

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

Diagnóstico molecular e avaliação hematológica de micoplasmas hemotróficos em cães domésticos (*Canis familiaris*) nas áreas urbana e rural de Araguaína, Tocantins, Brasil

Camila Flávia Magalhães Botelho

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

Diagnóstico molecular e avaliação hematológica de micoplasmas hemotróficos em cães domésticos (*Canis familiaris*) nas áreas urbana e rural de Araguaína, Tocantins, Brasil

CAMILA FLÁVIA MAGALHÃES BOTELHO

Sob a Orientação da Professora
Cristiane Divan Baldani

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B748d Botelho, Camila Flávia Magalhães, 1989-
Diagnóstico molecular e avaliação hematológica
de micoplasmas hemotróficos em cães domésticos (*Canis
familiaris*) nas áreas urbana e rural de Araguaína,
Tocantins, Brasil / Camila Flávia Magalhães Botelho.
2017.
69 f.: il.

Orientadora: Cristiane Divan Baldani.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, 2017.

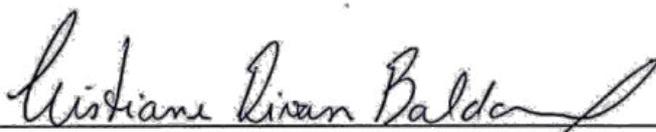
1. Micoplasmas hemotróficos. 2. Diagnóstico
molecular. 3. Hematologia. 4. Cães domésticos. 5.
Araguaína (Tocantins). I. Baldani, Cristiane Divan,
1978-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Pós-Graduação em Medicina Veterinária
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

CAMILA FLÁVIA MAGALHÃES BOTELHO

Dissertação submetida com requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

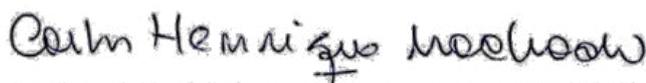
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/02/2017.



Cristiane Divan Baldani (Ph.D.) UFRRJ
(orientadora)



Aliné Moreira de Souza (Ph.D.) UFF



Carlos Henrique Machado (Ph.D.) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos animais, seres divinos e iluminados dispostos a ensinar tanto aos homens sobre valores de vida que, infelizmente, foram perdidos ao longo da sua “evolução”.

À Meg (*In memoriam*). Gratidão eterna!

A todos que, direta ou indiretamente, estiveram ao meu lado nessa longa e tortuosa caminhada até aqui.

*“Eu,
Prisioneiro meu
Descobri no breu
Uma constelação
Céus!
Conheci os céus
Pelos olhos seus
Veu de contemplação (...)
(...) Coisa pequenina
Centelha divina
Renasceu das cinzas
Onde foi ruína
Pássaro ferido
Hoje é paraíso
Luz da minha vida (...)”*

(Fênix - Jorge Vercillo/Flávio Venturini)

“Sua visão se tornará clara somente quando você puder olhar para o seu próprio coração. Quem olha para fora, sonha. Quem olha para dentro, desperta!” (Carl Gustav Jung)

“Só aquilo que somos realmente tem o poder de curar-nos.” (Carl Gustav Jung)

AGRADECIMENTOS

Ao Eterno, gratidão pela minha existência.

Aos meus pais, Marilena Pimenta Magalhães e Gilberto Garcia Botelho por me acolherem, permitindo que eu fizesse parte de sua família. Pelo apoio e incentivo em cada momento. Por sua dedicação, abnegação e amor incondicional, mesmo nos momentos “tempestuosos”.

À minha orientadora, professora Cristiane D. Baldani, por aceitar me guiar nessa jornada e, principalmente, por compreender, respeitar e me dar total apoio nos momentos conturbados e delicados ao longo desses 2 anos. Obrigada pelo incentivo e carinho tão importantes nessas horas e, claro, pelo aprendizado adquirido.

Ao professor Gilberto G. Botelho, que além de pai, exerceu o papel de educador durante meus 5 anos de graduação e 2 anos na pós-graduação. Foi (e é) essencial para a minha formação profissional e pessoal, um exemplo de dedicação à Docência, à pesquisa e integridade profissional. Sem sua ajuda, conselhos, paciência e “puxões de orelha”, nada disso seria possível. Admiração, respeito e meu muito obrigada ainda “é pouco”.

Ao professor Carlos Henrique Machado, por todos os momentos juntos desde a graduação. Por sua orientação no período em que fui monitora da disciplina de Patologia Clínica e pela parceria desenvolvida desde então. Pelos momentos de descontração e carinho com gestos singelos (incluindo os pães de mel com açúcar mascavo feitos especialmente para mim durante o curso da disciplina de Toxicologia rs). Por tantas vezes se fazer presente como um “segundo pai”. O respeito, o admiro e só posso lhe agradecer por tudo, especialmente pelo apoio e ensinamentos, e por aceitar o convite para participar da banca de defesa.

À Ágatha Ferreira, Aline Tonussi, Andresa Guimarães, Gleice Amaro, Juliana Macedo e Raísa Brul. Meninas, sem vocês nada disso teria se concretizado. Não encontro palavras suficientes para lhes agradecer por tudo. Por todos os momentos compartilhados, muito antes do meu início na pós-graduação, pela companhia ao longo das coletas (na sua maioria, exaustivas e com tantas dificuldades, mas que sempre terminavam com risadas), pela ajuda nas análises laboratoriais e toda a elaboração dessa dissertação. Vocês foram “peças” fundamentais para a realização de tudo. Os momentos de descontração ao final de dias tão cansativos foram ímpares, não me esquecerei de nenhum deles. Sempre dispostas a me auxiliar, seja durante a elaboração de seminários nas disciplinas que fizemos juntas (algumas “tensas”, não?!rs), seja nas correções de resumos e nesse trabalho final, pacientes e atenciosas, não importasse a situação. Todas as palavras e gestos de carinho foram primordiais para que eu esteja aqui, agora, escrevendo esse texto. Mais uma vez, dizer “muito obrigada” a vocês é muito pouco. “Girls”, obrigada e gratidão!

À professora Heloisa Justen M. de Souza, por “abrir meus olhos” para a medicina felina e pelos anos de orientação profissional, partilhando seus conhecimentos e amor pelos gatos de uma forma tão especial. Obrigada pelo aprendizado e por permitir que eu fizesse parte de sua equipe por 3 anos. Pela orientação durante a Iniciação Científica, compreensão e auxílio nos momentos de dificuldade, profissional e pessoal. Pelo carinho transmitido em simples gestos e “cuidados de mãe”. Obrigada por proporcionar meu crescimento profissional e pessoal.

À toda equipe da Estação de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz (Laboratório de Hemoparasitos e Vetores/UFRRJ), especialmente aos professores Carlos Luiz Massard e Huarrisson Azevedo Santos, por cederem gentilmente o espaço para a realização das análises moleculares e por todo o auxílio.

Aos técnicos Ananias da Costa e Antônio Carlos Valentim (“Manteiga”), pela descontração e auxílio nas práticas de rotina laboratorial, desde os tempos de monitoria na disciplina de Patologia Clínica.

À equipe do HVPA/UFRRJ, por possibilitar meu aprendizado clínico e, especialmente, à “Val”, “Deusa”, “Julinho” e Sr. Alício, pelos momentos de conforto.

Aos motoristas Alexandre Delgado e Marcos da Silva pela disponibilidade e transporte nas coletas realizadas pela nossa equipe.

Ao Sr. Ataíde Baptista (“seu Tatá”), por estar sempre sorrindo e nos alegrando, não importa o dia. Sempre solícito e disposto a ajudar (inclusive nos momentos “de sufoco” com a fechadura da porta do Instituto de Veterinária rs).

À Maria Lindalva (“tia Lindalva”) e Eduardo Pereira, da L.F. livros de veterinária, por todo apoio e carinho nesses 10 anos de convivência.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ (PPGMV). Aos professores, pelos ensinamentos e conhecimentos partilhados, à secretária Lorena Florêncio, pela disponibilidade, atenção e auxílio burocrático e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha irmã Flávia Magalhães e ao Dino Sérgio, por seu carinho e incentivos em todas as horas. Pelas brincadeiras e apoio, mesmo quando distantes fisicamente.

À minha irmã Cristiane Magalhães. É difícil expressar com palavras (e até mesmo com atitudes) o quanto sou grata por sua existência nessa minha vida. Ao longo desses 27 anos de convivência você foi muito mais do que “só minha irmã mais velha”, foi (e ainda é) minha “mãe”, amiga, instrutora e guia de luz. Mesmo já tendo pouco mais de uma década em que não temos mais o convívio diário “debaixo do mesmo teto”, sua presença emocional e etérica se faz constante em mim. Mais um exemplo de profissional que tive a oportunidade de me espelhar, mas, particularmente, um exemplo de ser humano em sua essência. Poder acompanhar e fazer parte das inúmeras mudanças pelas quais passou foi literalmente iniciático para mim. Mesmo nas “ausências”, te sinto ao meu lado e a forma que encontro de retribuir a tudo é somente uma: meu amor eterno a ti!

Ao Júlio César de O. Cruz (“eterno cunhado”), meu primeiro orientador profissional, sempre paciente e disposto a me ensinar a “arte de clinicar” quando eu ainda estava no primeiro período da graduação. Por ser o exemplo de um profissional extremamente dedicado e consciente do que é ser um médico veterinário, na sua essência. Observá-lo agir com amor incondicional aos animais e com compaixão (não só com esses seres, mas com todos) foi primordial para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por fazer parte da minha família e me guiar por tantos caminhos, descobertas iniciáticas e contribuir para o desenvolvimento do meu estilo de vida. Já passaram mais de 10 anos e espero que ainda tenhamos a oportunidade de convivência por mais longas décadas. Especialmente nos últimos 2 anos, sua presença e participação ativa na minha vida foram fundamentais. Sem você, eu não teria “renascido das cinzas”. Gratidão eterna a ti!

Aos amigos Caio Rodrigues, Débora Martins e Thamyris Sampaio, pelos momentos de alegria e descontração após (e durante rs) as análises moleculares. Saber que tenho a amizade de vocês e que me apoiaram em todas as horas, mesmo quando estávamos longe, foi crucial nessa caminhada. “Tha” e “Deh”, muito obrigada pela maravilhosa companhia e amizade e por toda a compreensão desde 2007.

À amiga Gabrielli Stefanini, por todo incentivo e apoio ao longo da nossa convivência desde o período da graduação e, especialmente, durante os nossos cursos de pós-graduação, por toda ajuda nos meus “questionamentos bacteriológicos” e suporte nos momentos difíceis.

Aos amigos Ana Paula dos Reis, André William Masseaux, Bianca Pachiel, Daniel Paiva, Elisa Pádua, Giovani Oliveira, Giulia Coelho, Matheus Fernandes e Rafaela Pisani pela amizade e companheirismo durante esses 2 anos de Mestrado. Os momentos “tensos” em algumas disciplinas eram sempre recompensados com tantos outros de diversão, o que deixava tudo “mais leve”.

Aos amigos Carla Caroline F. de Sousa e Rodrigo C. Guimarães de Sousa. Vocês foram substanciais para que eu conseguisse me reerguer em tantos aspectos. Estendo meus agradecimentos à toda equipe da “Salinha Azul”, setor indispensável para o suporte holístico e equilíbrio energético-emocional de toda a comunidade da UFRRJ.

Às médicas veterinárias Ananda Senhoretto, Clarissa Martins, Lara Carrasco, Pollyanna Barbosa, Raquel Sampaio e Stephany Veras, pelo companheirismo na Rural e na Gatos & Gatos Vet, e disponibilidade para compartilhar seus conhecimentos acerca da medicina felina. Obrigada por fazerem parte desse meu “despertar profissional”.

À Rosemar Freitas, por toda sua disponibilidade e atenção, pela confiança depositada e por suas orações para o meu “anjo da guarda” quando mais precisei de apoio.

À Renée Cristine, pela sua amizade tão especial, pela ajuda indispensável durante nossos tempos na “Salinha de Gatos”, por estar sempre ao meu lado, sendo meu incentivo profissional e pelo grande auxílio emocional nos momentos “conturbados” do meu caminho nos últimos anos. Por me contagiar com seu amor e dedicação pelos felinos.

