<b>Gráfico 2</b> – Sinais Clínicos que levaram à pesquisa de <i>Mhf</i> .....	31
<b>Gráfico 3</b> – Doenças concomitantes diagnosticadas nos animais pertencentes ao grupo <i>Mhf</i> (+).....	38
<b>Gráfico 4</b> – Doenças crônicas.....	38

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	12
<b>Figura 2</b> – <i>Mhf</i> presente no sangue de um gato.....	13
<b>Figura 3</b> - Mucosas pálidas num gato anémico infectado por <i>Mhf</i> .....	18
<b>Figura 4</b> – Esfregaço sanguíneo de um gato anémico infectado por <i>Mhf</i> .....	20

## 1. Introdução

### 1.1 Descrição do agente infeccioso

Os micoplasmas hemotrópicos (normalmente conhecidos como hemoplasmas) (Barker *et al.*, 2011) são bactérias gram-negativas (Geffen, 2010) que se localizam na superfície dos eritrócitos (Figura 1). Estes podem causar diferentes graus de anemia hemolítica nos hospedeiros infectados (Roura *et al.*, 2010).

Foram agrupados inicialmente como Rickettsias devido a diversos factores como o seu tamanho pequeno e propriedades de coloração, o facto de não poderem ser cultivados *in vitro*, a sua transmissão através de vectores artrópodes e o seu carácter hemotrópico (que os relacionava com a família *Anaplasmataceae*) (Neimark *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2014), no entanto, as bactérias pertencentes a esta família, multiplicam-se por divisão binária dentro das hemácias (Neimark *et al.*, 2001), enquanto a anteriormente designada por *Haemobartonella* não invade os eritrócitos, anexando-se simplesmente à superfície dos mesmos (Harvey, 2012; Hicks *et al.*, 2015).

Em 1997 os genes 16S rRNA da *Haemobartonella felis* foram sequenciados e analisados tendo-se constatado que estavam mais relacionados com o grupo *pneumoniae* do género *Mycoplasma* (Ishak *et al.*, 2008; Harvey, 2012; Guimarães *et al.*, 2014).

Deste modo, agora pertencem à ordem *Mycoplasmatales*, classe *Mollicutes*, género *Mycoplasma* (Barker, 2011; Messick,

2012) sendo os hemoplasmas os primeiros *Mollicutes* a colonizar eritrócitos. Estas bactérias desprovidas de parede celular evoluíram de um ancestral gram-positivo através da redução gradual do seu genoma (Santos *et al.*, 2011; Messick, 2012) sendo os procariotas mais pequenos conhecidos capazes de se auto-replicar (Messick, 2012).

São pelo menos três as espécies de hemoplasmas que infectam os gatos domésticos e selvagens sendo: *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf*), *candidatus Mycoplasma haemominutum* (*CMhm*) e *candidatus Mycoplasma turicensis* (*CMt*) (Wolf-Jackel *et al.* 2010; Santos *et al.*,



Figura 1 - *Mycoplasma haemofelis* - na figura observam-se dois *Mhf* (destacados por duas setas) à superfície de um eritrócito. Micrografia eletrônica de transmissão de um eritrócito de gato (adaptado Tasker, S., 2012).

2014). O prefixo *candidatus* é utilizado, para novos taxons ou descritos incompletamente, até se obter mais informação que suporte a sua classificação (Neimark *et al.*, 2002).

A sua caracterização tem sido difícil uma vez que não são microrganismos

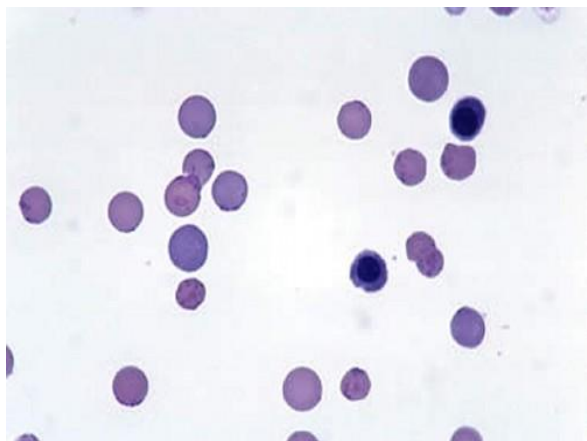


Figura 2 – *Mhf* presente no sangue de um gato - Wright-Giemsa, 100X óleo de imersão. Adaptado de Bernstein, 2011.

cultiváveis laboratorialmente (García-Leal *et al.*, 2009; Willi *et al.*, 2010), no entanto, relativamente à sua morfologia as células dos *Mollicutes* são pleomórficas podendo ser esféricas, em forma de anel, de pêra, de espiral ou filamento. Por vezes, encontram-se agrupadas em cadeias, resultado da assincronização da divisão celular e da replicação genómica (Strait & Madsen, 2013). O diâmetro das formas esféricas varia de 0,3 a 0,8 micromilímetros (Vincent-Johnson, 2014).

Foram identificadas duas variantes distintas de *Haemobartonella felis* (Hagiwara, 2009; Willi *et al.*, 2010). A grande, ou forma de Ohio, a mais patogénica e agora designada por *Mhf*, capaz de causar anemia hemolítica moderada a grave em animais imunocompetentes, referida como anemia infecciosa felina (Roura *et al.*, 2010). Na avaliação citológica de esfregaços sanguíneos observou-se que são cocos e que por vezes formam cadeias curtas de três a seis organismos.

Quanto à pequena forma, conhecida como forma da Califórnia, actualmente designada por *CMhm* é geralmente menor do que o *Mhf* e não foi claramente associada a doença em gatos imunocompetentes. Apesar desta variante da Califórnia poder ser encontrada em gatos anémicos, a associação entre este microrganismo e anemia continua a ser controversa sendo necessários estudos adicionais para definir a diferença de virulência entre estas duas variantes (Hagiwara, 2009). Em dois estudos diferentes onde os animais foram experimentalmente infectados, observou-se uma maior patogenicidade do *Mhf* onde todos os gatos infectados ficaram clinicamente doentes enquanto os infectados por *CMhm* ficaram subclínicamente infectados (Lappin, 2011).

Posteriormente, uma terceira espécie de micoplasma *CMt* foi descoberta, no entanto, a sua patogenicidade ainda não é clara. A análise de prevalência e factores de risco sugerem que este hemoplasma sozinho tem uma importância clínica mínima sendo comumente encontrado em animais saudáveis (Hagiwara, 2009).

## 1.2 Prevalência

### 1.2.1 Em Portugal

Em Portugal, Martínez-Díaz *et al.* (2013) utilizando o método RT-PCR, testaram amostras de sangue periférico de 320 gatos da região norte central, para a presença de *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*. Mais de metade dos animais (189) tinha acesso ao exterior e 184 apresentavam sinais inespecíficos de doença quando se dirigiram ao Médico Veterinário e foram testados. Foi observado que estavam infectados 139 (43,44%) gatos tendo sido determinada uma prevalência de 12,81% para a infecção por *Mhf*.

Também em 2013, Neves, utilizando a técnica de PCR, verificou uma prevalência de 20,7% para *Mycoplasma haemofelis*, na zona de Almada (distrito de Setúbal), num estudo onde foram utilizados 58 animais.

### 1.2.2 No mundo

A prevalência de micoplasmose pelo mundo é variável sendo, aparentemente, maior no caso de *CMhm*, principalmente em animais saudáveis, enquanto a infecção por *Mhf* é mais provável em gatos anémicos (Hagiwara, 2009).

Na Grécia foram testados 97 gatos onde estavam 24 doentes anémicos, 55 doentes não anémicos e 18 saudáveis não anémicos e foi observada uma positividade de 20,6% (20 gatos) (sendo que 7 só estavam infectados por *Mhf*, 10 só estavam infectados com *CMhm* e 3 apresentavam co-infecção das duas bactérias anteriormente referidas (Maher, 2010).

A prevalência de *Mhf* é variável de estudo para estudo podendo apresentar valores entre 0,4% a 46,4%. A variação dos resultados obtidos pode ser explicada pelas diferenças de amostra entre os diversos estudos tais como: gatos saudáveis, gatos suspeitos de micoplasmose, gatos de interior e de rua. Também parece existir variância entre áreas geográficas existindo uma maior prevalência em países quentes (Tasker, 2013).

### **1.3 Fisiopatologia**

A gravidade da doença causada pelo *Mhf* varia desde a existência de animais sem sinais clínicos, animais que apresentam anemia leve, até animais com anemia muito grave, podendo levar à morte do animal.

A fisiopatologia foi dividida em quatro fases: pré-bacteriemia, aguda, crónica e de portador (Messick & Harvey, 2012).

#### **1.3.1 Fase de pré-bacteriemia**

Desde que o animal é infectado pela bactéria até aos primeiros sinais clínicos de doença podem decorrer entre 2 a 34 dias sendo o pico da bacteriemia, em média, 14 a 15 dias após a infecção. A multiplicação bacteriana pode ter elevadas variações ao longo do tempo, sendo que os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente estudados. Uma das hipóteses para a flutuação do número de bactérias em circulação é o sequestro destas por parte dos macrófagos esplénicos, hepáticos e pulmonares seguido da sua libertação para a corrente sanguínea (Tasker *et al.*, 2009a; Sykes, 2010). Outra das hipóteses é o efeito da variação antigénica cíclica desencadeada por algumas espécies hemotrópicas para evadir a resposta imunitária do hospedeiro (Messick, 2012).

#### **1.3.2 Fase aguda**

A fase aguda dura desde o primeiro até ao último pico de bacteriemia. Esta fase costuma prolongar-se durante cerca de um mês. Ocasionalmente os gatos morrem rapidamente devido às bacteriemias massivas e rápida descida do hematócrito no decurso da doença. Os organismos geralmente aparecem no sangue de uma forma cíclica em episódios de bacteriemia discretos. O número de *Mhf* geralmente aumenta até um pico entre 1 a 5 dias seguido por um rápido declínio. O desaparecimento sincronizado das bactérias pode ocorrer em 2 horas ou menos. Muitas vezes, uma rápida diminuição do hematócrito seguido de um rápido aumento ocorre em associação com o aparecimento e desaparecimento de grandes quantidades de organismos do sangue. Estas variações podem estar associadas com o sequestro dos eritrócitos parasitados pelo baço com posterior libertação de eritrócitos não parasitados. Noutros casos, o hematócrito permanece baixo ou continua a descer durante 1 ou



mais dias após o episódio de bacteriemia provavelmente como resultado da destruição eritrocitária (Messick & Harvey, 2012).

A anemia pode ser classificada em relação ao hematócrito em leve, moderada, grave ou muito grave consoante a sua diminuição, como se pode observar na tabela 1.