À amiga Camila Baruel, pela cumplicidade, ajuda no período da “Salinha de Gatos”, por todo o carinho e pelas “risadas gostosas” proporcionadas.

À amiga Denise Soares, pelos anos de convívio durante a graduação e pela afeição. Por todo suporte e carinho nas horas de instabilidade (mesmo à distância).

À Virgínia Conceição T. Lima (“amor da minha vida!”rs). Seriam muitas linhas para lhe agradecer e tentar expressar em palavras o quanto você significa para mim, então irei resumir com uma frase: “...foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante!” (Antoine de Saint-Exupéry). Gratidão por me cativar!

À Clarice Gonring Corrêa. “Cla”, como você não gosta que eu seja prolixa, tentarei ser mais objetiva (tentarei!rs). Uma década de convivência e só posso lhe agradecer imensamente por tê-la ao meu lado. Nosso tempo de convivência no HVPA/UFRRJ foi uma grande (e linda) surpresa para mim, pois pude ver mais de perto o quão dedicada aos animais você é, mesmo diante das maiores adversidades. Sem você lá, acho que não teria “sobrevivido” tanto tempo. Muitas lembranças dos momentos de “correria total”, dos almoços vegetarianos repartidos (literalmente!rs), da ajuda e experiências mutuamente compartilhadas (só você para me fazer ficar por mais do que 5 minutos no setor de cirurgia!rs), sem mencionar as horas em que só queríamos “fugir” dali (com convicção, eu teria feito isso em pouco tempo se não fossem seu apoio e amizade). Felizmente, pudemos continuar juntas ao longo da pós-graduação (oh, karma!rs) e dividir tantos outros momentos durante as aulas, apresentações e projetos. Suas surpresas nos meus aniversários, reclamações “sem fim” e conversas (ou monólogos rs) à beira do lago do IV fizeram meus dias melhores, sem dúvida. Só posso lhe ser genuinamente grata! Obrigada por ser um dos meus alicerces.

Aos amigos Anderson Saraiva, Fernanda Gabriel, Thais Alves, Victor Ferreira, Welser Barbosa Netto (“Wel wel”), e todos os “agregados da sala 7”. Obrigada por me acolherem desde o primeiro período da graduação e me proporcionarem tantas alegrias e momentos divertidos, principalmente ao final de dias desgastantes. Estendo meus agradecimentos ao professor Paulo Oldemar Scherer e à Natália Passos, por me apoiarem há 10 anos, sempre com palavras de carinho e incentivo.

À médica veterinária Márcia Aragão, por me proporcionar a primeira oportunidade de atuação profissional e depositar grande confiança no meu trabalho. Por me ensinar tanto e, principalmente, por ser tão amorosa e me ter como uma filha (a recíproca é verdadeira, “mãe”!rs). Obrigada por todos os cuidados dispensados e apoio em todas as horas, essencialmente nas dificuldades pessoais enfrentadas. Estendo meus agradecimentos à equipe da Doctor Pet Veterinária, “Paulinho”, Geiza, Sr. Alair e Sr. “Monteiro”.

Aos médicos veterinários Diogo Gorayeb, Marcella Vianna e Marcos Silva pela maravilhosa convivência profissional na CESVet. Pela paciência e ensinamentos, cruciais nas emergências. Pela amizade cultivada e confiança mútua adquirida. “Cella” e “Marquinhos”, muito obrigada pelas risadas e momentos de descontração nos plantões noturnos diários, mesmo quando tudo parecia um “caos total” que não teria fim (e por aceitarem meus “TOC’s” de limpeza e organização!rs).

À médica veterinária Isabella Sant’anna, pelo suporte profissional e pessoal. Muito obrigada pela enorme credibilidade depositada nos momentos em que perco a confiança em mim mesma (e por confiar a mim a saúde do meu paciente felino “velhinho VIP” Quinho rs).

À Vanessa Nery. Sem seu suporte psicológico não seria possível a conclusão desse trabalho. Obrigada pela atenção e disponibilidade totais. Por ser um dos meus guias no caminho de autoconhecimento e por ajudar a me redescobrir. Gratidão, Van!

À Ivana Barreto, pelo seu surpreendente ressurgimento em minha vida após tantos anos, justamente durante uma “fase nebulosa”. Pela “companhia virtual” nas longas madrugadas de insônia (companheira de “RED” rs) e pela amizade revivida tão naturalmente.

Ao Bruno Santiago, pela amizade desde à nossa época no colégio Bahiense e pela maravilhosa convivência diária nos primeiros períodos da graduação em medicina veterinária. Por todo companheirismo e demonstrações de carinho. Pelo apoio emocional nos momentos de maior dificuldade, mesmo que não pudesse estar “de corpo presente”.

À amiga Natália Pires, por tudo o que partilhamos nesses 18 anos de amizade. Por ser simplesmente incrível e me transmitir grande amor e carinho, mesmo nos longos períodos de “ausência física”. Estendo meus agradecimentos aos seus pais, “tio Edilson” e “tia Zilda”, por me acolherem como uma segunda filha.

À Leticia Alves, pelo nosso encontro inesperado durante o tempo de estágio na Gatos & Gatos Vet e pela empatia imediata (completamente inusitada, prova de que “os opostos se atraem” rs). Pelo companheirismo e imenso carinho (mesmo nos momentos em que se referia “amorosamente” a mim como “peste”, me xingava ou me batia, inclusive na frente de tutores rs). Pela bela amizade desenvolvida tão naturalmente, permitindo uma conexão singular. Por me abrigar (e me aturar rs) na sua casa em um dos momentos mais delicados que enfrentei (estendo meus agradecimentos aos seus pais, Luiz Cláudio e Marileide, e à Dani, por toda atenção e cuidados). “Lê”, simplesmente obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao amigo Marcelo Soares Antunes. “Marcelinho”, é complicado resumir em poucas palavras o quão importante você é na minha vida. Só posso lhe agradecer por ter me acolhido há 10 anos e não ter me deixado desistir, mesmo diante das adversidades. Por seus conselhos e conversas em que consegue me fazer “rir alto” e, segundos depois, chorar sem qualquer tipo de vergonha. O que seria de mim sem seu suporte tecnológico?!rs (seu antigo orientador no mestrado agradece também rs). Obrigada por me contagiar com sua alegria e irreverência e por deixar sua mão sempre estendida durante minhas “quedas”. Companheirismo ímpar e carinho imenso. Meu “irmão de vida”, muito obrigada por tudo!

À José Miguel Farias Hernandez (espero ter escrito certo, caso contrário nossa amizade chegará ao fim no instante em que ler isto, né?!rs). “Miguelito”, me “fogem as palavras” quando preciso expressar o que você significa para mim. O importante é sentir, certo?! E nisso você é Ph.D. (rs). Há 10 anos fui divinamente presenteada pelo Universo com a oportunidade de conhecer um ser humano com um dos corações mais lindos que já “vi”. É quase impossível “passar para o papel” toda a gratidão e amor que tenho por você. Companheiro de tantos anos de anatômico, obrigada pelos ensinamentos, companhia até o ponto de ônibus após as monitorias, aulas e atividades no laboratório que extrapolavam o horário oficial da instituição (rs). E, fundamentalmente, pela proteção. Meu eterno “anjo caído”, sou grata por tudo o que fez (e faz) por mim, por nós. Amor e gratidão incondicionais a ti!

Ao Júlio César Venas, por ser o mestre que é e pelo seu altruísmo, se “anulando” em prol do Todo. Obrigada por toda sabedoria iniciática compartilhada, por ser justo e pelas energias transmitidas em todos os momentos. Por ser esse guia luminoso, incansável e incessante, me ajudando à caminhar nesse mundo de dualidades, possibilitando, assim, minha reconexão com a Essência maior, vibrando intensamente em meu coração. Gratidão!

BIOGRAFIA

Camila Flávia Magalhães Botelho, filha de Marilena Pimenta Magalhães e Gilberto Garcia Botelho, natural de Pirassununga, SP, nascida em 19 de julho de 1989. Sua trajetória educacional se iniciou na Escola Helton Veloso Filho, onde cursou o ensino infantil, dando continuidade no ensino fundamental no Colégio Belisário dos Santos, concluindo esta etapa no Colégio Bahiense, em Campo Grande, local onde cursou o ensino médio também, concluído no ano de 2006.

Em 2007, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo-o no primeiro semestre de 2012. Durante a graduação, realizou estágio desde o primeiro período na clínica particular Veterinária Andresa WestCare, em Campo Grande, onde permaneceu até o ano de 2011, além de estágio oficial na instituição federal no setor de Anatomia Animal, de 2007 a 2008.

Em 2010, iniciou estágio no setor de atendimento exclusivo de felinos (“Salinha de Gatos”) do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ, onde permaneceu até 2013, já atuando como médica veterinária. Durante esse período, também foi estagiária na clínica particular Gatos & Gatos Vet, ambos sob a orientação da professora Heloisa Justen Moreira de Souza.

No ano de 2008, foi monitora das disciplinas de Anatomia Animal I e II, sob orientação dos professores Paulo Oldemar Scherer, Paulo Roberto B. Lopes e Luciano da Silva Alonso.

Em 2010, foi monitora voluntária da disciplina de Anatomia Patológica Animal, sendo orientada pela professora Marilene de Farias Brito. Nesse mesmo ano, iniciou sua jornada na área de Patologia Clínica, exercendo a função de monitora até o final do período letivo de 2011, sob orientação do professor Carlos Henrique Machado.

Foi bolsista de Iniciação Científica PIBIC no período de 2011 a 2012, sob orientação da professora Heloisa Justen, em projeto intitulado “Correlação entre três métodos de avaliação de obesidade em gatos domésticos no Rio de Janeiro.”

Ao longo da graduação, auxiliou em projetos de pesquisa das áreas em que foi monitora e estagiária, participando como autora ou coautora da elaboração de diversos trabalhos científicos apresentados em jornadas de Iniciação Científica, semanas acadêmicas da graduação e da pós-graduação, além de resumos e artigos publicados em anais de congressos e periódicos.

Ainda durante a graduação, participou de inúmeros eventos científicos em diferentes estados brasileiros, bem como de cursos de atualização, sempre com ênfase nas áreas de Clínica Médica de Pequenos Animais e Patologia Clínica. Também integrou a equipe de organização do “I Minicurso de Endocrinologia de Pequenos Animais”, realizado na UFRRJ em 2011.

Após concluir a graduação, atuou como clínica geral no Centro de Emergência e Suporte Veterinário (CESVet), localizado na Barra da Tijuca, onde permaneceu até 2014.

Em março de 2015 ingressou no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, em nível de Mestrado (área de concentração Ciências Clínicas), classificada em segundo lugar dentre os aprovados e contemplada com bolsa de auxílio concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

No decorrer desse período, participou de cursos e eventos relacionados à área, auxiliou na organização da “IV Semana Acadêmica de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ (SAMVet)”, integrou a equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LABVET), auxiliando em projetos de pesquisa de discentes de Iniciação Científica e pós-graduação, além de ter realizado estágio à Docência na disciplina de Patologia Clínica e publicado resultados parciais da dissertação em eventos da área.

RESUMO

BOTELHO, Camila Flávia Magalhães **Diagnóstico molecular e avaliação hematológica de micoplasmas hemotróficos em cães domésticos (*Canis familiaris*) nas áreas urbana e rural de Araguaína, Tocantins, Brasil.** 2017. 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Os hemoparasitos micoplasmas hemotróficos são organismos pleomórficos, epicelulares, Gram negativos, que se localizam na superfície dos eritrócitos de diversas espécies. Em cães, a infecção pelos hemoplasmas pode causar anemia hemolítica na fase aguda, enquanto na doença crônica os sinais em geral são inaparentes, sendo que a imunossupressão pode desencadear a doença aguda. O presente estudo objetivou detectar molecularmente a presença de infecção pelos agentes micoplasmas hemotróficos em cães domésticos procedentes de áreas urbana e rural de Araguaína, Tocantins e, adicionalmente correlacionar as alterações hematológicas e fatores associados com a infecção natural. Na análise dos resultados obtidos, 2,9% (3/105) dos cães amostrados da área urbana e 24,49% (24/99) da área rural foram positivos pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para *Mycoplasma* spp. A frequência de infecção das espécies de hemoplasmas pela PCR, utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos, foi de 1,9 % (2/105) e 13,26% (13/99) para *Mycoplasma haemocanis* na área urbana e rural, respectivamente. Não foram observados cães positivos para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ em ambas as áreas estudadas. No tocante às alterações hematológicas, não houve associação estatística com a infecção por *Mycoplasma* spp. De modo semelhante, dentre as variáveis analisadas (idade, sexo, padrão racial, limpeza do local e moradia) não foi verificada qualquer correlação estatística com a infecção pelo agente *Mycoplasma* spp., seja na área urbana ou na rural. Esta constitui a primeira detecção molecular de *Mycoplasma haemocanis* em cães do Tocantins e abre perspectivas para futuros estudos neste grupo de agentes hemotróficos.

Palavras-chave: Cães domésticos, hemoplasmas, hematologia.

ABSTRACT

BOTELHO, Camila Flávia Magalhães. **Molecular diagnostic of haemotropic parasites of dogs (*Canis familiaris*) under natural conditions of urban and rural areas of Araguaína, state of Tocantins, Brazil.** 2017. 50p. Dissertation (Master of Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Hemotrophic mycoplasmas hemoparasites are pleomorphic, epicellular, gram negative organisms that are located on the surface of erythrocytes of several species. In dogs, hemoplasma infection can cause hemolytic anemia in the acute phase, while in the chronic phase the signs are generally inapparent, and immunosuppression can trigger the acute disease. The present study aimed to detect molecularly the presence of hemotrophic mycoplasma agents in domestic dogs from the urban and rural areas of Araguaína, Tocantins and, in addition, to correlate hematological alterations and factors associated with natural infection. In the analysis of the results, 2.9% (3/105) of the dogs sampled from the urban area and 24.49% (24/99) from the rural area were positive for *Mycoplasma* spp. by the Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR). The frequency of hemoplasmas species infection by PCR using species-specific oligonucleotides was 1.9% (2/105) and 13.26% (13/99) for *Mycoplasma haemocanis* in the urban and rural areas, respectively. No positive dogs were observed for ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in both areas studied. Regarding hematological alterations, there was no statistical association with the infection by *Mycoplasma* spp. Similarly, among the analyzed variables (age, gender, racial pattern, site cleanliness and housing), no statistical correlation was observed in either urban or rural areas. This is the first report of the molecular detection of *Mycoplasma haemocanis* in dogs from Tocantins and opens up prospects for future studies in this group of hemotrophic agents.

Key words: Domestic dogs, hemoplasmas, haematology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Micoplasmas hemotróficos de cães domésticos, descritos no Brasil	3
Tabela 2: Frequência de cães domésticos positivos pela PCR em tempo real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp., oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins	24
Tabela 3: Frequência de cães domésticos positivos pela PCR em tempo real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp., oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins	24
Tabela 4: Correlação entre a positividade para o agente <i>Mycoplasma</i> spp. em cães domésticos e as áreas urbana e rural do município de Araguaína, Tocantins, utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR)	24
Tabela 5: Análise descritiva de parâmetros relacionados ao eritrograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp., oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins	25
Tabela 6: Análise descritiva de parâmetros relacionados ao leucograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp., oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins	26
Tabela 7: Alterações hematológicas associadas à infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. em cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR), oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins	27
Tabela 8: Análise descritiva de parâmetros relacionados ao eritrograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp., oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins	28
Tabela 9: Análise descritiva de parâmetros relacionados ao leucograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp., oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins	29
Tabela 10: Alterações no hemograma associadas à infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. em cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR), oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins	30
Tabela 11: Correlação entre os dados de idade, sexo, padrão racial, frequência de limpeza do local e tipo de moradia, com o resultado da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o agente <i>Mycoplasma</i> spp. em cães domésticos oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins	31
Tabela 12: Correlação entre os dados de idade, sexo, padrão racial, frequência de limpeza do local e tipo de moradia, com o resultado da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o agente <i>Mycoplasma</i> spp. em cães domésticos oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Árvore filogenética dos micoplasmas, baseada no gene 16S rRNA 4
- Figura 2. Esfregaço de sangue periférico com organismos de *Mycoplasma haemocanis* na superfície de eritrócitos de cão doméstico (Wright-Giemsa, 1000x) 5
- Figura 3. Local de obtenção das amostras de sangue de cães domésticos oriundos de áreas urbana e rural do município de Araguaína (em destaque), Tocantins, Brasil 17
- Figura 4. Curva de amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. em amostras de cães domésticos das áreas urbana e rural do município de Araguaína (Tocantins, Brasil) obtida pela PCR em tempo real (Sistema SYBRGreen®). A linha em cor-de-rosa indica o controle positivo; as demais, amostras positivas 21
- Figura 5: Curva de dissociação do fragmento do gene 16S rRNA do controle positivo e das amostras positivas de cães domésticos oriundos de áreas urbana e rural do município de Araguaína (Tocantins, Brasil), demonstrando a especificidade da reação de amplificação para *Mycoplasma* spp. na PCR em tempo real 22
- Figura 6. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 393 pares de bases do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemocanis*, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen®); -: controle negativo (água ultrapura); +: controle positivo; canaletas 1 a 5, 7 a 13 e 15 a 17: cães negativos; canaletas 6 e 14: cães positivos 23
- Figura 7. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 192 pares de base do gene 16S rRNA de '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*', por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: controle negativo (água ultrapura); +: controle positivo; canaletas 1 a 14: cães negativos 23

LISTA DE ABREVIACÕES

°C	Grau Celsius
ACVIM	Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária
AHIM	Anemia hemolítica imunomediada
AMP	Adenosina monofosfato
'C. M. haemominutum'	' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '
'C. M. haematoparvum'	' <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> '
'C. M. turicensis'	' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> '
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
C _T	<i>Threshold Cycle</i> /limiar de detecção
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNAse	Desoxirribonuclease
DNNE	Desvio Nuclear Neutrófilico à Esquerda
DP	Desvio Padrão
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Erro Padrão
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
<i>H. canis</i>	<i>Haemobartonella canis</i>
He	Hemácias
Hg	Hemoglobina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ht	Hematócrito
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBOPE	Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística
kb	Quilopares de base
<i>M. haemocanis</i>	<i>Mycoplasma haemocanis</i>
<i>M. haemofelis</i>	<i>Mycoplasma haemofelis</i>
Máx.	Limite máximo
Mín.	Limite mínimo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número de cães
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCRc	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
PM	Peso molecular

qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>) ribossomal
RNAse	Ribonuclease
<i>rnpB</i>	Gene Ribonuclease P (RNase P RNA)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de dissociação (<i>Melting Temperature</i>)
U	Unidade
VG	Volume Globular
VGM	Volume Globular Médio
μM	Micrometro
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Características morfológicas e histórico dos micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas)	3
2.2 Micoplasmas hemotróficos em cães	6
2.2.1 <i>Mycoplasma haemocanis</i>	7
2.2.2 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ’	7
2.2.3 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’	8
2.2.4 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’	8
2.3 Transmissão dos hemoplasmas em cães	8
2.4 Diagnóstico dos hemoplasmas	9
2.5 Patogenia da hemoplasmose	10
2.6 Sinais clínicos e achados laboratoriais	11
2.7 Infecção em cães domésticos	11
2.8 Prevalência mundial	12
2.9 Prevalência no Brasil	13
2.10 Animais de companhia	13
2.11 Saúde pública	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Local	16
3.2 Amostragem	16
3.3 Coleta de sangue	17
3.4 Análises hematológicas	17
3.5 Reação em Cadeia da polimerase (PCR)	18
3.5.1 Extração de DNA de sangue total	18
3.5.2 Reação de amplificação para hemoplasmas	18
3.5.2.1 PCR em tempo real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> spp.	18
3.5.2.2 Reação de amplificação específica para <i>Mycoplasma haemocanis</i>	18
3.5.2.3 Reação de amplificação específica para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’	19
3.5.2.4 Reação de amplificação específica para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ’/‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’	19
3.5.3 Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares	19
3.5.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose	20
3.6 Análise estatística	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Diagnóstico molecular de hemoplasmas, baseado no gene 16S rRNA	21
4.2 Distribuição de hemoplasmas no município de Araguaína, Tocantins	23
4.3 Análise de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de <i>Mycoplasma</i> spp.	25
4.3.1 Área urbana	25
4.3.2 Área rural	28
4.4 Fatores associados à positividade para <i>Mycoplasma</i> spp., utilizando a técnica da PCR em tempo real (qPCR)	31
5 DISCUSSÃO	33

6 CONCLUSÕES	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8 ANEXOS	49
Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	49
Anexo B - Questionário	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto país do mundo com maior população de animais domésticos, perdendo somente para os Estados Unidos: são 52 milhões de cães e 22 milhões de gatos (ABINPET, 2013). A relação é de um cão para cada seis habitantes e de um gato para cada dezesseis habitantes. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que, no período de 2005 a 2009, houve aumento de 17,6% no número de cães e gatos no Brasil. Segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE), cerca de 60% dos domicílios têm algum animal de estimação, havendo em 44% deles pelo menos um cachorro e em 16% pelo menos um gato (PINTO, 2009).

As hemoparasitoses caninas são doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores hematófagos e diagnosticadas com grande frequência na rotina médico-veterinária, sendo responsáveis por manifestações clínicas variáveis, desde imperceptíveis até quadros clínicos mais graves que podem levar ao óbito (LABARTHE et al., 2003).

Em canídeos domésticos, a Micoplasmose, causada por *Mycoplasma* spp., vem ganhando destaque já que pode provocar no animal o desenvolvimento de anemia, leucopenia e/ou trombocitopenia, e até mesmo levar à morte. A sua importância deve-se não só ao caráter patogênico no que diz respeito à espécie canina, mas também ao papel potencialmente zoonótico de algumas espécies, sendo necessário o tratamento clínico dos animais infectados e a execução de medidas higiênico-sanitárias, visando à eliminação dos ectoparasitas presentes no animal e no ambiente, diminuindo assim o risco de contaminação humana (FIGUEIREDO, 2011).

A Micoplasmose canina tem sido apenas esporadicamente reconhecida no Brasil e, apesar da infecção já ter sido descrita no Nordeste, no Sul e no Sudeste, pouco se sabe sobre ela, pois as manifestações clínicas são raras. Por outro lado, cães imunocomprometidos são particularmente suscetíveis à infecção e, em alguns casos clinicamente evidentes, já foi descrita em cães com infecções concomitantes por outros hemoparasitas (NASCIMENTO et al., 2012).

As parasitoses transmitidas por ectoparasitas são consideradas cada vez mais um problema emergente em climas temperados e ambientes urbanos. Essa situação deve-se, em parte, às alterações climáticas, à utilização dos solos para atividades de agricultura e lazer, à ecologia dos ectoparasitas e seus hospedeiros e à sua movimentação para áreas previamente não endêmicas. Adicionalmente, tem-se assistido a uma rápida evolução das técnicas de diagnóstico molecular, permitindo uma detecção mais exata e sensível desses micro-organismos (FERREIRA, 2008).

Frente à grande importância das hemoparasitoses, são necessários mais estudos sobre os aspectos que envolvem a cadeia epidemiológica desses parasitas, com o objetivo de buscar ferramentas para suas identificações e implementação de medidas de controle e prevenção, a fim de garantir a qualidade e manutenção da saúde pública. Outra problemática que dá respaldo ao estudo dessas afecções e que torna mais complexa a análise clínica dos animais suspeitos, é quando a doença ocorre em regiões endêmicas para outras enfermidades com quadro clínico semelhante e que têm grande relevância, tanto na saúde animal como na humana.