**Tabela 1:** Classificação da anemia quanto à gravidade (adaptado de Nilkumhang, 2007).

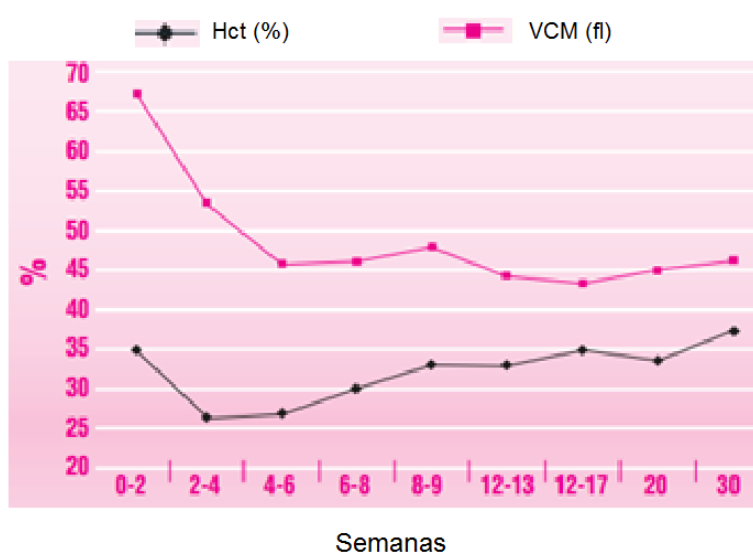
Gravidade da anemia	Hematócrito (%)
Leve	20 – 26
Moderada	14 – 19
Grave	10 – 13
Muito Grave	<10

As bactérias podem causar alguma lesão nos eritrócitos, no entanto a lesão imunomediada parece ser a mais importante. A destruição secundária de eritrócitos é a causa mais comum de anemia hemolítica (Nilkumhang, 2007). A patogenia exacta em cada indivíduo ainda não é clara no entanto sabe-se que os eritrócitos são marcados como corpo estranho o que irá resultar na ligação de anticorpos IgG ou IgM aos mesmos. A presença dos anticorpos leva a que os eritrócitos sejam removidos parcial ou completamente da corrente sanguínea pelo sistema fagocitário mononuclear (hemólise extravascular). Em alguns casos, os anticorpos podem também fixar o complemento resultando na formação de um complexo que ataca a membrana, o que conduz a hemólise intravascular (Merrill, 2012). Outra das hipóteses é o *Mhf* poder desencadear a apoptose dos eritrócitos infectados como já foi sugerido para o *Mycoplasma suis* (Santos *et al.*, 2011).

O teste de Coomb's direto pode ser positivo indicando a presença de anticorpos na superfície dos eritrócitos uma semana após a primeira bacteriemia mantendo-se positivo durante toda esta fase (Sykes, 2010). A anemia é regenerativa quando existe um aumento da presença de reticulócitos em circulação. Estes, normalmente, têm um maior volume celular que um eritrócito maduro tendo assim um maior volume corpuscular médio (VCM) e transportam menos hemoglobina ou têm síntese de hemoglobina incompleta tendo por conseguinte, uma concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) menor. Assim, este tipo de anemia é frequentemente designada por macrocítica hipocrómica (Merrill, 2012).

É ainda importante referir que os gatos nascem com uma contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito, similar ao dos adultos. No entanto tais valores começam a descer quando os eritrócitos fetais são substituídos pelos eritrócitos adultos (Gráfico 1) existindo um certo grau de anemia, designado por anemia fisiológica neonatal (Lourenço *et al.*, 2009; Casal, 2010).

**Gráfico 1** – Valores de hematócrito e volume corpuscular médio em gatos de 0 - 30 semanas (adaptado de Couto, 2005).



Segundo um estudo realizado por Casal (2010) onde foram utilizados 20 gatos de raça indeterminada, é por volta dos 38 dias de idade que a contagem de eritrócitos estabiliza dentro do intervalo de referência da espécie. No entanto, tanto a concentração de hemoglobina quanto o hematócrito, apesar de terem aumentado relativamente às medições anteriores, ainda se encontravam abaixo do limite mínimo considerado normal para os adultos.

Sem tratamento, um terço dos animais com infecção aguda por *Mhf* morrem devido à gravidade da anemia. Os gatos que tenham uma resposta imunitária suficiente e uma resposta regenerativa da medula óssea que compense a destruição de eritrócitos, recuperam da doença (Messick & Harvey, 2012).

### 1.3.3 Fase crónica

Desde o último pico de parasitemia até o hematócrito (Ht) estabilizar dentro ou perto do intervalo de referência costuma decorrer pelo menos 1 mês. Em gatos sem tratamento os organismos são comumente observados em pouca quantidade no sangue durante esta fase (Messick & Harvey, 2012) podendo nem serem observados durante longos períodos de tempo (Sykes, 2010). Esta leve parasitemia pode dever-se ao facto de o *Mhf* nem sempre ser eliminado por fagocitose onde já foram observadas bactérias intactas em vacúolos fagocíticos de macrófagos no baço e pulmões, tornando assim os animais cronicamente infectados (Messick & Harvey, 2012).

Num estudo realizado por Korman *et al.* (2012) demonstrou-se que o *Mhf* leva a uma resposta de fase aguda em gatos infectados. Embora as proteínas de fase aguda sejam indicadores não-específicos de inflamação e infecção, a sua medição pode facilitar a diferenciação entre infecção aguda/clínica da crónica/subclínica.

### 1.3.4 Fase de portador

Os animais que recuperam da infecção aguda permanecem cronicamente infectados durante meses a anos ou até mesmo durante toda a sua vida. Os gatos portadores aparentam ser clinicamente saudáveis (Messick & Harvey, 2012) no entanto esta bactéria pode causar doença quando o animal é submetido a situações de stress ou está imunodeprimido (Sykes, 2010; Bernstein, 2011; Messick & Harvey, 2012).

## 1.4 Sinais clínicos

O *Mycoplasma haemofelis* é o agente infeccioso da anemia infecciosa felina, que se caracteriza pelo aparecimento de sinais clínicos como letargia, anorexia e febre (Willi *et al.*, 2010; Thrall *et al.*, 2012) bem como mucosas pálidas, inapetência (Lappin, 2011), perda de peso e desidratação (Harvey, 2012). Ocasionalmente, os animais podem também apresentar esplenomegália, icterícia (Lappin, 2011; Thrall *et al.*, 2012) e linfadenomegália (Hicks *et al.*, 2015). Este agente infeccioso provoca anemia hemolítica



Figura 3 - Mucosas pálidas num gato anémico infectado por *Mhf* (adaptado de Tasker, 2010a).

aguda, podendo por vezes ser fatal (Bernstein, 2011). A anemia é regenerativa a menos que exista outra doença relacionada, como FeLV, que possa inibir a eritropoiese (Thrall *et al.*, 2012). O FeLV tem tropismo para as células hematopoiéticas linfóides e de estroma da medula óssea, inibindo a eritropoiese, sendo nestes casos a anemia não regenerativa (Grimes & Fry, 2014).

A existência de doenças concomitantes, imunossupressão ou animais previamente esplenectomizados podem predispor os animais a infecção aguda (Thrall *et al.*, 2012).

### **1.5 Factores de risco**

São factores de risco de infecção de anemia infecciosa felina: a idade, o género, o habitat, a infecção pré-existente por FIV e/ou FeLV e a infecção simultânea de diferentes espécies de micoplasma (Sykes, 2010).

A anemia infecciosa felina pode ocorrer em gatos de todas as idades. Estudos realizados apresentam resultados contraditórios, nuns os animais mais jovens aparentam ser os mais prováveis de apresentar a doença clínica mas noutros observou-se uma elevada incidência em gatos adultos do sexo masculino. Tais resultados são justificados pelo seu estilo de vida, com acesso ao exterior e comportamentos de luta o que aumenta a sua exposição a animais infectados (Harvey, 2012).

A infecção concomitante por FIV e/ou FeLV como factor de risco ainda é controversa. Em alguns estudos foram observadas alterações significativas nos sinais clínicos enquanto noutros não influenciou o estado clínico do animal (Sykes, 2010).

### **1.6 Diagnóstico**

São vários os métodos que podem ser utilizados para se chegar ao diagnóstico de micoplasmose sendo um deles a observação citológica de esfregaços sanguíneos (Santos *et al.*, 2014). Ao exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Romanowsky observam-se pequenos cocos ou estruturas em forma anel ou de bastonete na superfície dos eritrócitos. Os organismos coram de roxo a azulado com a coloração Wright-Giemsa (Neimark *et al.*, 2001).

Apesar das bactérias poderem ser visíveis num esfregaço sanguíneo e observadas ao microscópio, ainda que por um curto período de tempo durante o pico da parasitemia, este

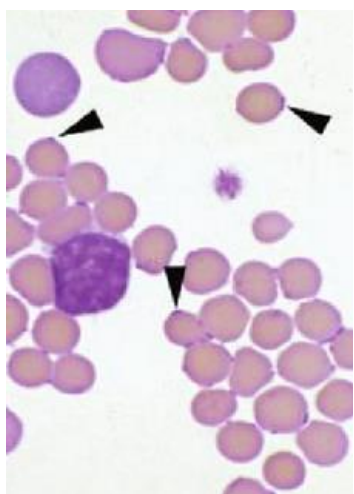


Figura 4 – Esfregaço de sangue de um gato anémico infectado por *Mhf* (destacados pelas setas) (adaptado de Thrall *et al.*, 2012).

método tem baixa sensibilidade. Segundo Tasker (2006) a ausência das bactérias na superfície dos eritrócitos não exclui a possibilidade de diagnóstico positivo de micoplasmose e possui especificidade variável não sendo o exame de diagnóstico de eleição (Santos *et al.*, 2014). No estudo de Nibblett *et al.* (2010) foram avaliados quanto à presença de *Mhf* e *CMhm*, 58 animais de um abrigo e 57 animais com dono, todos eles saudáveis. Foi observada a presença de micoplasmas hemotrópicos em apenas 11% dos animais infectados que foram diagnosticados por PCR de sangue periférico.

O método de diagnóstico de eleição é o RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) que quando executado adequadamente este teste é extremamente sensível e específico

permitindo distinguir as diferentes espécies de micoplasmas, bem como quantificar a percentagem de ácido desoxirribonucleico (ADN) de micoplasma presente nas amostras sanguíneas, auxiliando na determinação a gravidade da infecção e permitindo monitorizar a resposta ao tratamento (Ishak *et al.*, 2008).