Mycoplasma é um gênero de bactérias da família Mycoplasmataceae, com tamanho menor (cerca de $0,3\mu\text{m} = 0,3 \times 10^{-6}\text{m}$) do que o apresentado normalmente por outras bactérias. Os microbiologistas ainda debatem se as bactérias evoluíram dos micoplasmas primitivos ou são estirpes separadas, ou ainda, se os micoplasmas evoluíram a partir dos vírus; mas até o momento, nenhuma tese ou teoria sobre a perspectiva evolutiva é verossímil.

A diferença principal entre as bactérias e os micoplasmas é que as bactérias possuem uma parede celular sólida, e por esse motivo uma forma definida (o que facilita a sua identificação ao microscópio), ao passo que os micoplasmas possuem apenas uma membrana flexível, o que se junta ao tamanho reduzido para dificultar a sua identificação, mesmo quando

observados pelas lentes dos mais potentes microscópios eletrônicos, para então saber se a forma é bacilóide, cocóide, micelóide ou espiro-helicóide.

Os micoplasmas podem viver dentro de células, sem matar a célula hospedeira, em simbiose-parasita, à semelhança do que fazem alguns vírus e bactérias, mas também podem viver e crescer fora das células, nos fluidos corporais, o que os vírus não são capazes.

Os micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas) são organismos pleomórficos, epitelulares, Gram-negativos que se localizam na superfície dos eritrócitos de diversas espécies. Devido ao fato de serem incultiváveis em meios de cultura tradicionais e, nem sempre ser possível encontrá-los no sangue periférico, o diagnóstico mais preciso (específico e sensível) deve ser baseado em técnicas moleculares. Em cães, a infecção pelos hemoplasmas pode causar anemia hemolítica na fase aguda, enquanto na doença crônica os sinais em geral são inaparentes e a imunossupressão pode desencadear a doença aguda.

Com relação à espécie canina, atualmente essa população tem apresentado um crescimento significativo, principalmente em grandes cidades, onde o convívio com os seres humanos é bastante próximo. Devido a esse comportamento, as possibilidades de transmissão dessas e de outras enfermidades infecciosas são óbvias.

A presença de vetores como pulgas e carrapatos, potenciais transmissores principalmente em locais de clima quente, e a ausência de métodos eficazes de controle, são fatores que devem ser considerados na possibilidade de os hemoplasmas constituírem zoonoses (SANTOS et al., 2008). O carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) é conhecidamente o principal fator de risco para transmissão da hemoplasmoze (SENEVIRATNA et al., 1973) e outras doenças transmitidas por vetores em caninos. No Brasil, observa-se elevada frequência desse vetor em todas as regiões do país, sendo mais prevalente naquelas de clima seco.

Assim, o presente estudo objetivou investigar a presença de infecção pelos agentes micoplasmas hemotróficos em cães domésticos procedentes de áreas urbana e rural do município de Araguaína, Tocantins, através da utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, adicionalmente, correlacionar as alterações hematológicas e fatores associados com a infecção natural.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características morfológicas e histórico dos micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas)

Os micoplasmas hemotróficos são organismos pleomórficos, epicelulares, Gram-negativos que infectam e crescem na superfície dos eritrócitos de diversas espécies (LUMB, 1957; MESSICK et al., 2002; MESSICK & HARVEY, 2015). O fato de possuírem como característica o não crescimento em meios de cultura convencionais, faz com que ocorra limitação das possibilidades investigativas sobre o comportamento dos hemoplasmas (WILLI et al., 2007). A ausência de parede celular e flagelos, resistência à penicilina e sensibilidade às tetraciclina são características importantes de tais agentes (RAZIN et al., 1998).

Primeiramente, esses organismos foram classificados na ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, em decorrência do tamanho reduzido (menos que 1 µm), das propriedades tintoriais e da possibilidade de serem transmitidos por artrópodes (MESSICK, 2004; WILLI et al., 2007). Entretanto, as características de ausência de parasitismo intracelular, resistência à penicilina, falta de flagelos, pequeno tamanho, falta de parede celular e sensibilidade às tetraciclina, apontavam uma suspeita deles estarem intimamente relacionados à classe Mollicutes. Desta maneira, a análise filogenética da sequência do gene que codifica o 16S RNA ribossomal (16S rRNA) transferiu os organismos dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* para a classe Mollicutes, família Mycoplasmataceae gênero *Mycoplasma* (NEIMARK et al., 2001; MESSICK et al., 2002; TASKER et al., 2003), dando-lhes a denominação de micoplasmas hemotróficos (NEIMARK et al., 2001).

Nesse contexto, para identificar organismos que se ligam à parede dos eritrócitos, foi incluído o prefixo “*haemo-*”, enquanto para aqueles que não foram completamente descritos, a designação de *Candidatus* (MESSICK & HARVEY, 2015). Assim, a árvore filogenética dos micoplasmas foi modificada e adicionado o grupo dos hemoplasmas, próximo ao *Mycoplasma fastidiosum*, através da avaliação filogenética dos genes 16S rRNA e RNase P RNA gene (*rnpB*), obtida através do sequenciamento de 11 diferentes micoplasmas (PETERS et al., 2008). Adicionalmente, os hemoplasmas foram subdivididos em dois grupos: o grupo *haemofelis* que contém *M. haemofelis*, *M. haemocanis* e o ‘*Candidatus M. turicensis*’; e o grupo *haemominutum* que contém o ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, entre outros (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1: Micoplasmas hemotróficos de cães domésticos, descritos no Brasil.

Micoplasmas	Nº de acesso no Genbank
<i>M. haemocanis</i>	ND
‘ <i>Candidatus M. haematoparvum</i> ’	ND
Organismo semelhante ao ‘ <i>C. M. haemominutum</i> ’	AY297712
Organismo semelhante ao ‘ <i>C. M. turicensis</i> ’	Fj429283

ND= não disponível nos dados do Genbank.

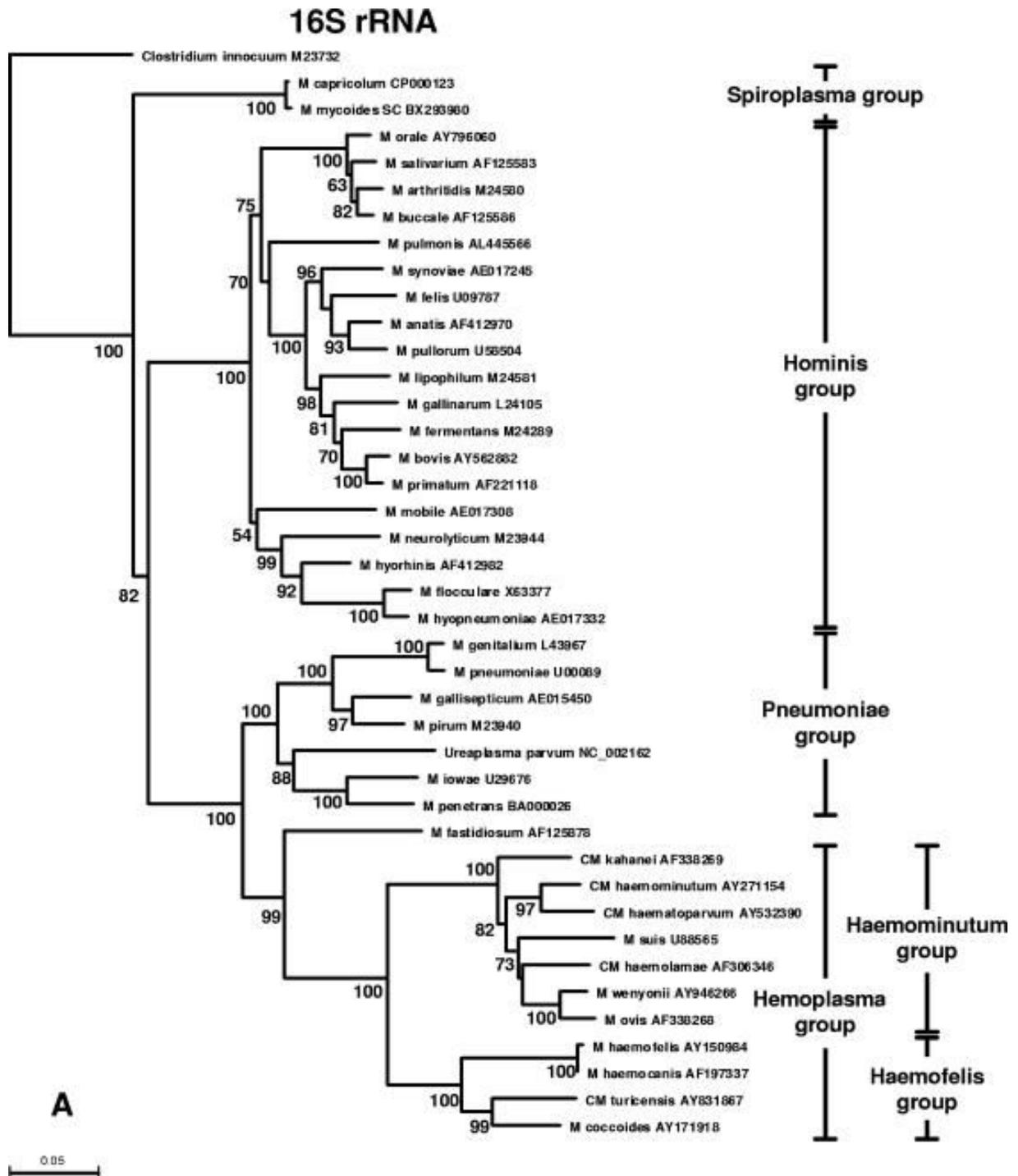


Figura 1. Árvore filogenética dos micoplasmas, baseada no gene 16S rRNA. Fonte: Peters et al. (2008).

Na microscopia eletrônica, o organismo pode aparecer fixado à superfície eritrocitária, preservando-se a integridade da membrana (BRINSON & MESSICK, 2001). Entretanto, durante a parasitemia, essa fixação ocasiona distorções no formato da célula, levando a injúria celular, através de mecanismos imunomediados (VENABLE & EWING, 1968). Outros mecanismos patogênicos da infecção pelos hemoplasmas ainda não estão completamente esclarecidos (MESSICK, 2004).

Morfologicamente, no sangue periférico corado com corantes do tipo Romanowsky, os hemoplasmas podem ser observados na forma de cadeias que se estendem sobre a superfície

eritrocitária (Figura 2) ou podem estar dispostos na forma de cadeias individuais, como pequenas esferas, formato discoide ou em anéis (LUMB, 1957; HOSKINS, 1991).

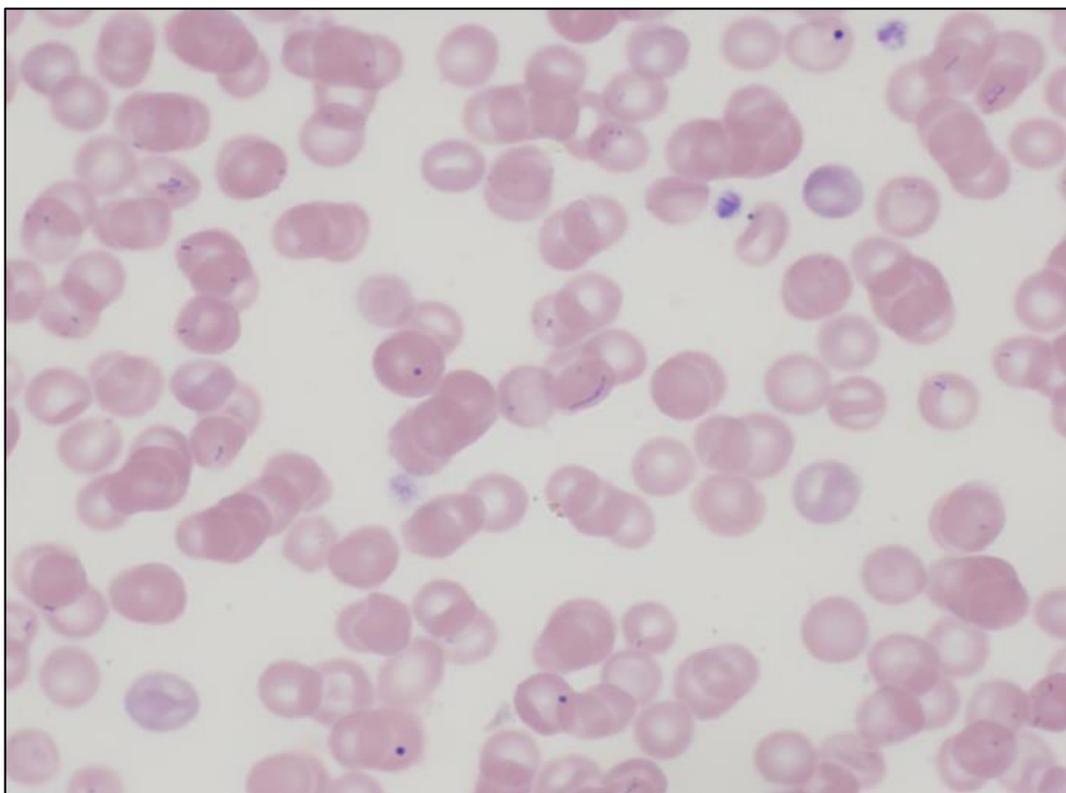


Figura 2. Esfregaço de sangue periférico com organismos de *Mycoplasma haemocanis* na superfície dos eritrócitos de um cão doméstico (Wright-Giemsa, 1000x). Fonte: Joanne B. Messick, Purdue University, School of Veterinary Medicine.

Com um tamanho celular extremamente reduzido, o genoma dos hemoplasmas pode variar de 745 kb (*Mycoplasma suis*) a 1245 kb (*Mycoplasma haemofelis*). O sequenciamento do genoma do *M. haemofelis* sugeriu que 21% dos genes eram designados para o transporte e metabolismo do organismo, enquanto outros poucos eram responsáveis pela proteção elevada contra estresse oxidativo e grande flexibilidade na síntese de aminoácidos. Um número considerável de genes determina as adesinas, que são fundamentais para a sobrevivência do organismo, além de variáveis antígenos de superfície que defendem os micoplasmas das ações do sistema imune do hospedeiro (MESSICK, 2004).

Estudos recentes envolvendo a avaliação dos genomas de *Mycoplasma suis* e *Mycoplasma haemofelis* demonstraram que ambos possuem genes reduzidos para as rotas metabólicas e evidências para adaptação ao ambiente sanguíneo. Os autores especulam que os hemoplasmas podem causar a doença através da remoção de nutrientes e competição com a célula parasitada, podendo levar à redução da meia-vida dos eritrócitos (MESSICK et al., 2011). As características metabólicas (MESSICK et al., 2011; BARKER et al., 2011) desses organismos prejudicam a cultura *in vitro*, fazendo com que os métodos de diagnóstico devam se basear em técnicas moleculares (TASKER et al., 2003).

Os primeiros micoplasmas foram detectados em 1898 no Instituto Pasteur, em tecidos de gado com artrite e pleuro-pneumonia. Daí lhes veio o primeiro nome por que foram conhecidos: pleuro-pneumonia-like organismos, ou PPLOs, nome que foi utilizado até os anos 60. O primeiro micoplasma humano foi isolado em 1932, num abscesso. Desde então se descobriram muitas estirpes diferentes, que são fundamentalmente específicas da espécie

hospedeira (ou pelo menos de grupos específicos de animais: felinos, aves, roedores, homem e símios antropóides etc.).

Descobriu-se também que ao contrário das bactérias, que são susceptíveis às penicilinas, os micoplasmas são controláveis por antibióticos como as tetraciclina e os macrolídeos, como a eritromicina, a azitromicina e a claritromicina. E descobriram-se ainda estirpes que exibiam um crescimento como micélios, semelhante ao dos fungos, o que levou ao aparecimento da designação "micoplasma".

2.2 Micoplasmas hemotróficos em cães

Esses organismos vêm sendo estudados desde a década de 1950, quando se verificou que cães afetados por eles poderiam manifestar os sinais clínicos da doença aguda quando esplenectomizados, ou de uma doença crônica, apresentando-se assintomáticos.

A importância da infecção foi verificada primeiramente nos Estados Unidos, onde um grupo de pesquisadores, utilizando cães como modelo experimental para pesquisas sobre choque hemorrágico, observaram resultados inconsistentes em decorrência de uma doença hemolítica aguda que os animais apresentavam. Como os hemoplasmas não podem ser cultivados *in vitro*, a dose de organismos em infecções experimentais não pode ser acuradamente determinada, interferindo nos resultados. Ainda, estudos relacionados à transmissão de hemoplasmas são escassos e a maioria é inconclusivo. A partir de então, grupos de pesquisa americanos e europeus iniciaram os estudos moleculares dos hemoplasmas, que afetam tanto os cães quanto outras espécies.

No Brasil, embora o impacto da infecção não tenha atingido o meio acadêmico na forma de interferir em resultados de pesquisa, nota-se que o estudo dos hemoplasmas, não somente no cão, como em outras espécies, apresenta grande importância com relação à identificação das espécies que afetam os animais, bem como a verificação do possível potencial zoonótico das hemoplasmoses, além da descoberta de novas espécies.

No país, ainda se utiliza como meio de diagnóstico dos hemoplasmas e demais formas parasitárias sanguíneas, a detecção dos organismos nos esfregaços sanguíneos corados por corantes de rotina hematológica. Em decorrência do baixo custo do exame e da falta de laboratórios capacitados para tecnologias moleculares em algumas regiões, o diagnóstico tem sido baseado em evidências clínicas, sendo que normalmente é confirmado com uma abordagem de tratamento sintomático (diagnóstico terapêutico).

Com os avanços e a popularização das técnicas de diagnóstico molecular, há necessidade de disponibilizar aos laboratórios veterinários um protocolo padronizado para o diagnóstico dos hemoplasmas e dos demais hemoparasitas dos animais domésticos. Com o passar dos anos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se tornado uma técnica difundida e com a vantagem de apresentar elevada especificidade e sensibilidade, além de estar cada vez mais disponível e viável financeiramente na rotina clínica.

Em caninos, os primeiros hemoplasmas a serem identificados foram o *Mycoplasma haemocanis*, que anteriormente foi denominado de *Haemobartonella canis* (*H. canis*), da ordem Rickettsiales (BRINSON & MESSICK, 2001) e o ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ (SYKES et al., 2004; SYKES et al., 2005). Após a difusão das técnicas de biologia molecular para diagnóstico e comportamento dos hemoplasmas, identificou-se o ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (de MORAIS et al., 2006; ZHUANG et al., 2009; OBARA et al., 2011) e o ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (SANTOS, 2008), que possuem características filogenéticas semelhantes às espécies descritas em felinos.

A maioria dos estudos de prevalência da infecção pelos hemoplasmas no Brasil está concentrada nas espécies que afetam os felinos. Em caninos, os estudos ainda não são suficientes para poder avaliar a prevalência, os fatores de risco e o potencial patogênico dos

mesmos. Um dos poucos estudos, relacionou a presença do hemoplasma até então detectado em felinos, o ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, em sete cães esplenectomizados utilizados em uma pesquisa científica (SANTOS, 2008). Relatos de casos isolados foram feitos nos Estados do Paraná e Minas Gerais (de MORAIS et al., 2006; BIONDO et al., 2009), porém, sem a determinação da composição filogenética do agente e comparação entre outros isolados de ocorrência mundial. Em um recente estudo (RAMOS et al., 2010), verificou-se a caracterização genética dos patógenos transmitidos por carrapatos, na região metropolitana do Recife, onde o *M. haemocanis* foi identificado em um pequeno número de animais.

2.2.1 *Mycoplasma haemocanis* (*M. haemocanis*)

Foi descrito primeiramente em 1928, na Alemanha, onde em um cão esplenectomizado verificou-se, no sangue periférico, a presença de organismos semelhantes à *Bartonella* (LUMB, 1957). Tais organismos eram pleomórficos, aderidos à membrana, com formato de cocos individuais muito pequenos (0,25 a 1 µm) ou dispostos em cadeias agregadas retas, curvas, espirais, aneladas ou com o formato de arco de violino (VENABLE & EWING, 1968; MESSICK et al., 2002).

Com distribuição mundial, até o presente momento, há descrição na Espanha (ROURA et al., 2010), Suíça (WENGI et al., 2008), Europa mediterrânea (Espanha, França e Itália) (KENNY et al., 2004; NOVACCO et al., 2010), África (BARKER et al., 2010), Índia, Peru, Venezuela, Estados Unidos (BRINSON & MESSICK, 2001) e Brasil (BIONDO et al., 2009) utilizando-se o diagnóstico através das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR).

Nos estudos filogenéticos do gene 16S rRNA, verificou-se uma íntima similaridade com o *M. haemofelis* (99,3% a 99,7% de homologia), em que alguns autores sugeriram ser o mesmo organismo, que poderia afetar tanto cães quanto gatos, já que a infecção cruzada havia sido verificada (LUMB, 1957; BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002). No entanto, o estudo do gene RNase P RNA (*rnpB*) entre os agentes, identificou uma reduzida homologia (99,3 a 99,7%) e por isso puderam ser classificados como espécies distintas (BIRKENHEUER et al., 2002). Com base no gene RNase P RNA, alguns estudos já referem o realinhamento dos hemoplasmas na árvore genética (PETERS et al., 2008).

2.2.2 ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’

Foi detectado pela primeira vez em um cão com linfoma de células T, após a esplenectomia e quimioterapia (SYKES et al., 2004; SYKES et al., 2005). Na comparação filogenética do gene 16S rRNA, os autores concluíram se tratar de um organismo muito semelhante ao ‘*Candidatus M. haemominutum*’ dos felinos (98,4%) e pouco relacionado ao *M. haemocanis* (77%). Como semelhança morfológica entre o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e o ‘*Candidatus M. haemominutum*’, pode-se relacionar o tamanho reduzido (0,3 µm de diâmetro) e a ausência de cadeias de organismos, dispostas na superfície dos eritrócitos (SYKES et al., 2004).

Um protocolo semelhante ao utilizado para verificação da diferença entre *M. haemocanis* e *M. haemofelis* (BIRKENHEUER et al., 2002), que envolve o sequenciamento do gene RNase P RNA (*rnpB*), foi aplicado para diferenciar ambos os hemoplasmas pequenos que afetam cães e gatos. Na avaliação do fragmento resultante desse ensaio, Sykes et al. (2005), verificaram homologia de 75% para o ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 65% para os isolados de *M. haemocanis*.

Em um estudo francês, Kenny et al. (2004) utilizando a PCR em tempo real para o diagnóstico dos hemoplasmas em cães, detectaram reduzido número de cópias de DNA nos

animais infectados pelo ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ ($5,8 \times 10^2$ e $2,1 \times 10^3$ cópias/mL de sangue). Tal observação sugere que muitos cães positivos assintomáticos possam não ser diagnosticados através da PCR em tempo real ou convencional, por conta da baixa parasitemia.

No Brasil, em Londrina, Paraná, de Moraes et al. (2006), em um estudo com 145 cães, observaram 7,5% dos cães (11/145) positivos para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, sendo que as cópias, quando sequenciadas, apresentaram 85% de homologia para esse organismo e 96% para o *M. haemocanis*. Os autores sugeriram se tratar de uma nova espécie ou uma variação do *M. haemocanis* (BIONDO et al., 2009). No entanto, nenhum outro estudo foi conduzido para elucidar esse fato.

2.2.3 ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’

Juntamente com o *Mycoplasma haemofelis*, foi classificado como agente causal da Anemia Infecciosa Felina (micoplasmose felina), sendo o *M. haemofelis*, responsável por uma anemia hemolítica, e o *M. haemominutum*, uma cepa menos patogênica. Anteriormente ao ano de 2005, tais organismos eram classificados como *Haemobartonella felis* isolado de Ohio e *Haemobartonella felis* isolado da Califórnia, com base nas características morfológicas. Com a avaliação da sequência dos genes 16S rRNA e *rnpB*, foram removidos do táxon e reclassificados no gênero *Mycoplasma* (MESSICK & HARVEY, 2015). A similaridade genética do gene 16S rRNA entre ambos é de 83% (FOLEY & PEDERSEN, 2001).