Os gatos que apresentem PCR negativos podem vir a apresentar PCR positivos após o término do tratamento com antibiótico. Assim, um só PCR negativo não é o suficiente para afirmar que o paciente já não se encontra parasitado sendo portanto aconselhada a análise de três amostras colhidas mensalmente. Com a obtenção de vários PCR sequenciais negativos aumenta também a probabilidade de que a eliminação tenha ocorrido (Tasker, 2013). No entanto, Novacco *et al.* (2011) realizaram um estudo com 10 gatos experimentalmente infectados por *CMt* e aparentemente já sem infecção, pretendendo assim induzir a reactivação da infecção em animais na fase crónica da doença após imunossupressão, bem como verificar se existe sequestro tecidual.

Os animais foram agrupados em dois grupos (grupo 1 e 2) de cinco gatos cada e testados tendo-se verificado a existência de um animal PCR positivo no grupo 1. Todos os animais pertencentes a este grupo receberam uma dose elevada de metilprednisolona visando a imunossupressão, enquanto os do grupo 2 serviram de controlo. Após a administração foram recolhidas amostras de sangue e tecido tendo sido as mesmas testadas. Uma amostra

sanguínea e três amostras teciduais eram PCR positivo constatando-se assim a dificuldade em se avaliar se o animal se encontra totalmente livre de infecção ou não.

Outras técnicas laboratoriais como o Western blot e citometria de fluxo também podem ser utilizadas no diagnóstico de micoplasmose. Em 2013, Sánchez-Pérez *et al.*, descreveram um método de citometria de fluxo baseado na utilização de DRAQ5, um corante sintético (antrociclina) que atravessa as membranas celulares ligando-se aos ácidos nucleicos permitindo o diagnóstico das infecções por micoplasmas hemotrópicos bem como a quantificação da percentagem de eritrócitos parasitados. No entanto este método requer equipamentos específicos ainda pouco acessíveis.

Alternativamente a estes testes directos existem outros meios complementares de diagnóstico que podem auxiliar o Médico Veterinário no diagnóstico de micoplasmose felina sendo estes: hemograma completo, perfil bioquímico e teste de Coomb's descritos no item relativo aos achados laboratoriais (Norsworthy *et al.*, 2011).

## 1.7 Modo de transmissão

Quanto ao modo de transmissão pensa-se que os vectores artrópodes estejam relacionados com a transmissão já tendo sido detectado ADN de *Mhf* em *Ctenocephalides felis*, pulga do gato, como também nas suas fezes. No entanto, apesar de ser considerada por muitos como o principal modo de transmissão da doença, experimentalmente, só se conseguiu infectar um gato sendo que a infecção foi transiente, não apresentando o animal alterações clinicas nem hematológicas (Lappin, 2011).

Também experimentalmente constatou-se que o *Mhf* pode ser transmitido através da ingestão de sangue infectado ou da injeção subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa do mesmo. Assim, e uma vez que o ADN de hemoplasmas foi amplificado de bocas, amígdalas e glândulas salivares de gatos a transmissão por mordedura foi colocada como uma hipótese (Lappin, 2011).

Esta bactéria pode também ter uma transmissão vertical entre mães com infecção clinica e os recém-nascidos ou fetos. A transmissão pode ocorrer por via intrauterina, durante o parto ou na amamentação (Lappin, 2011).

O *Mhf* pode ser também transmitido iatrogenicamente através da transfusão sanguínea de sangue proveniente de gatos portadores assintomáticos (Willi *et al.*, 2010).

## 1.8 Achados laboratoriais

A micoplasmose felina provoca alterações tanto hematológicas como bioquímicas que muitas vezes ajudam a orientar o diagnóstico. No que diz respeito ao hematócrito (Ht) este encontra-se usualmente abaixo dos 20%, (Geffen, 2010) podendo estar abaixo dos 10% antes dos sinais clínicos serem evidentes para o proprietário. Se o Ht diminuir rapidamente (menos de 4 dias até a avaliação) o VCM pode estar dentro do intervalo de referência com poucos reticulócitos presentes. Contudo, quando os sinais clínicos são evidentes, o animal apresenta sinais de anemia regenerativa com policromasia e reticulocitose. Os eritrócitos são normalmente macrocíticos com um VCM superior a 50 fl (Messick & Harvey, 2012) e frequentemente hipocrômicos, com uma concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) inferior a 31g/dL. Relativamente ao RDW (*Red Blood Cell Distribution Width* – distribuição do tamanho dos eritrócitos) é o índice que avalia a heterogeneidade dos eritrócitos, através da medição da variação no seu tamanho (Calliari *et al.*, 2014) sendo que valores altos indicam heterogeneidade volumétrica ou anisocitose (Silva, 2013).

Nos gatos portadores assintomáticos o hematócrito varia ao longo do tempo, podendo estar normal ou leve a moderadamente diminuído mas não abaixo dos 20%. Pode-se observar uma ligeira reticulocitose com policromasia e um aumento do VCM (Messick & Harvey, 2012).

A contagem total e diferencial de leucócitos é bastante variável e de pouco auxílio no diagnóstico, no entanto, um aumento da reactividade dos monócitos pode ser observada. Quanto à contagem plaquetária os valores encontram-se, usualmente, dentro do intervalo de referência (Messick & Harvey, 2012).

A concentração de bilirrubina pode estar aumentada, devido a hemólise, (Geffen, 2010; Norsworthy *et al.*, 2011) mas tal nem sempre se verifica provavelmente devido ao facto dos eritrócitos poderem ser sequestrados nos capilares e espaços vasculares dentro do baço, sem serem destruídos. A concentração de proteínas plasmáticas estão normalmente dentro do intervalo de referência (6-8g/dL) mas podem estar aumentadas (Messick & Harvey, 2012) devido a uma resposta de fase aguda ou a desidratação (Tasker, 2012). A alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato transaminase (AST) estão normalmente um pouco aumentadas (Geffen, 2010). Este aumento pode ser atribuído à hipóxia hepática secundária a anemia ou à lipidose hepática secundária a anorexia (Messick & Harvey, 2012). A concentração de ureia pode estar leve a moderadamente aumentada. Acredita-se que seja uma uremia pré-renal, secundária a desidratação, sem aumento da concentração de creatinina. Os

gatos em estadios terminais podem apresentar hipoglicemia devido não só à anorexia bem como ao consumo de glucose por parte das bactérias (Messick & Harvey, 2012).

Em estudos anteriores constatou-se que um mecanismo imunológico pode estar envolvido na apoptose dos eritrócitos, apresentando os animais teste de Coomb's positivo, indicando a presença de anticorpos ligados aos eritrócitos (Petters *et al.*, 2010). Este teste, apesar de não ser específico nem sensível, é normalmente positivo em animais com micoplasmose. Uma vez que a anemia hemolítica imunomediada primária é rara em gatos um teste positivo significa que é provável que seja micoplasmose ou outra doença que afecte os antígenos de superfície dos eritrócitos (ex: FeLV) (Norsworthy *et al.*, 2011).

Segundo Norsworthy *et al.* (2011) todos os gatos suspeitos ou confirmados para micoplasmose deveriam ser testados também para infecções por retrovírus. Nos anos 80 foi descrito que cerca de metade dos gatos com micoplasmose clínica eram FeLV positivos. O número é bastante menor actualmente uma vez que esta doença está mais controlada graças a prevenção através de diagnóstico precoce e vacinação.

## **1.9 Tratamento**

### **1.9.1 Antibioterapia**

No tratamento da micoplasmose felina são utilizados antibióticos. O facto de não possuir parede celular torna o *Mhf* resistente aos antibióticos cuja acção é destruir a parede celular ou a sua síntese como por exemplo, os beta-lactâmicos; sendo no entanto, sensível aos que interferem com a síntese de proteínas e ácidos nucleicos como tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, lincosamidas, cetolídeos, aminoglicosídeos, cefalosporinas e pleuromutilinas (Strait & Madsen, 2013). Apesar de melhorarem os sinais clínicos e de diminuir o número de bactérias, a eliminação completa da infecção ainda não foi alcançada com nenhum protocolo de tratamento (Geffen, 2010; Tasker, 2012).

Os derivados das tetraciclinas são os antibióticos mais comumente utilizados sendo a doxiciclina na dosagem de 10mg/kg q24h *per os* (PO), a escolha de eleição (Tasker, 2012; Tasker, 2013). Alguns autores recomendam uma duração de tratamento de 8 semanas, de modo a aumentar a probabilidade de eliminação do agente infeccioso (Tasker, 2012). Uma vez que algumas formulações de doxiciclina foram associadas com o desenvolvimento de esofagite e estrituras esofágicas encontra-se recomendada a administração de água ou comida após a administração do medicamento de modo a garantir a sua passagem completa para o



estômago (Tasker, 2012). As fluoroquinolonas também podem ser utilizadas: enrofloxacin (5mg/kg dia PO). No entanto, não é um antibiótico de primeira escolha uma vez que em estudos realizados observou-se degeneração difusa da retina e cegueira aguda após o tratamento com doses superiores à referida anteriormente (Maggs *et al.*, 2008).

Num estudo realizado por Ishak, *et al.*, (2008) foram tratados 6 gatos com marbofloxacin (dose de 2,75 mg/kg q24H PO) durante 14 dias. Os animais que após 7 dias de tratamento ainda eram PCR positivo foram tratados 28 dias. A administração deste antibiótico melhorou os parâmetros hematológicos não tendo sido reportados quaisquer efeitos secundários, sendo de considerar a sua administração em animais anémicos infectados. Noutro estudo observou-se melhores resultados de eliminação a longo prazo com pradofloxacin, numa dose de 5 mg/kg q24h, durante 2 semanas (Geffen, 2010).

Infelizmente ainda não existe um tratamento descrito que elimine sempre este agente infeccioso. Apesar destas terapias efectivamente tratarem a doença clínica na maioria dos casos elas nem sempre levam a resultados de PCR negativos (Geffen, 2010).

### **1.9.2 Corticoesteróides**

A sua importância no tratamento ainda não foi comprovada sendo que num estudo verificou-se que podem inclusivamente agravar a infecção (Tasker, 2012). Deste modo, estão unicamente indicados devido à natureza imunomediada da anemia devendo ser administrada prednisolona 2 a 4 mg/kg cada 24h PO principalmente quando existe uma resposta inadequada aos antibióticos (Tasker, 2013), devendo a dose ser diminuída à medida que o hematócrito vai aumentando (Messick & Harvey, 2012).

### **1.9.3 Tratamento de suporte**

Pode ser necessário tratamento de suporte caso a anemia seja muito severa, incluindo a correcção da desidratação com fluidoterapia e/ou transfusões sanguíneas (Geffen, 2010; Tasker, 2013), bem como a administração de oxiglobina, hemoglobina transportadora de oxigénio (Tasker, 2012). É também importante o suporte nutricional em animais com hiporexia/anorexia (Tasker, 2012).