A ocorrência do ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em cães já foi verificada em Londrina, Estado do Paraná (BIONDO et al., 2009), na Província de Guangdong, China (ZHUANG et al., 2009) e, recentemente, no Japão (OBARA et al., 2011). Através da PCR convencional para o gene 16S rRNA usando *primers* universais, o estudo chinês identificou um animal positivo entre 40 cães saudáveis. A sequência do isolado apresentou 97 a 99% de similaridade com o ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 94 a 95% de similaridade com o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’.

Em gatos, foi sugerido que as pulgas (*Ctenocephalides felis*) fossem responsáveis pela transmissão, tanto do *M. haemofelis* quanto do ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (WOODS et al., 2005). No entanto, em cães ainda não existem estudos que sugiram o papel das pulgas na transmissão dos hemoplasmas.

2.2.4 ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’

Essa nova espécie de hemoplasma foi recentemente descrita na Suíça, sendo responsável por causar anemia hemolítica em gatos, após a inoculação intravenosa de sangue infectado, em um gato livre de patógenos (WILLI et al., 2005). Posteriormente, através de estudos moleculares, determinou-se tratar de um organismo semelhante ao *Mycoplasma coccoides* e *Mycoplasma haemomuris*, ambos micoplasmas hemotróficos de roedores (WILLI et al., 2006).

Apesar de o ‘*Candidatus M. turicensis*’ nos felinos apresentar distribuição mundial, em cães, até o presente momento, há apenas um relato da identificação em 7/10 cães esplenectomizados assintomáticos, diagnóstico realizado pela técnica da PCR convencional otimizada para a detecção do hemoplasma em felinos (SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2009). No sequenciamento, o organismo encontrado em cães apresentava 98 a 100% de similaridade àquele que infecta os felinos domésticos (SANTOS, 2008).

2.3 Transmissão dos hemoplasmas em cães

A transmissão natural do *M. haemocanis* no cão ainda não está completamente esclarecida. A infecção experimental foi verificada em 1973 (SENEVIRATNA et al., 1973),

quando se conseguiu transmitir a doença para um canino esplenectomizado, através do carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*). Dessa forma, foi sugerido que o carrapato fosse o vetor da transmissão dos hemoplasmas para o cão (BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK, 2003; SYKES et al., 2004; MESSICK & HARVEY, 2015). Até o presente momento, não existem estudos verificando o papel das pulgas na transmissão dos hemoplasmas em cães, assim como já foi verificado para hemoplasmas em felinos (HORNOK et al., 2010).

Em gatos, os estudos moleculares demonstraram a presença de DNA dos hemoplasmas ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* em pulgas e fezes recolhidas de gatos (WILLI et al., 2007). Os autores defenderam que a avaliação da presença de hemoplasmas e organismos rickettsiais em carrapatos e pulgas é necessária para elucidar completamente o papel desses vetores na transmissão da doença ao cão.

Outras formas de transmissão dos hemoplasmas foram descritas, mas até o presente momento, não há um completo conhecimento dos mecanismos que as envolvem. A forma iatrogênica, através de transfusões sanguíneas, pode transmitir o hemoplasma e outros agentes para cães receptores (LUMB, 1957; MacWILLIAMS & FURNEAUX, 1973; LESTER et al., 1995; MESSICK, 2003; MESSICK & HARVEY, 2015). É consenso no Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) que testes de triagem para a detecção do *M. haemocanis* devem ser realizados em cães utilizados como doadores de sangue, pois a maioria dos cães infectados, assim como os gatos, não apresenta evidências clínicas da doença (WARDROP et al., 2005).

A contaminação iatrogênica já foi sugerida em um canino, com ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (SYKES et al., 2004). A presença de micro-organismos de *Mycoplasma* spp. no esfregaço sanguíneo de cães que receberam sangue de um cão infectado por via oral, já foi relatada (LUMB, 1957) e considerou-se que a presença de lesões no trato gastrointestinal superior é facilitadora da infecção. Com relação à transmissão através do leite materno, ainda não há comprovações. Ainda nesse aspecto, a ingestão acidental de sangue em brigas (SASAKI et al., 2008), além do contato com secreções vaginais do estro, não foram esclarecidas como fontes contaminantes, até o presente momento.

Estudos experimentais para demonstrar a transmissão intrauterina não obtiveram sucesso, embora haja evidências indiretas de que possa ser possível (LUMB, 1957; KRAKOWKA et al., 1977; MESSICK & HARVEY, 2015). Uma suspeita de transmissão transplacentária foi verificada em cães livres de patógenos, com seis dias de idade, inoculados com o vírus da cinomose canina e que apresentaram inclusões de *M. canis* dias após a inoculação. Nesse caso, foi sugerido que os efeitos imunossupressores do vírus da cinomose foram determinantes para o desenvolvimento da hemoplasmose nesses cães, que supostamente adquiriram a infecção transplacentária (KRAKOWKA et al., 1977).

Na infecção pelos *M. haemocanis*, o período pré-patente após a inoculação intravenosa de sangue contaminado, em caninos esplenectomizados, é entre um ou dois dias a duas semanas ou mais (LESTER et al., 1995). Os sinais clínicos da infecção já foram identificados em até 9 semanas após o início do tratamento de hemangiossarcoma esplênico (esplenectomia, transfusão sanguínea e quimioterapia) em um cão (BRINSON & MESSICK, 2001). Nesse caso, o cão desenvolveu uma anemia persistente atribuída à uma infecção crônica.

2.4 Diagnóstico dos hemoplasmas

Durante a parasitemia, os organismos podem ser observados em esfregaços de sangue periférico, porém, com reduzida especificidade e sensibilidade diagnóstica (BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK et al., 2004; CHALKER, 2005). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos hemoplasmas é consagrada como um teste padrão ouro,

já que os esfregaços sanguíneos corados não são específicos e sensíveis para detecção na maioria das espécies.

No caso do *M. haemocanis*, um tempo prolongado entre a coleta e a análise pode remover o agente da membrana eritrocitária, não sendo possível observar nos esfregaços sanguíneos. Em contrapartida, os resultados falso-positivos também podem estar evidentes, visto que artefatos de corante e corpúsculos de Howell-Jolly podem ser confundidos com o agente (KEMMING et al., 2004b).

A PCR convencional e a PCR em tempo real têm sido amplamente utilizadas com elevada especificidade e sensibilidade, permitindo obter o diagnóstico e, através do sequenciamento do fragmento amplificado, comparar a composição filogenética dos hemoplasmas (MESSICK, 2003; KENNY et al., 2004). Devido à intensa similaridade genética do gene 16S rRNA entre os hemoplasmas caninos e felinos, para a amplificação do agente em caninos são utilizadas as mesmas sequências iniciadoras (*primers*) para a detecção dos hemoplasmas felinos, sendo *M. haemofelis* para *M. haemocanis*, e, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ (BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002; MESSICK et al., 2002; SANTOS, 2008).

2.5 Patogenia da hemoplasmosse

Os mecanismos responsáveis pela indução de dano aos eritrócitos por hemoplasmas ainda não foram completamente elucidados. Sugere-se que os hemoplasmas alteram a forma e a capacidade de deformabilidade dos eritrócitos, o que interfere na perfusão tecidual e na liberação de oxigênio no nível da microcirculação, induzindo o sequestro de eritrócitos devido a fagocitose de hemoparasitos (KEMMING et al., 2004a,b). A hemólise imunomediada também pode contribuir para a compreensão dos mecanismos e dos fatores de virulência e patogenicidade dos micoplasmas caninos. Algumas espécies podem causar hemólise em meio de cultivo ágar-sangue, indicando a possível produção de enzimas hemolíticas (CHALKER, 2005).

A adesão destes hemoparasitos aos eritrócitos resulta em dano direto à membrana celular e conseqüentemente na redução de sua vida útil (TASKER, 2004). Há dois mecanismos envolvidos na ocorrência da anemia: hemólise intra e extravascular. Os hemoplasmas induzem alteração estrutural ao se ligarem na superfície dos eritrócitos, resultando em modificação antigênica ou exposição de antígenos localizados internamente na membrana celular com conseqüente produção de anticorpos anti-eritrocitários pelo hospedeiro.

Já na hemólise extravascular, há sequestro e fagocitose dos eritrócitos por macrófagos do baço, fígado, pulmão e medula óssea (TASKER, 2010), além de determinar a ocorrência de anemia hemolítica imunomediada (AHIM) secundária (VILLIERS, 2005). Quando ocorre a fixação do complemento pelas imunoglobulinas, há aumento da fragilidade osmótica levando à hemólise intravascular (TASKER, 2010).

Em estudo realizado por Pitorri e colaboradores (2012), presuntivamente foi diagnosticada a anemia hemolítica com base na ocorrência de uma grave anemia regenerativa na ausência de manifestação clínica de perda de sangue interna ou externa. No entanto, não foi realizado o teste de Coomb's, não observaram na avaliação parasitológica direta a presença de esferocitose e nem a ocorrência de autoaglutinação, o que possibilitaria outras evidências da possibilidade de anemia hemolítica imunomediada.

Enquanto investigava-se uma possível correlação entre anemia hemolítica imunomediada e micoplasmas hemotrópicos em 227 cães no Reino Unido, verificou-se que os 37 cães anêmicos com AHIM primária, os 77 cães com anemia que não satisfaziam os critérios

de inclusão para AHIM primária, e os 113 cães sem anemia foram todos negativos para hemoplasmas caninos pela PCR em tempo real (WARMAN, et al., 2010).

2.6 Sinais clínicos e achados laboratoriais

Dentre os sinais clínicos que podem ser observados nos cães com hemoplasmas, cita-se anorexia, letargia, perda de peso, inapetência, febre e mucosas pálidas. Os esfregaços sanguíneos podem apresentar anisocitose, poiquilocitose, policromasia, corpúsculo de Howell-Jolly e corpos de inclusão semelhantes a cocos e/ou formas de cadeia na superfície dos eritrócitos (BUNDZA et al., 1976; KEMMING et al., 2004a). Ocorrência de teste de Coomb's indireto positivo, contribui diretamente para o diagnóstico da anemia autoimune (BUNDZA et al., 1976).

As infecções crônicas, em fase de latência, podem ser reativadas devido às doenças concomitantes, como erliquiose (INOKUMA, 2006), babesiose (BAKER et al., 1971; WRIGHT, 1971) e septicemia (PRYOR & BRADBURY, 1975; NOVACCO et al., 2010). Alterações na resposta imunológica podem explicar o desenvolvimento de infecções oportunistas em alguns animais com hemoplasmoses latente.

Ainda há falta de informações sobre o curso clínico da doença em cães infectados com '*Candidatus M. haematoparvum*', '*Candidatus M. haemominutum*' e '*Candidatus M. turicensis*'. Por outro lado, a infecção por *M. haemocanis*, que é encontrado em todo o mundo, geralmente induz a anemia clinicamente significativa, particularmente em cães imunocomprometidos (BRINSON & MESSICK, 2001; INOKUMA et al., 2006; NOVACCO et al., 2010; RAMOS et al., 2010).

2.7 Infecção em cães domésticos

A importância da infecção pelos hemoplasmas no cão está na severidade da doença aguda, na possibilidade de desenvolvimento de um estado de portador crônico (MESSICK, 2004), na perpetuação do organismo em canis (KEMMING et al., 2004b) e na interferência dos resultados de pesquisa, quando o cão é usado como modelo experimental para o estudo de afecções em humanos (BAKER et al., 1971; PRYOR & BRADBURY, 1975; KEMMING et al., 2004a; MESSICK & HARVEY, 2015). Outro fato a ser considerado é o potencial zoonótico que os hemoplasmas podem ter e que ainda não foi completamente esclarecido em nenhuma das espécies de hemoplasma.

Os sinais clínicos da infecção pelos hemoplasmas em cães são variáveis e a severidade da doença depende de fatores ainda não tão bem esclarecidos. Dentre eles, pode-se referir à espécie infectante e à presença de doenças concomitantes ou infecções. As condições da maioria dos estudos (utilizando amostras de conveniência) não foram capazes de inferir sobre a distinção entre os sinais de doença aguda ou crônica (ROURA et al., 2010).

A infecção aguda geralmente é verificada em cães esplenectomizados (BRINSON & MESSICK, 2001; KEMMING et al., 2004a) e imunocomprometidos. Nas situações em que há infecções concomitantes, como babesiose (WRIGHT, 1971; TRAPP et al., 2006) e erliquiose (INOKUMA et al., 2006), septicemias de origem não específicas (PRYOR & BRADBURY, 1975; KRAJE, 2001) e terapia imunossupressora (HANDCOCK, 1989; HOSKINS, 1991; LESTER et al., 1995), os sinais clínicos são variáveis e inespecíficos, tais como anorexia, letargia, perda de peso e febre (LUMB, 1957; LESTER et al., 1995; BRINSON & MESSICK, 2001; KEMMING et al., 2004a; MESSICK, 2004) ou prostração e anemia, com temperatura retal e apetite normais (MESSICK & HARVEY, 2015) em cães experimentalmente infectados..

Cães não esplenectomizados que possuem a doença latente podem manifestar sintomas, quando submetidos a esplenectomia (MacWILLIAMS & FURNEAUX, 1973), expostos à

situações de estresse ou com doenças concomitantes (LUMB, 1957; 2001). Uma anemia hemolítica severa também pode ser identificada na fase aguda da doença (BRINSON & MESSICK, 2001; KEMMING et al., 2004a; MESSICK, 2004; CHALKER, 2005; WENGI et al., 2008). Essa fase é caracterizada pela presença de sinais clínicos e uma parasitemia, verificada no esfregaço sanguíneo corado, que pode variar conforme os diferentes graus da doença (KRAJE, 2001).

A infecção crônica pode ser observada em cães não esplenectomizados, em que os sinais clínicos da doença são inaparentes (LUMB, 1957; MESSICK & HARVEY, 2015) ou inespecíficos (HOSKINS, 1991; MESSICK, 2004). Anorexia, letargia, perda de peso e febre já foram observados em animais cronicamente infectados (CHALKER, 2005). A parasitemia é discreta e, por isso, os organismos podem ser encontrados na circulação em um número reduzido (MESSICK, 2004; KEMMING et al., 2004b). No entanto, caso haja uma infecção concomitante ou esplenectomia, os sinais clínicos passam a ser aparentes ou até mesmo os organismos podem ser observados em esfregaços sanguíneos (LUMB, 1957).

2.8 Prevalência mundial

A comparação entre os resultados provenientes dos estudos de prevalência no mundo é prejudicada, uma vez que as amostras são, na maioria, obtidas de cães de hospitais veterinários ou abrigos. Existe uma grande variabilidade na taxa de prevalência entre países do mesmo continente, que pode ser atribuída à condição geográfica e climática dos locais estudados (NOVACCO et al., 2010). No entanto, é relevante para o estudo dos hemoplasmas caninos, conhecer a prevalência e o tipo de população mais suscetível, já que a infecção é inaparente e significativa apenas quando, por algum motivo, houver esplenectomia, imunossupressão ou estresse (MESSICK, 2003).

Na França, em um total de 460 amostras de sangue de cães, 71 (15,4%) foram positivas para *Mycoplasma* spp., sendo que 44 (9,6%) para *M. haemocanis*, 15 (3,3%) para '*Candidatus M. haematoparvum*' e 12 (2,6%) para ambos. Embora, no estudo, os autores tenham utilizado uma técnica específica da PCR em tempo real para a detecção dos hemoplasmas em cães, o organismo foi muito semelhante geneticamente ao '*Candidatus M. haemominutum*', já que o protocolo foi baseado na composição genética desse organismo. O estudo se refere ao primeiro relato de '*Candidatus M. haematoparvum*' na Europa (KENNY et al., 2004).

Baixa prevalência (1,2%) da infecção pelos hemoplasmas (WENGI et al., 2008) foi identificada na Suíça, onde 0,9% (8/889) das amostras avaliadas foram positivas para *M. haemocanis*, e 0,3% (3/889) para '*Candidatus M. haematoparvum*', na PCR em tempo real. Os autores acreditam que a condição climática foi desfavorável para a sobrevivência do vetor, *Rhipicephalus sanguineus* (WENGI et al., 2008; NOVACCO et al., 2010; WILLI et al., 2010) e por isso houve uma reduzida frequência dos hemoplasmas. Nesse estudo, os cães positivos possuíam histórico de viagens para países de climas quentes e foi sugerido que a infecção foi adquirida nessa ocasião. Um reduzido número de produtos da PCR, observados nos cães positivos para ambos os hemoplasmas, principalmente para o '*Candidatus M. haematoparvum*', foi a justificativa que os autores sugeriram para não haver maior sensibilidade no estudo.

Na Espanha, foram identificados 14,3% (26/182) de cães positivos para os hemoplasmas, sendo que apenas um foi positivo para o '*Candidatus M. haematoparvum*', anteriormente apenas observado na França, Japão, Suíça e Norte da Tanzânia e Trinidad e Tobago (ROURA et al., 2010). A avaliação da prevalência dos hemoplasmas na Europa mediterrânea identificou uma frequência significativamente superior em Portugal, onde 40% das 50 amostras de sangue de cães foram positivas para o *M. haemocanis*. O estudo concluiu que existe uma grande diferença da frequência dos hemoplasmas entre os países da Europa (NOVACCO et al., 2010; WILLI et al., 2010) em decorrência das condições geográficas.

Na China, com a amplificação do gene 16S rRNA de 40 amostras de sangue de cães saudáveis, foi detectada a presença de um hemoplasma que apresentava 99% de similaridade com o ‘*Candidatus M. haemominutum*’ dos felinos e 95% com o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (ZHUANG et al., 2009).

Em Trinidad e Tobago e na Tanzânia, onde o *R. sanguineus* é difundido, foi avaliada a presença dos hemoplasmas em cães, através da PCR em tempo real. Nas amostras de cães de vida livre, na Tanzânia, 19% (19/100) foram positivas para *M. haemocanis* e apenas um cão foi positivo para ambos os hemoplasmas. Já em Trinidad e Tobago, em amostras obtidas em um laboratório clínico, 4,9% (9/184) foram positivas para *M. haemocanis*, 2,7% (5/184) positivas para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e 1,1% (2/184) positivas para ambos os hemoplasmas (BARKER et al., 2010).

Um estudo japonês verificou a infecção pelos hemoplasmas em canídeos silvestres, onde em 12 carcaças de raposas (*Vulpis* sp.) analisadas, uma foi positiva para o *M. haemocanis*. Os autores sugeriram que o organismo pode ser transmitido entre cães e raposas através do mesmo vetor.

O primeiro estudo realizado para detecção de doenças transmitidas por carrapatos no continente africano evidenciou no Sudão que, dos 78 cães de vida livre amostrados, 63 eram positivos para *Ehrlichia canis* e 33 para os hemoplasmas *M. haemocanis* e/ou ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. Nos cães infectados pelos hemoplasmas, os autores verificaram que três apresentavam infecção simples, enquanto os demais apresentavam coinfeção pela *E. canis* ou *Anaplasma platys*. Os autores concluíram que a coinfeção pode causar uma doença severa e que o carrapato tem um papel importante nas coinfeções em cães (INOKUMA et al., 2006).

2.9 Prevalência no Brasil

Até o presente momento, não existem estudos de prevalência dos hemoplasmas caninos no Brasil, onde os relatos geralmente estão relacionados a estudo de casos isolados. O *M. haemocanis* já foi descrito nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (DANTAS-TORRES, 2008), onde o diagnóstico foi baseado na observação dos organismos em esfregaços de sangue periférico, técnica pouco sensível e específica para o diagnóstico dos hemoplasmas.

Recentemente, no Recife, através de métodos moleculares para detecção de doenças transmitidas por vetores em cães, foi identificado um cão positivo para o *M. haemocanis* (RAMOS et al., 2010).

No Rio Grande do Sul, o primeiro registro de um cão positivo para *M. haemocanis* foi em 1992, em Porto Alegre. Os autores não avaliaram a epidemiologia isolada desse agente, no entanto, dos 316 esfregaços analisados, 27% (85/316) foram positivos para algum tipo de parasita sanguíneo (BRACCINI et al., 1992).

No estado do Paraná, em um grupo de 16 cães, foram encontrados quatro animais positivos para *Babesia gibsoni* (genótipo asiático), onde dois animais tinham coinfeção por *M. haemocanis* (TRAPP et al., 2006). Através da PCR convencional de amostras de 40 cães, foram identificados quatro cães não esplenectomizados infectados pelo *M. haemocanis* (de MORAIS et al., 2003). O primeiro caso de hemoplasma pequeno em um cão (de MORAIS et al., 2006) e a coinfeção por *E. canis* foram registrados no Estado do Paraná. Nesse caso, o gene 16S rRNA do agente era molecularmente similar ao ‘*Candidatus M. haemominutum*’ dos felinos (97% de homologia).

2.10 Animais de companhia

Ainda que hemoplasmas tenham sido encontrados com certa frequência em esfregaços de sangue de gatos no Brasil, técnicas moleculares para detecção de espécies de micoplasmas

hemotróficos têm aumentado a sensibilidade de detecção em gatos anêmicos e não anêmicos, de diferentes regiões do país.

As três espécies correntemente conhecidas de hemoplasmas felinos (*Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’) foram molecularmente detectadas em gatos domésticos e silvestres, no Brasil (de MORAIS et al., 2007; WILLI et al., 2007; SANTOS, 2008).

Levantamento utilizando PCR comparou resultados de 80 gatos sadios e 74 doentes, em Botucatu, São Paulo e verificou que oito (10%) gatos sadios e 15 (20%) gatos sintomáticos foram positivos para *M. haemofelis* e/ou ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (BATISTA, 2004). De 23 amostras positivas, em onze se identificaram *M. haemofelis*, em quatro ‘*C. M. haemominutum*’, e em oito havia coinfeção por ambos. A associação entre os sinais clínicos e a infecção com *M. haemofelis* foi observada, sugerindo alta virulência de *M. haemofelis*, quando comparada a ‘*C. M. haemominutum*’.

Cento e quarenta e nove gatos do Rio de Janeiro também foram testados para hemoplasmas utilizando as técnicas de PCR e *Southern blot*: 15 (10%) foram positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’, 6 (4%) para *M. haemofelis*, e 3 (2%) coinfectados com ambos (MACIEIRA et al., 2006; MACIEIRA et al., 2008); oito amostras positivas foram selecionadas para sequenciamento do gene 16S rRNA e mostrou 100% de identidade para sequências publicadas no GenBank.

Comparações de frequências de hemoplasmas entre diferentes estudos devem ser feitas com muita cautela. Diferenças nas características populacionais dos animais, bem como entre as técnicas diagnósticas, provavelmente influenciam os resultados. Além disso, o fato de que nem todos os hemoplasmas são avaliados em cada estudo, confunde ainda mais a habilidade para comparar os resultados.

Contudo, a prevalência de hemoplasmas de gatos parece variar entre cidades do Sul e Sudeste do Brasil. A infecção por hemoplasmas em gatos anêmicos variou de 8.5% em São Paulo a 38% em Curitiba. Estudos utilizando amostras de gatos anêmicos e não anêmicos mostrou uma prevalência de 16% no Rio de Janeiro e 15% em Botucatu. Gatos infectados com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) somente, ou em associação com o vírus da leucemia felina (FeLV), apresentaram maior risco de infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ do que gatos retrovirais negativos, em estudos realizados no Rio de Janeiro e em São Paulo (HORA, 2008; MACIEIRA et al., 2008). Assim, pode-se concluir que infecções por hemoplasmas são comuns em gatos do Sul e Sudeste do Brasil.