## **1.10 Risco zoonótico**

As infecções por determinada espécie de micoplasma são normalmente específicas dentro de cada espécie (Bernstein, 2011). No entanto, foram observados, recorrendo a citologia sanguínea, em pacientes humanos imunodeprimidos, micoplasmas semelhantes aos que infectam os gatos bem como com os que infectam os cães. Por todo o mundo, têm sido encontradas várias espécies de hemoplasmas em pessoas que convivem directamente com animais como é o caso de uma Médica Veterinária, no Texas, bem como em trabalhadores de uma exploração de suínos, na China (Harvey & Messick, 2012). Num estudo realizado nos Estados Unidos foi detectada uma prevalência de 4,7% pessoas infectadas por espécies semelhantes a micoplasmas hemotrópicos (principalmente *Mycoplasma ovis*), tendo sido o estudo realizado em pessoas com elevada exposição a artrópodes bem como com contacto regular com animais, como veterinários e auxiliares (Maggi, 2013). Pela existência destes casos, recomenda-se cuidado no contacto directo com animais infectados com micoplasmose (Harvey & Messick, 2012).

## **1.11 Objectivos**

Este estudo tem como objectivo geral investigar, num grupo de animais com suspeita clínica de infecção por *Mycoplasma haemofelis*, possíveis diferenças no perfil clínico, hematológico e bioquímico dos animais que se vieram a revelar infectados e não infectados pelo agente.

Como objectivos específicos pretende-se caracterizar hematológica e bioquimicamente gatos infectados por *Mycoplasma haemofelis* e ainda identificar possíveis factores de risco de transmissão da doença.

## **2. Materiais e métodos:**

### **2.1 Recolha de dados**

Todas as informações foram recolhidas acedendo à base de dados do hospital veterinário onde se encontram armazenadas as análises sanguíneas bem como bioquímicas utilizando também o programa Marvet onde é possível aceder aos dados e ficha clínica de todos os animais utilizados no estudo.

## **2.2 Animais em estudo**

Neste trabalho foram incluídos dois grupos de estudo: o primeiro com 46 animais, constituído por todos os gatos europeu comum que tivessem sido testados positivamente para *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf* (+)), através da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR), num período de dois anos e três meses (Fevereiro de 2012 até Maio de 2014), no hospital veterinário CASVET. O segundo grupo *Mhf* (-) é constituído por 20 gatos europeu comum, que se deslocaram ao Hospital Veterinário CASVET, no mesmo período indicado, e que foram testados por RT-PCR para se verificar a existência de infecção por *Mycoplasma haemofelis* tendo o resultado sido negativo. O hospital encontra-se localizado na Parede, Lisboa, Portugal. Foram excluídos 2 gatos por não serem europeu comum (persa e siamês).

## **2.3 Colheita sanguínea**

Para a colheita de sangue, utilizado para a realização de análises hematológicas e bioquímicas bem como para a análise de RT-PCR, foi retirado sangue da veia cefálica ou da femoral, consoante o temperamento do animal. Em animais dóceis utilizou-se a cefálica enquanto a femoral foi a preferida para os mais agressivos. O colar isabelino foi utilizado para auxiliar na contenção dos animais mais hostis. Nenhuma amostra foi retirada propositadamente para este estudo.

Foi colhido de cada gato cerca de 2,5 ml de sangue, tendo sido imediatamente colocado 1 ml num tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), devidamente identificado: data e nome do animal, sendo de seguida refrigerado a cerca de 5° C até ser enviado para o laboratório DNATech®. O restante sangue foi dividido entre um tubo de EDTA, para realização de hemograma, enquanto a outra parte foi colocada num tubo de Li Heparin e centrifugada para se recolher o soro necessário que foi colocado num tubo eppendorf para se proceder à realização de análises bioquímicas.

## **2.4 Análise de dados**

A análise foi classificada de acordo com: caracterização clínica dos animais (género, estado reprodutivo, idade, habitat, infecção por FIV/FeLV, sinais clínicos, doenças concomitantes e crónicas existentes), caracterização hematológica (eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e plaquetas), e

caracterização bioquímica (ureia, creatinina, albumina, proteínas totais, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, bilirrubina total e glucose). Quando se observaram amostras com anemia, esta foi caracterizada recorrendo a parâmetros, tais como volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e distribuição do tamanho dos eritrócitos. Procedeu-se também à classificação do grau de anemia, segundo Nilkumhang, 2007 (“Anemia in cats”) em leve (20-28%), moderada (14-19%), grave (10-13%) e muito grave (<10%) e relação entre a presença de anemia e infecção por FIV/FeLV.

Os grupos etários considerados neste trabalho foram definidos segundo as linhas de orientação do *International Cat Care* (Vogt *et al.*, 2010) sendo os seguintes: 0-6 meses (gatinhos), 6 meses aos 2 anos (júnior), 3 aos 6 anos (jovem adulto), 7 aos 10 anos (adulto), 11 aos 14 anos (sénior) e dos animais com idade superior a 15 anos (geriátrico).

Relativamente ao alojamento do animal consideraram-se animais sem acesso ao exterior (de interior) e com acesso ao exterior (animais de interior com acesso ao exterior e gatos exclusivamente de exterior).

Quanto à análise das doenças concomitantes uma das variáveis consideradas foi o facto de o animal ter história de trauma recente. Foram consideradas todas as situações ocorridas até cerca de um mês antes do diagnóstico.

A análise hematológica e bioquímica sérica teve em conta os valores de referência pré-definidos na máquina de hemograma e bioquímica sérica sendo os mesmos referidos seguidamente na tabela 2 e 3 respectivamente. O equipamento de hemograma utilizado não permite diferenciar os vários tipos de granulócitos estando por isso incluídos os neutrófilos, eosinófilos e basófilos no mesmo parâmetro (tabela 2).

**Tabela 2** – Intervalos de referência da análise hematológica

Análise Hematológica	Intervalo de Referência
Leucócitos	5,5-19,5 ( $10^9/l$ )
Linfócitos	0,8-7 ( $10^9/l$ )
Monócitos	0-1,9 ( $10^9/l$ )
Granulócitos	2,1-15 ( $10^9/l$ )
Eritrócitos	4,6-10 ( $10^{12}/l$ )
Concentração de hemoglobina	9,3-15,3 (g/dL)
Hematócrito	28-49 (%)
VCM	39-52 (fl)
HCM	13-21 (pg)
CHCM	30-38 (g/dL)
RDW	14-18 (%)
Plaquetas	100-514 ( $10^9/l$ )

**Tabela 3** – Intervalos de referência das análises bioquímicas

Análise Bioquímica	Intervalo de Referência
Ureia	13-33 (mg/dL)
Creatinina	0,9-1,9 (mg/dL)
Albumina	2,3-3,5 (g/dL)
ALT	0-105 (U/L)
FA	0-10 (U/L)
Bilirrubina Total	0-0,5 (mg/dL)
Glucose	61-103 (mg/dL)
Proteínas Totais	5,2-7,7 (mg/dL)

## 2.5 Análise Estatística

A análise dos resultados envolveu o recurso a métodos de estatística descritiva, tendo sido utilizado software Excel (para realização de tabelas e gráficos) e o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 21.0, no qual se criou uma base de dados e foi feito um output descritivo da amostra de estudo e de controlo. Nesse mesmo programa fez-se a descrição dos animais de acordo com as variáveis sexo, estado reprodutivo, idade, tipo de alojamento e infecção por FIV/FeLV, avaliou-se também o hemograma (leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, grau de

anemia, VCM, HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM, RDW, plaquetas) e as análises bioquímicas (ureia, creatinina, albumina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total, glucose e proteínas totais). Foi utilizado o teste de Chi quadrado e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o *p*-value (significância) encontrado era menor que 0,05 ( $< 0,05$ ).

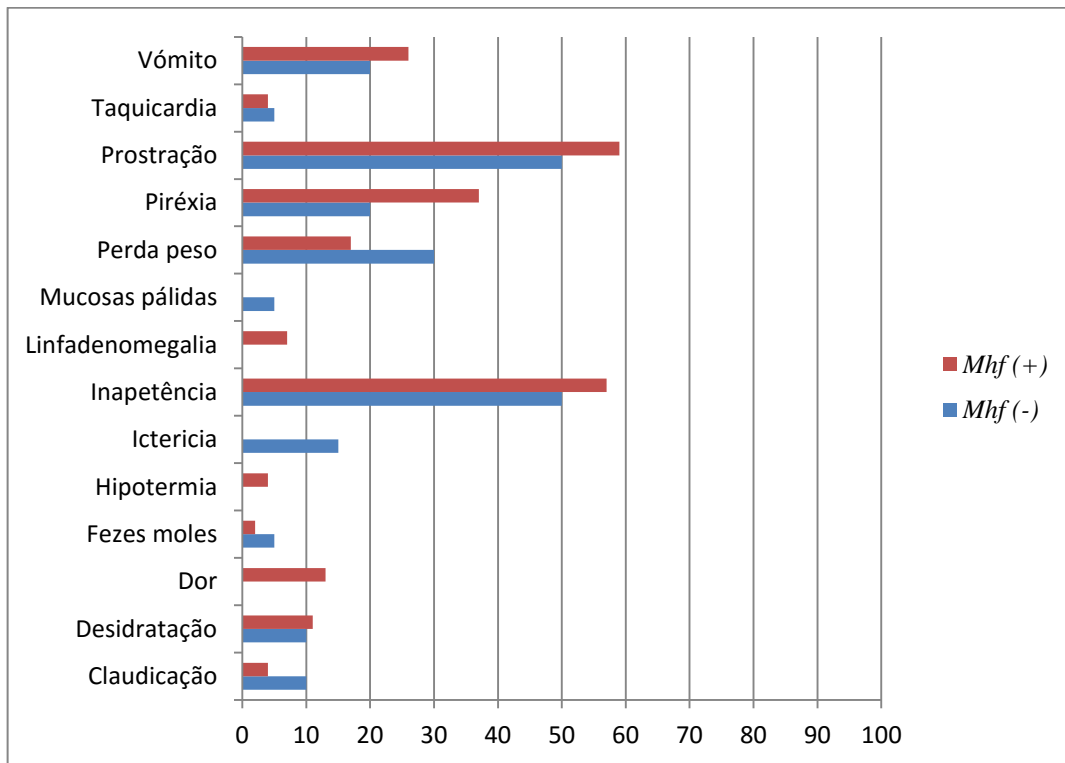
### 3. Resultados

No presente trabalho foram considerados pela análise de RT-PCR 46 animais positivos revelando infecção por *Mhf*, grupo *Mhf* (+), e 20 animais negativos não revelando infecção por *Mhf*, grupo *Mhf* (-). Dos animais pertencentes ao grupo *Mhf* (+), 36 gatos realizaram hemograma, 28 animais foram avaliados relativamente às concentrações de ureia, creatinina, albumina e ALT, 27 animais realizaram análise de proteínas totais, FA e glucose e 12 animais foram avaliados em relação à concentração sérica de bilirrubina total. No grupo *Mhf* (-) apenas 15 gatos realizaram hemograma, estando seguidamente descritas quais as análises bioquímicas efectuadas e frequências de gatos avaliados: ureia (10 animais); creatinina (10 animais); albumina (7 animais); proteínas totais (10 animais); bilirrubina total (2 animais); ALT (11 animais); FA (10 animais) e glucose (10 animais).

#### 3.1 Sinais Clínicos

Um achado muito importante encontrado neste estudo foi que em ambos os grupos apenas uma pequena percentagem dos animais, aproximadamente 5% dos gatos *Mhf* (-) e nenhum dos gatos *Mhf* (+) apresentavam mucosas pálidas. De igual modo, apenas aproximadamente 10% dos gatos *Mhf* (-) e novamente nenhum dos gatos *Mhf* (+) apresentava icterícia. Os sinais clínicos, provenientes da avaliação da anamnese e do exame objectivo dos gatos em estudo, que mais comumente levaram à pesquisa de *Mhf* foram prostração e inapetência, em aproximadamente metade dos casos em ambos os grupos. Seguindo a estes encontram-se o vômito, a piréxia e a perda de peso. A hipotermia e a taquicardia foram os sinais menos considerados como indicativos para pesquisa de *Mhf* (gráfico 2).

**Gráfico 2 – Sinais Clínicos que levaram à pesquisa de *Mhf***



### 3.2 Género, Estado Reprodutivo e acesso ao exterior

Relativamente ao sexo, estado reprodutivo e acesso ao exterior não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros avaliados nos gatos *Mhf*(+) quando comparados com gatos *Mhf*(-) (tabela 4).



**Tabela 4** – Relação entre as variáveis sexo, estado reprodutivo e acesso ao exterior e a infecção por *Mhf*

		<i>Mhf</i> (-)	<i>Mhf</i> (+)	<i>p</i> - value
Sexo	Fêmeas	7 35%	21 45,7%	0,421
	Machos	13 65%	25 54,3%	
Estado reprodutivo	Inteiro/não esterilizada	6 30%	15 32,6%	0,834
	Castrado/esterilizada	14 70%	31 67,4%	
Acesso ao exterior	Sem acesso ao exterior	14 70%	22 47,8%	0,096
	Com acesso ao exterior	6 30%	24 52,2%	

Em particular, dentro de cada grupo observou-se que no grupo *Mhf* (-) dos 13 machos 23,1% eram machos inteiros estando 76,9% castrados. Relativamente às fêmeas, das 7 existentes 42,9% eram fêmeas inteiras e 57,1% estavam esterilizadas. Quanto ao grupo *Mhf* (+) dos 25 machos incluídos neste grupo 36% eram inteiros estando os restantes 64% castrados. Quanto às 21 fêmeas 28,6% eram fêmeas inteiras e 71,4% estavam esterilizadas.

### 3.3 Idade

Não foi identificada qualquer relação estatisticamente significativa entre a idade e a infecção por *Mhf* quer pesquisando cada grupo etário individualmente (tabela 5) quer pesquisando com o critério animais com mais de sete anos e animais com menos de sete anos.

**Tabela 5** – Relação entre a idade e a infecção por *Mhf*

Faixa etária	<i>Mhf</i> (-)	<i>Mhf</i> (+)	<i>p</i> - value
0 - 6 meses	2 10%	8 17,4%	0,648
6 meses - 2 anos	7 35%	10 21,7%	
3 - 6 anos	6 30%	10 21,7%	
7 - 10 anos	4 20%	11 23,9%	
11 - 14 anos	1 5%	5 10,9%	
> 15 anos	0 0%	2 4,4%	

### 3.4 Infecção concomitante com FIV e/ou FeLV

Dos animais *Mhf*(+) 23 (50%) foram testados para a presença dos vírus FIV e FeLV, já nos animais *Mhf*(-) 15 (75%) animais foram testados. No presente estudo não se verificou diferença estatisticamente significativa entre a presença ou ausência de infecção pelos retrovírus FIV/FeLV e a infecção por *Mhf* (tabela 6).

**Tabela 6** – Relação entre a infecção pelos retrovírus FIV e/ou FeLV e a infecção por *Mhf*

FIV/FeLV	<i>Mhf</i> (-)	<i>Mhf</i> (+)	<i>p</i> - value
Negativo	13 86,6%	17 73,9%	0,744
FIV positivo	1 6,7%	2 8,7%	
FeLV positivo	1 6,7%	3 13,1%	
FIV/FeLV positivo	0 0%	1 4,3%	

### 3.5 Caracterização hematológica dos grupos *Mhf* (-) e *Mhf* (+)

Seguidamente pode observar-se a análise relativa aos parâmetros hematológicos, à caracterização da anemia e quanto à severidade da mesma (tabela 7, 8 e 9 respectivamente).

Neste trabalho é de salientar a baixa percentagem de animais anémicos encontrada no grupo *Mhf* (+), apenas 25% destes gatos apresentavam um hematócrito abaixo dos valores de referência. Ainda relativamente à análise dos hemogramas encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,000$ ) relativamente à contagem plaquetária. Um maior número de animais *Mhf* (+) apresenta trombocitopenia em comparação com os animais do grupo *Mhf* (-). Não se tendo verificado outras diferenças nos restantes parâmetros.

**Tabela 7** – Caracterização hematológica dos grupos *Mhf* (-) e *Mhf* (+)

	<i>Mhf</i> (-)			<i>Mhf</i> (+)			<i>p</i> – value
	Normal	Diminuído	Aumentado	Normal	Diminuído	Aumentado	
Eritrócitos	12 80%	2 13,3 %	1 6,7%	28 77,8%	5 13,9%	3 8,3%	0,977
Concentração de Hemoglobina	12 80%	3 20%	0 0%	25 69,4%	9 25%	2 5,6%	0,575
Hematócrito	12 80%	3 20%	0 0%	25 69,4%	9 25%	2 5,6%	0,575
Leucócitos	12 80%	1 6,7%	2 13,3%	25 69,4%	7 19,4%	4 11,1 %	0,52
Linfócitos	13 86,6%	1 6,7%	1 6,7%	34 94,4%	1 2,8%	1 2,8%	0,642
Monócitos	14 93,3%	0 0%	1 6,7%	35 97,2%	0 0%	1 2,8%	0,506
Granulócitos	12 80%	0 0%	3 20%	27 75%	4 11,1%	5 13,9%	0,377
Plaquetas	15 100%	0 0%	0 0%	17 47,2%	19 52,8%	0 0%	0,000

Quanto à caracterização da anemia foram avaliadas as variáveis VCM, HCM, CHCM e RDW dos 3 animais do grupo *Mhf* (-) e dos 9 gatos do grupo *Mhf* (+). Relativamente aos parâmetros que caracterizam a anemia não se verificaram quaisquer diferenças

estatisticamente significativas entre os grupos. O RDW estava aumentado em 2 (22,2%) animais sendo que apenas um apresentava macrocitose, indicativo de regeneração.

**Tabela 8** – Comparação entre os parâmetros que caracterizam a anemia e a infecção por *Mhf*

Caracterização da anemia	<i>Mhf</i> (-)			<i>Mhf</i> (+)			<i>p</i> - value
	Normal	Diminuído	Aumentado	Normal	Diminuído	Aumentado	
VCM	3 100%	0 0%	0 0%	5 55,6 %	0 0%	4 44,4%	0,157
HCM	3 100%	0 0%	0 0%	7 77,8%	0 0%	2 22,2%	0,371
CHCM	3 100%	0 0%	0 0%	8 88,9%	1 11,1%	0 0%	0,546
RDW	2 66,7%	0 0%	1 33,3%	7 77,8%	0 0%	2 22,2%	0,7

Pretendeu também verificar-se qual o grau de anemia encontrado nos dois grupos de animais tendo-se classificado a mesma em leve (20-28%), moderada (14-19%), grave (10-13%) e muito grave (<10%) (tabela 9). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os graus de anemia verificados em gatos *Mhf* (-) e gatos *Mhf* (+).

**Tabela 9** – Grau de anemia

Grau de Anemia	<i>Mhf</i> (-)	<i>Mhf</i> (+)	<i>p</i> - value
Leve	2 66,7%	4 44,5%	0,721
Moderada	0 0%	1 11,1%	
Grave	0 0%	2 22,2%	
Muito Grave	1 33,3%	2 22,2%	

### 3.6 Relação entre anemia e infecção por FIV e/ou FeLV

No que respeita à análise estatística relativa à relação entre a presença de anemia e de infecção por FIV/FeLV, 7 (77,8%) dos 9 animais anémicos no grupo *Mhf* (+) e todos os animais do grupo *Mhf* (-) foram testados para a presença destas retrovíroses (tabela 10). Não se encontraram quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

**Tabela 10** – Análise estatística da relação entre a presença de anemia e infecção por FIV e/ou FeLV

Relação entre anemia e a infecção por FIV e/ou FeLV	<i>Mhf</i> (-)	<i>Mhf</i> (+)	<i>p</i> – value
Ausência de infecção por FIV e/ou FeLV	2 66,7%	5 71,4%	0,88
Presença de infecção por FIV e/ou FeLV	1 33,3%	2 28,6%	

### 3.7 Caracterização bioquímica dos grupos *Mhf* (-) e *Mhf* (+)

Relativamente à análise bioquímica no soro dos animais, foi encontrada apenas uma diferença estatisticamente significativa no que diz respeito à concentração total de proteínas plasmáticas constatando-se a existência de hiperproteinemia nos animais *Mhf* (-) quando comparados com os animais *Mhf* (+) ( $p=0,027$ ). A análise estatística dos restantes parâmetros bioquímicos analisados não revelou diferenças significativas (tabela 11).

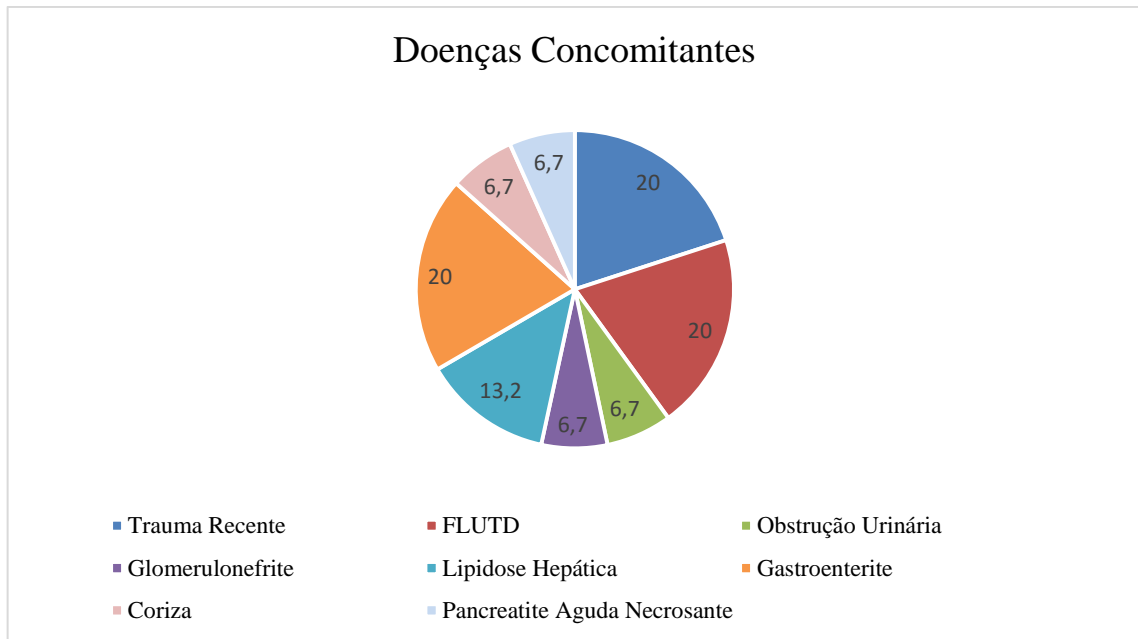
**Tabela 11** – Análise dos parâmetros de bioquímica sérica nos dois grupos

	<i>Mhf</i> (-)			<i>Mhf</i> (+)			<i>p</i> - value
	Normal	Diminuído	Aumentado	Normal	Diminuído	Aumentado	
Ureia	7 70%	1 10%	2 20%	14 50%	4 14,3%	10 35,7%	0,545
Creatinina	8 80%	1 10%	1 10%	18 64,3%	3 10,7%	7 25%	0,589
Albumina	5 71,4%	0 0%	2 28,6%	17 60,7%	11 39,3%	0 0%	0,600
Proteínas Totais	5 50%	0 0%	5 50%	23 85,2%	0 0%	4 14,8%	0,027
Bilirrubina Total	0 0%	0 0%	2 100%	3 25%	0 0%	9 75%	0,425
ALT	10 90,9%	0 0%	1 9,1%	17 60,7%	0 0%	11 39,3%	0,066
FA	9 90%	0 0%	1 10%	21 77,8%	0 0%	6 22,2%	0,399
Glucose	2 20%	0 0%	8 80%	7 25,9%	1 3,7%	19 70,4%	0,753

### 3.8 Presença de doenças concomitantes e crónicas

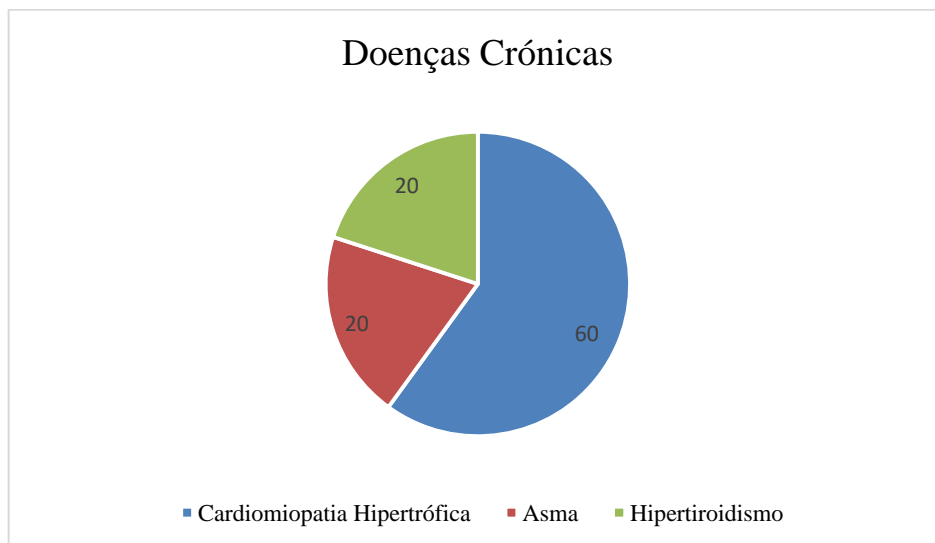
Dos animais *Mhf* (+) pelo menos 15 (32,6%) apresentavam doenças concomitantemente diagnosticadas sendo a mais frequentemente encontrada FLUTD (do inglês *Feline Lower Urinary Tract Disease*) onde se incluem a ITU e a obstrução urinária presentes em mais de 25% dos animais seguindo-se a gastroenterite (20%), lipidose hepática (13,2%) e menos frequentemente glomerulonefrite e pancreatite aguda necrosante (ambas 6,7%). Uma percentagem importante dos animais (20%) tinha história de trauma recente (gráfico 3).

**Gráfico 3** – Doenças concomitantes diagnosticadas nos animais pertencentes ao grupo *Mhf* (+)



Para além das doenças concomitantemente diagnosticadas, cerca de 11% dos animais *Mhf* (+) tinham história de doença crónica sendo que a maioria apresentava cardiomiopatia hipertrófica (60%), seguindo-se hipertiroidismo e asma (ambos presentes em 20% dos casos de doença crónica) (gráfico 4).

**Gráfico 4** – Doenças crónicas diagnosticadas nos animais pertencentes ao grupo *Mhf* (+)



#### 4. Discussão dos resultados

No presente trabalho constatou-se que os sinais clínicos prostração, inapetência e vômito foram os que levaram à pesquisa de *Mhf* mais comumente. Muitos dos animais nem haviam realizado hemograma não tendo sido assim, como seria de esperar, a anemia a razão principal para a requisição de pesquisa de *Mhf* como teste de diagnóstico. Deste modo, ao avaliar-se animais cuja indicação clínica para tal não aparenta ser muito forte pode pressupor-se que, uma vez que apenas 9 animais estavam anémicos, os restantes 27 gatos positivos na pesquisa de *Mhf* seriam portadores assintomáticos do agente.

No que diz respeito aos antecedentes individuais, no presente trabalho não foram encontradas diferenças entre o grupo de animais infectados e não infectados com *Mhf*. Quanto ao género e estado reprodutivo não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre o grupo de gatos positivos e negativos para *Mhf*. No entanto, tal como no estudo de Georges *et al.* (2012) verificou-se um maior número de machos infectados do que fêmeas. Também Nibblett *et al.* (2010), não encontraram resultados significativos entre a infecção e o sexo do animal bem como entre animais doentes e o estado reprodutivo. Relativamente à idade, não se verificou nenhuma diferença estatisticamente significativa pesquisando-se por faixas etárias nem por animais com menos e mais de 7 anos. Também Roura *et al.* (2010) e Spada *et al.* (2014), no seu estudo realizado em Espanha não observaram relação entre a idade e a infecção por *Mycoplasma haemofelis*. Quanto ao tipo de habitação do animal, tal como no estudo de Nibblett *et al.* (2010) não se encontrou uma relação estatisticamente significativa. Há que ter em conta que sendo um estudo retrospectivo não foi possível contactar com os donos podendo as informações especificadas na ficha clínica, relativamente ao acesso ao exterior, não serem as mais correctas. Quanto ao estado FIV/FeLV a percentagem de animais positivos para retrovíroses era superior nos animais infectados com *Mhf*. No entanto não se verificou relação estatisticamente significativa, tal como no estudo de Nibblett *et al.* (2010) e de Spada *et al.* (2014). É de salientar que a amostra utilizada é reduzida pois muitos animais não estavam testados sendo também importante referir que é possível que seja uma zona com baixa prevalência de infecções retrovirais onde muitos animais estão vacinados contra o FeLV. Dos animais positivos para micoplasmose quase 50% apresentavam uma ou mais doenças concomitantes. Tais resultados são sugestivos de que existe a possibilidade de alguns dos animais serem portadores assintomáticos da doença.

Os dados deste estudo mostraram que apenas 25% dos animais que realizaram análises hematológicas apresentaram resultados compatíveis com anemia. Tal não está de



acordo com a maioria da literatura. No entanto, em 2010, Tasker, *et al.* também não encontraram relação estatisticamente significativa entre a presença de infecção por *Mhf* e anemia, sendo que no estudo de Nibblett *et al.*, também em 2010, nenhum dos animais infectados apresentava anemia. Estes resultados díspares prendem-se certamente com o desenho heterogêneo de estudos encontrados na literatura sobre este tema. Tais resultados no presente estudo poderiam ser justificados pelo facto dos animais terem sido naturalmente infectados desconhecendo-se se estão numa fase aguda ou crónica da doença, ou até se são apenas portadores da mesma como parece ser o caso na grande maioria dos gatos. Avaliando apenas o grupo de animais que se apresentava com o hematócrito diminuído, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a presença anemia e o estado retroviral nos animais infectados com *Mhf*. Também não se constatou qualquer diferença estatisticamente significativa entre a presença destes retrovírus e a severidade da anemia. É importante referir que na bibliografia existem diversos valores relativos à classificação do grau de anemia, no entanto, os valores estabelecidos consideram hematócrito baixo para animais com valores inferiores a 28% tendo sido esse o valor foi considerado como limite máximo para se classificar o grau de anemia em leve. Segundo Sykes (2010) ainda não é consensual o impacto da infecção por FIV/FeLV nos animais infectados por *Mhf*. Mais estudos deveriam ser realizados para se tentar compreender melhor a importância destes vírus no estado clínico do animal sendo importante a avaliação nas fases aguda e crónica da doença. Através da análise dos parâmetros relativos à regeneração da anemia constatou-se que esta era macrocítica em 44,5% dos animais sendo normocítica nos restantes o que pode significar que ou não era regenerativa na maioria ou que ocorreu uma rápida diminuição do hematócrito estando este parâmetro normal por ainda existirem poucos reticulócitos em circulação (Messick & Harvey, 2012). O RDW também estava normal na maioria dos animais anémicos. É vital salientar que neste trabalho não houve acesso à contagem do número total de reticulócitos, considerada o único método fiável para determinar o carácter regenerativo da anemia em gatos. Não surpreendentemente, verificou-se que todos os animais tinham a concentração de hemoglobina dentro do intervalo de referência para a espécie. Pode colocar-se a hipótese de que a colheita sanguínea tenha sido realizada numa fase muito inicial da doença onde ainda não ocorreu uma resposta (Messick & Harvey, 2012).

Foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a presença de infecção por *Mhf* e de trombocitopenia. É importante referir que as plaquetas dos gatos se aglomeram rapidamente e os agregados podem diminuir falsamente este parâmetro (Thrall, 2012)

portanto para se concluir algo a partir destes resultados teria sido necessária a observação dos esfregaços sanguíneos para se poder afirmar se a trombocitopenia seria real ou não (algo que não foi realizado neste estudo). No entanto, sendo a diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *Mhf* (-) pode argumentar-se a favor de uma eventual acção pró-agregação plaquetária da presença de infecção por *Mhf*. Num estudo realizado por Rosendal, em 1981, inoculou-se uma estirpe de *Mycoplasma mycoides* em 3 bezerras, 9 cabras e 3 ovelhas tendo-se verificado um aumento na quantidade de fibrinogénio após a inoculação bem como uma descida acentuada na contagem plaquetária de um animal (ao 3º dia após inoculação). Observou-se também um aumento no tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial activada com o progresso da doença. Tais resultados são sugestivos de uma possível influência na coagulação.

Apesar da maioria dos gatos, neste estudo, infectados com *Mhf* terem um leucograma normal, alguns animais apresentavam leucopenia, também tendo sido encontrada leucocitose o que está de acordo com a literatura. No que diz respeito aos valores leucocitários não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Segundo Messick & Harvey (2012) a contagem total e diferencial de leucócitos é bastante variável.

Neste trabalho, o estudo global da bioquímica sérica de gatos infectados com *Mhf* não aparenta ser diferente daquele dos animais não infectados. No entanto, as proteínas plasmáticas totais estão significativamente mais elevadas nos animais do grupo não infectado o que vai de acordo com a literatura onde se refere que este valor está normalmente dentro do intervalo de referência em animais infectados por *Mhf* (Tasker, 2012). Este último achado pode ainda relacionar-se com o facto de embora relativamente à albumina não tenha sido encontrada uma relação estatisticamente significativa, quase metade da população infectada com *Mhf* apresentava valores abaixo do intervalo de referência. Sendo uma proteína de fase aguda negativa, como é referido por Martínez-Subiela *et al.* (2001) pode ser essa a razão de tantos animais apresentarem hipoalbuminémia. No entanto, no presente estudo 3 animais infectados apresentavam sintomas de gastroenterite e 1 foi diagnosticado com glomerulonefrite, causas de hipoalbuminémia, não se podendo afirmar que outros animais infectados por *Mhf* e com hipoalbuminémia não apresentassem doenças concomitantes não diagnosticadas.

Na análise da função renal, neste trabalho, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa, no entanto, notou-se que existiam mais animais infectados com valores normais e aumentados de ureia. Segundo Messick & Harvey (2012) este parâmetro

bioquímico pode estar leve a moderadamente aumentado sendo uma urémia pré-renal secundária a desidratação, estando assim estes resultados de acordo com o referido na literatura. O seu aumento também se pode dever a obstrução uretral (Thompson, 2007) doença que acometia um animal do grupo em estudo. Quanto à creatinina não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, encontrando-se a mesma normal na maioria dos animais o que está de acordo com Messick & Harvey (2012) que referem que este parâmetro costuma estar normal em animais infectados por *Mhf*. Seria necessária a realização de métodos de diagnóstico complementares para se verificar quais as causas de aumento e diminuição da mesma nos animais em que esta ocorreu.

No que concerne eventuais diferenças a nível da função hepática à avaliação de dano hepatocelular através da ALT, não se constatou nenhuma relação estatisticamente significativa, no entanto os animais infectados com *Mhf* apresentavam maioritariamente valores normais ou aumentados, tal como consta na literatura onde Geffen (2010), refere que a mesma está normalmente aumentada devido a hipóxia hepática secundária a anemia ou a lipidose hepática secundária a anorexia. Quanto à fosfatase alcalina não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa no entanto a mesma encontrava-se normal na maioria dos animais e aumentada em aproximadamente um quinto dos animais infectados com *Mhf*. Segundo Thompson (2007) a fosfatase alcalina pode estar aumentada em quase todas as doenças que afectem o fígado (como lipidose hepática, doença que acometia um dos animais infectados) podendo também estar aumentada devido a: hipertiroidismo e enterite, doenças encontradas em dois dos animais infectados. A maioria dos animais infectados com *Mhf* parecia apresentar hiperbilirrubinémia, no entanto as diferenças não foram estatisticamente significativas. Segundo Geffen (2010) e Norsworthy *et al.* (2011) este valor está habitualmente aumentado em animais com micoplasmose devido a hemólise no entanto poucos animais estavam anémicos. Para se constatar qual a verdadeira causa deste aumento teriam sido necessários mais exames de diagnóstico complementares.

Relativamente aos níveis de glicémia não foi encontrada uma relação estatisticamente significativa no entanto grande parte dos animais positivos apresentavam valores acima do intervalo de referência. No estudo de Tasker *et al.* (2009b) os animais apresentavam valores dentro de intervalo de referência e, segundo Morais (2011) a hiperglicemia pode ser devida a stress podendo assim supor-se que a hiperglicemia demonstrada pelos animais não tinha relação com a infecção por *Mhf* mas sim com stress causado pelo manuseamento e contenção aquando da colheita sanguínea.

É importante referir que a pesquisa de *Mhf* foi baseada essencialmente na sintomatologia do animal, principalmente em sinais como prostração, inapetência e vômito, que são observados em inúmeras doenças para além da micoplasmose, podendo ser essa a causa de não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas na maioria dos parâmetros avaliados. A realização de PCR deverá ser mais ponderada e baseada em exames de diagnóstico complementares, como análises hematológicas que evidenciem anemia, uma vez que, em Portugal, tem se verificado uma elevada prevalência de gatos portadores assintomáticos.

## 5. Conclusão

A concretização deste trabalho de mestrado teve como objectivo investigar a presença de diferenças entre o perfil clínico, hematológico e bioquímico de animais infectados e não infectados por *Mycoplasma haemofelis*.

Neste estudo, constatou-se que na grande maioria das variáveis não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. Não havia sequer uma percentagem significativa de animais *Mhf* (+) anémicos, supondo-se assim que, uma vez que o critério utilizado para a realização de PCR foi na maioria dos gatos, a sintomatologia clínica e não a analítica hematológica e bioquímica, grande parte dos animais seriam portadores assintomáticos, sendo a infecção por *Mycoplasma haemofelis* um achado ocasional e não a causa dos sintomas observados.

A micoplasmose por *Mhf* é uma doença com elevada prevalência de animais portadores assintomáticos no nosso país e, uma vez que não existem sintomas patognomónicos para a mesma, antes de se testar um animal, há que ter em consideração os dados fornecidos pela analítica hematológica e bioquímica visando um correcto diagnóstico.

## 6. Bibliografia

Barker, E. N., Darby, A. C., Helps, C. R., Peters, I. R., Heesom, K. J., Arthur, C. J., *et al.* (2011). *Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium Mycoplasma haemofelis*. Acedido a 01-12-2014, em <http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/83>

Bernstein, M. (2011). *The merck veterinary manual*. Acedido a 03-12-2014, em [http://www.merckmanuals.com/vet/circulatory\\_system/blood\\_parasites/hemotropic\\_mycoplasmas.html?qt=hemotropic&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/vet/circulatory_system/blood_parasites/hemotropic_mycoplasmas.html?qt=hemotropic&alt=sh)

Calliari, C., Furtado, T. C., Santos, P. P., Silva, L., Regus, C. C., Pereira, K. S. S. & Allgayer, M. (2014). Estudo da correlação entre a amplitude de variação dos eritrócitos, volume corpuscular médio e a presença de anisocitose em esfregaço sanguíneo de cães e gatos. *Revista de educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*. V. 12, n. 2.

Casal, L. (2010). *Clinical presentation, hematology, biochemistry of neonates*. Comunicação apresentada no 35<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress, Geneva, Suíça.

Couto, C. G. (2005). *Pediatric Hematology*. Comunicação apresentada no 30<sup>th</sup> Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Cidade do México, México.

García-Leal, M.L., Brandão, P.E., Hagiwara, M.K. & Lucas, S.R.R. (2009). *Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) for Mycoplasma haemofelis detection in a cat, using whole blood without DNA extraction*. Comunicação apresentada no 34<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress, São Paulo, Brasil.

Geffen, C.V. (2010). *Haemolytic Anemia in Cats*. Comunicação apresentada na European Veterinary Conference Voorjaarsdagen, Amesterdão, Holanda.

Georges, K., Ezeokoli, C., Auguste, T., Seepersad, N., Pottinger, A., Sparagano, O. & Tasker, S., (2012). A comparison of real-time PCR and reverse line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. *Veterinary Research*, 8:103.

Grace, S.F. & Norsworthy G.D., (2011). Hemoplasmosis. In Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. *The Feline Patient* (4ª edição, pp 218-219). Wiley- Blackwell.

Grimes, C.N. & Fry, M.M., (2014). Nonregenerative Anemia: Mechanisms of Decreased or Ineffective Erythropoiesis. *Veterinary Pathology Online* First. Acedido a 27-05-2015 em <http://vet.sagepub.com/content/early/2014/05/06/0300985814529315.full.pdf+html> published on May 7, 2014

Guimarães, A.M.S., Santos, A.P., Nascimento, N.C., Timenetsky & Messick, J.B., (2014). Comparative Genomics and Phylogenomics of Hemotrophic Mycoplasmas. *PLoS ONE* 9(3): e91445. Acedido a 03-01-2015 em <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091445>.

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.

Hagiwara, M. K. (2009). *Anemia in cats: is it Mycoplasma?* Comunicação apresentada no 34<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress, São Paulo, Brasil.

Harvey, J. W. (2012). *Infections of dog and cat blood cells*. Comunicação apresentada no ACVP Annual Meeting, Washington, USA.

Hicks, C. A. E., Willi, B., Riond, B., Novacco, M., Meli, M. L., Stokes, C. R., *et al.* (2015). Protective Immunity against Infection with *Mycoplasma haemofelis*. *Clin Vaccine Immunol*, 22:108 –118.

Ishak, A. M., Dowers, K. L., Cavanaugh, M.T., Powell C.C., Hawley, J.R., Radecki, S.V., Lappin, M.R., (2008). Marbofloxacin for the treatment of experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 288-292.

Korman, R.M., Cerón, J.J., Knowles, T.G., Barker, E.N., Eckersall, P.D. & Tasker, S., (2012). Acute phase response to *Mycoplasma haemofelis* and ‘Candidatus *Mycoplasma haemominutum*’ infection in FIV-infected and non-FIV-infected cats. *The Veterinary Journal* 193, 433–438.

Lappin, M.R., 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.

Lappin, M. R. (2011). *Flea-associated diseases in the cat: update on the diagnosis and treatment of haemoplasmas and rickettsia spp.* Comunicação apresentada no 36<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress, Jeju, Coreia.

Lappin, M. R., (2012). *Treatment of common flea borne infections in dogs and cats.* Comunicação apresentada na Latin American Veterinary Conference, Lima Peru.

Lourenço, M. L. G., Moutinho, F. Q., Ferreira, H., Takahira, R. K., Balieira, J. C. C., Machado, L. P. & Fontequ, J. H. (2009). *Hematological and biochemical profile and serum proteinogram in neonate cats.* Comunicação apresentada no 34<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress, São Paulo, Brasil.

Maggi, R.G., Compton, S.M., Trull, C.L., Mascarelli, P.E., Mozayeni, B.R., Breitschwerdt E.B., (2013). Infection with Hemotropic *Mycoplasma* Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *Journal of Clinical Microbiology* p. 3237–3241 V. 51 No. 10.

Maggs, D.J., Miller, P.E. & Ofri, R., (2008). *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* (4<sup>a</sup> edição, pp. 43). Elsevier



- Maher, I. E., Tasker, S., Polizopoulou, Z., Dasopoulou, A., Egan, K., Helps, C.R. & Papasouliotis, K., (2010). Polymerase chain reaction survey of feline haemoplasma infections in Greece. *Journal of feline medicine and surgery*, 12(8):601-5.
- Martínez-Díaz, S. F., Silvestre-Ferreira, A. C., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O. & Altet, L., (2013). Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *Journal of feline medicine and surgery*, 0(0), 1-7.
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M.D. & Cerón, J.J., (2001). Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en Medicina Veterinaria. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 17: 97-114.
- Merril, L. (2012). Red blood cell disorders. In: *Small Animal Internal Medicine for Veterinary Technicians and Nurses*, (1ª edição, pp. 163 a 172) Wiley-blackwell.
- Messick, J. B. & Santos, A. P., (2011). Identification, Bioinformatics Analyses, and Expression of Immunoreactive Antigens of *Mycoplasma haemofelis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 1275–1281 Vol. 18, No. 8.
- Messick, J. B. & Harvey, J. W. (2012). Hemotropic Mycoplasmoses (Hemobartonellosis). In Greene, C. E., *Infectious diseases of the dog and cat* (4ª edição, pp. 310-319). Elsevier.
- Messick, J. B., (2012). *Have the hemoplasmas evolved toward a “benign” coexistence with their host?* Comunicação apresentada no 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists, Seattle, Washington, USA.
- Mills, J., (2012). Anemia. In Michael, J. D. & Kohn, B., *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine* (2ª edição, pp. 31-40).
- Morais, H.A., (2011). *Cats are not dogs on emergency*. Comunicação apresentada no Congresso Ecuatoriano de Especialidades Veterinárias, Quito, Equador.
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y. & Tully, J. G. (2001). 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*, 51, 891–899.

Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y. & Tully, J. G. (2002). Revision of haemotropic Mycoplasma species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 683.

Neves, A. C. (2013). *Prevalência de base hospitalar de Mycoplasma haemofelis tendo por base um hospital veterinário na cova da piedade – Almada*. Acedido a 05-09-2014 em <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/5347/Preval%C3%Aancia%20de%20Mhf.pdf?sequence=1>

Nibblett, B.M.D., Waldner, C., Taylor, S.M., Jackson, M.L., Knorr, L.M. & Snead, E.C., (2010). Hemotropic mycoplasma prevalence in shelter and client-owned cats in Saskatchewan and a comparison of polymerase chain reaction (PCR) — Results from two independent laboratories. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 74(2): 91–96.

Nilkumhang, P., (2007). Anemia in cats. *Kasetsart Veterinarians*, vol. 17, No. 3.

Novacco, M., Boretti, F.S., Wolf-Jäckel, G., Riond, B., Meli, M.L., Willi, B., Lutz, H. & Hofmann-Lehmann, R., (2011). Chronic “Candidatus Mycoplasma turicensis” infection. *Veterinary Research*, 42:59.

Peters, I.R., Helps, C. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J. & Tasker, S., (2010). Antigen Specificity of the Humoral Immune Response to *Mycoplasma haemofelis* Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, p. 1238–1243 Vol. 17, No. 8.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. & Hartigan, P.J., (2011). Haemotropic mycoplasmas. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2ª edição. Wiley-blackwell.

Regus, C.C., Jesus, J.R., Silva, L. R., Santos, P.P., Argenta, F.F. & Fischer, C.D.B., (2012). Hemoplasmose felina – relato de caso. *Veterinária em Foco*, v.10 n.1 p.61-67.

- Rosendal, S., (1981). Experimental Infection of Goats, Sheep and Calves with the Large Colony Type of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Vet. Pathol.* 18: 71-81.
- Roura, X., Peters, I. R., Altet, L., Tabar, M. D., Barker, E. N., Planellas, M. *et al.* (2010). Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnose Investigation*, 270-274.
- Sánchez-Pérez, A., Brown, G., Malik, R., Assinder, S.J., Cantlon, K., Gotsis, C., Dunbar, S. & Fraser, S.T., (2013). Rapid detection of haemotropic mycoplasma infection of feline erythrocytes using a novel flow cytometric approach. *Parasites & Vectors*, 6:158.
- 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.
- Santos, A. P., Conrado, F. O., Messick, J. B., Biondo, A. W., Oliveira, S. T., Guimaraes, A. M. S., Nascimento, N. C., Pedralli, V., Lasta, C. S., Hilário, F. & González, D. (2014). Hemoplasma prevalence and hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations from Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* vol. 23, No. 4.
- Silva, P.H., (2013). *Amplitude de distribuição do diâmetro dos eritrócitos (RDW), volume corpuscular médio e reticulócitos em gato doméstico hígado (Felis catus – Linnaeus, 1758)*. Acedido a 4-12-2014, em [http://apeclx.unoeste.br/tede/tede\\_busca/arquivo.php?codArquivo=384](http://apeclx.unoeste.br/tede/tede_busca/arquivo.php?codArquivo=384).
- Spada, E., Proverbio, D., Galluzzo, P., Pepa, A.D., Giorgi, G.B., Perego, R. & Ferro, E. (2014). Prevalence of haemoplasma infections in stray cats in Northern Italy. *International Scholarly Research Notices Microbiology*. Acedido a 08-01-2015 em <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/298352/>.
- Strait, E. L. & Madsen, M. L. (2013). Mollicutes. In: McVey, D. S., Kennedy, M. & Chengappa, M.M. (Eds.), *Veterinary Microbiology* (3ª edição, pp 291). Wiley-blackwell.

Sykes, J. E. (2010). Feline Hemotropic Mycoplasmas. *Veterinary clinics of north america*, 40 (6), pp. 1157-1170.

Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W. (2012). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2ª edição. Wiley-blackwell. Acedido a 10-06-2014 em [https://books.google.pt/books?id=PjCanfyADvIC&pg=PT160&dq=Veterinary+hematology+and+clinical+chemistry+splenomegaly+mycoplasma&hl=pt-PT&sa=X&ei=yhMQVY-pM8r0UP\\_GgMgI&ved=0CB4Q6AEwAA#v=onepage&q=Veterinary%20hematology%20and%20clinical%20chemistry%20splenomegaly%20mycoplasma&f=false](https://books.google.pt/books?id=PjCanfyADvIC&pg=PT160&dq=Veterinary+hematology+and+clinical+chemistry+splenomegaly+mycoplasma&hl=pt-PT&sa=X&ei=yhMQVY-pM8r0UP_GgMgI&ved=0CB4Q6AEwAA#v=onepage&q=Veterinary%20hematology%20and%20clinical%20chemistry%20splenomegaly%20mycoplasma&f=false)

Tasker, S. (2006). *Feline haemoplasma infection (haemobartonella) – An Update*. Comunicação apresentada na North American Veterinary Conference, Ithaca, Nova Iorque.

Tasker, S., Peters, I. R., Day, M. J., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffyd-Jones, T. J., et al. (2009a). Distribution of Mycoplasma Haemofelis in blood and tissues following experimental infection. *Microbial Pathogenesis*, 47, 334-340.

Tasker, S., Peters, I.R., Papasouliotis, K., Cue, S.M., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T.J., Knowles, T.G., Day, M.J., Helps, C.R. (2009b) Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: Copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. *Veterinary Microbiology* 139, p. 323–332.

Tasker, S., (2010a). *Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats?* *Journal of feline medicine and surgery*, 12:369-381.

Tasker, S., Murray, J.K., Knowles, T.G. & Day, M.J., (2010b). Coombs', haemoplasma and retrovirus testing in feline anaemia. *Journal of Small Animal Practice*, 51, 192–199.

Tasker, S. (2012). Haemoplasmosis. In Michael, J. D. & Kohn, B. *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. 2ª edição. P. 67-72 Wiley Gloucester.

Tasker, S. (2013). Canine and Feline Hemotropic Mycoplasmosis. In Bonagura, J. D. & Twedt, D.C. *Kirk's Current Veterinary Therapy XV*. Elsevier. Acedido a 11-06-2014 em

<https://books.google.pt/books?id=KlJKAgAAQBAJ&pg=PP1&dq=Kirk%27s+Current+Veterinary+Therapy+XV&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CB4Q6AEwAGoVChMI2fq-3cbTyAIVirYUCh1TqAZB#v=onepage&q=Kirk's%20Current%20Veterinary%20Therapy%20XV&f=false>

Thompson, M.S., 2007. Laboratory values and interpretation of results. In M.S. Thompson, *Small animal medical differential diagnosis*. Pp.241 e 245. Elsevier. Missouri

Vogt, A.H., Rodan, I., Brown, M., Brown, S., Buffington, C. A., Forman, M. J., Neilson, J. & Sparkes, (2010). Feline life stages guidelines. *Journal of feline medicine and surgery*, 12, 43-54.

Willi, B., Novacco, M., Meli, M. L., Wolf-Jackel, G. A., Boretti, F. S., Wengi, N. *et al.* (2010). *Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe*. Comunicação apresentada no 35<sup>th</sup> World Small Animal Veterinary Congress, Geneva, Suíça.

Wolf-Jackel, G.A., Jackel, C., 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.