Conhecidamente, cães são infectados com pelo menos dois hemoplasmas: *Mycoplasma haemocanis* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. *M. haemocanis* foi descrito em esfregaços de sangue de cães oriundos de Belo Horizonte, Sudeste do Brasil (O’DWYER et al.1997), e posteriormente caracterizado pela PCR em quatro cães não esplenectomizados de um hospital veterinário em Londrina, Paraná, Sul do Brasil (de MORAIS et al., 2003), bem como em outras populações caninas (TRAPP et al., 2006; SANTOS, 2008).

Recentemente, um levantamento com PCR foi conduzido em Belo Horizonte e regiões vizinhas, para comparar taxas de infecção por *M. haemocanis* entre áreas urbanas e rurais. Vinte (11.3%) de 176 cães vivendo em áreas rurais foram positivos, enquanto que em seis de 104 cães (5.8%) oriundos de áreas urbanas identificou-se o organismo. Ainda que um levantamento com 78 doadores de sangue, sadios, em São Paulo, não tenha revelado amostras positivas para *M. haemocanis*, as análises foram feitas apenas com esfregaços de sangue, faltando, desta forma, sensibilidade e especificidade diagnósticas (SANTOS, 2008).

Um levantamento com PCR para *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ foi realizado em Londrina, Paraná (SANTOS, 2008): um total de 147 cães com pelo menos uma anormalidade laboratorial (leucopenia, trombocitopenia, pancitopenia ou anemia) foram testados, resultando em duas (1.4%) amostras positivas para *M. haemocanis* e 11 (7.5%) para

'*Candidatus M. haematoparvum*'. Entretanto, o sequenciamento por PCR de '*Candidatus M. haematoparvum*' foi apenas 85% similar ao '*Candidatus M. haematoparvum*' descrito por Sykes et al. (2004), porém, mostrou até 96% de homologia ao *M. haemofelis* e 96% ao *M. haemocanis*. Estes resultados sugerem que, ainda que amplificado por um protocolo padrão para '*Candidatus M. haematoparvum*', esta espécie particular de hemoplasma é filogeneticamente mais relacionada a *M. haemocanis* do que ao '*Candidatus M. haematoparvum*'. Até o presente momento, é desconhecido se este organismo é uma espécie nova de hemoplasma ou uma raça variante de *M. haemocanis*.

Ainda, dois outros novos hemoplasmas foram identificados pela técnica de PCR em cães do Brasil (SANTOS, 2008). Um hemoplasma canino mais similar ao '*Candidatus M. haemominutum*' (98% de identidade na sequência do gene 16S rRNA) do que ao '*Candidatus M. haematoparvum*' foi detectado por PCR em um cão de Londrina, e um novo hemoplasma com 98 a 100% de identidade com o '*Candidatus M. turicensis*' encontrado em gatos também foi amplificado em sete de 10 cães esplenectomizados de Porto Alegre (SANTOS, 2008). Mais uma vez, não está esclarecido se esta é uma nova espécie de hemoplasma canino ou uma demonstração de que o '*Candidatus M. turicensis*' também pode infectar cães.

2.11 Saúde pública

Micoplasmas hemotróficos infectam uma ampla variedade de mamíferos, havendo uns poucos relatos de infecções humanas. Recentemente, o primeiro caso molecularmente documentado de uma infecção humana por hemoplasma foi descrito no Brasil, onde um organismo semelhante ao *Mycoplasma haemofelis* foi detectado em um paciente positivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e coinfectado com *Bartonella henselae* (SANTOS et al., 2008). Ainda que este achado possa representar um caso isolado, sem consequência epidemiológica, enfatiza a necessidade de mais pesquisas sobre o potencial zoonótico das espécies de hemoplasmas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O estudo foi conduzido no município de Araguaína (07° 11' 28" S, 48° 12' 26" O), Tocantins, região Norte do Brasil e parte integrante da chamada “Amazônia Legal Brasileira”. Araguaína é um município compreendido na região entre os rios Lontra e Andorinha, pertencente à mesorregião Ocidental do Tocantins, que ocupa uma área de 4000.4 Km² e apresenta clima tropical úmido.

3.2 Amostragem

Foram avaliadas 204 amostras obtidas de cães domésticos provenientes de áreas urbana e rural do município de Araguaína (Figura 3). Um total de 105 amostras foram obtidas na área urbana de Araguaína, compreendendo os seguintes bairros: Vila Couto Magalhães (n=9), Tiúba (n=8), Setor Palmas (n=9), Tereza Hilário (n=8), Senador (n=10), Araguaína Sul (n=22), São João (n=30) e Barros (n=9). E 99 amostras foram obtidas de nove propriedades e povoados rurais, nas seguintes localidades da região de Araguaína: Fazenda Nossa Senhora de Fátima (n=3), Fazenda Serra das Palmeiras (n=17), Povoado Novo Horizonte (n=7), Povoado Jarcilândia (n=10), Chácara Triângulo (n=15), Fazenda Amazonas (n=4), Povoado Floresta (n=21), Fazenda Bela Vista (n=6) e Povoado Araçulândia (n=16).

Previamente a amostragem de sangue, os responsáveis pelos animais foram devidamente esclarecidos sobre os termos do projeto, objetivos e importância do estudo e, posteriormente, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado (Anexo A), permitindo a coleta do sangue e o uso do material na presente pesquisa. Anteriormente à coleta de sangue dos animais, realizou-se exame clínico, além de anamnese e histórico, dados obtidos a partir de um questionário (Anexo B).

No momento da obtenção de sangue foram coletados dados relacionados ao hospedeiro, como: idade, padrão racial, sexo, e ao local (tipo de moradia, forma/frequência de limpeza e identificação do povoado/propriedade). As amostras foram coletadas por conveniência, de acordo com a disponibilidade dos responsáveis, sem considerar, idade, padrão racial ou sexo.

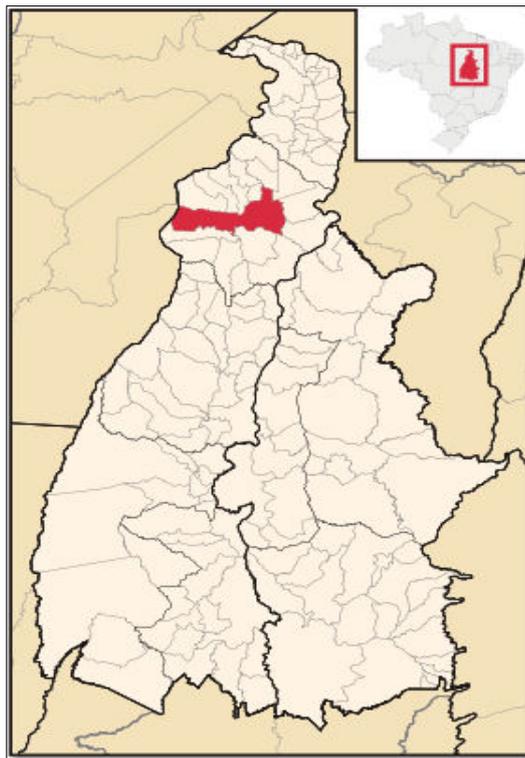


Figura 3. Local de obtenção das amostras de sangue de cães domésticos oriundos de áreas urbana e rural do município de Araguaína (em destaque), Tocantins, Brasil.

3.3 Coleta de Sangue

As amostras sanguíneas foram obtidas por venopunção cefálica ou jugular (volume mínimo de 2 mL), colocadas em frascos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), acondicionadas em isopor com gelo e, no prazo máximo de 24hs, encaminhadas ao laboratório para análise hematológica; em seguida, foram transferidas para microtubos estéreis e armazenadas à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior utilização nos ensaios de biologia molecular, conforme descrito posteriormente.

3.4 Análises Hematológicas

Os hemogramas foram realizados manualmente, segundo metodologia clássica descrita por Jain (1993), e os parâmetros hematológicos determinados foram: contagem global de hemácias (He) ($\times 10^6/\mu\text{L}$), teor de hemoglobina (Hb) (g/dL), volume globular ou hematócrito (VG ou Ht), determinação dos índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) (fL) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) (%), além de leucometrias global e específica (contagem total e diferencial de leucócitos). Morfologia eritrocitária e leucometria específica (percentual de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, monócitos e basófilos) foram avaliadas em esfregaços sanguíneos corados pelo método Panótico rápido com auxílio de microscópio óptico, em objetiva de imersão 100x (JAIN, 1993).

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.5.1 Extração de DNA de sangue total

Alíquotas individuais de 200 µL de sangue total dos cães amostrados foram submetidas ao processo de extração de DNA total utilizando o Kit Relia Prep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®), de acordo com as recomendações do fabricante. Para monitoramento de DNA contaminante durante o processo de extração de DNA total foi utilizado como controle negativo 200 µL de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®) em cada bateria de amostras processadas.

Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à - 80 °C até a realização dos ensaios moleculares.

3.5.2 Reações de Amplificação para hemoplasmas

3.5.2.1 PCR em Tempo Real (qPCR) para *Mycoplasma* spp.

As amostras de DNA obtidas dos cães foram submetidas inicialmente à qPCR baseada no gene que codifica o 16S RNA ribossomal (16S rRNA), cujos fragmentos de 170pb e 190pb amplificados correspondem às espécies *Mycoplasma haemocanis* e ‘*Candidatus* M. haemominutum’, respectivamente. Para esta análise, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores Forward 5’-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3’ e Reverse 5’-ACGCCAATAAATCCGRATAAT-3’, descritos por Kewish et al. (2004).

As reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes especificações: volume final de 12 µL, contendo uma mistura de 1x Power SYBRGreen® PCR Master Mix, 0,625 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3 µL (± 30 ng/µL) de DNA teste ou controle. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos compostos por desnaturação a 95 °C por 20 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 70 segundos.

Após a amplificação, uma curva de dissociação obtida serviu para verificar a especificidade da reação. Foram consideradas positivas amostras com limiar de detecção (C_T) de até 40 ciclos, cujo produto amplificado apresentou a mesma temperatura de dissociação dos controles positivos.

Posteriormente, as amostras positivas foram submetidas à reação com pares de oligonucleotídeos iniciadores mais específicos para cada espécie, baseados no gene 16S rRNA, conforme descrito abaixo.

3.5.2.2 Reação de amplificação específica para *Mycoplasma haemocanis*

As amostras foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmentos de 393pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Hfelis-fl 5’-GACTTTGGTTTCGGCCAAGG-3’ e Hfelis-r3 5’-CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC-3’, descritos por Berent et al. (1998).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (Veriti®, modelo 9902) com as seguintes especificações: volume final de 25 µL, contendo uma mistura de 3 µL de DNA teste ou controle, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de *Taq* polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultrapura esterilizada.

As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos, com 40 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 54 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguidos por extensão final a 72 °C por 7 minutos.

3.5.2.3 Reação de amplificação específica para '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'

As amostras foram submetidas à PCR convencional para amplificação de fragmentos de 488pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Mt-Fw 5'-GTATCCTCCATCAGACAGAA-3' e Mt2-Rv 5'-CGCTCCATATTTAATTCCAA -3', descritos por Santos et al. (2009).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (Veriti[®], modelo 9902) com as seguintes especificações: volume final de 25 µL, contendo uma mistura de 3 µL de DNA teste ou controle, 200 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de *Taq* polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultrapura esterilizada.

As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, com 35 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguidos por extensão final a 72 °C por 5 minutos.

3.5.2.4 Reação de amplificação específica para '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'/'*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'

As amostras foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmentos de 192pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores Cali-F1 5'-GCATAATGTGTCGCAATC-3' e Cali-R1 5'-GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC -3' descritos por Foley et al. (1998).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (Veriti[®], modelo 9902) com as seguintes especificações: volume final de 25 µL, contendo uma mistura de 3 µL de DNA teste ou controle, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de *Taq* polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultrapura esterilizada.

As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, com 38 ciclos compostos por desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 54 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguidos por extensão final a 72 °C por 7 minutos.

3.5.3 Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares

Os controles positivos utilizados em todos os ensaios moleculares de micoplasmas hemotróficos foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Rosângela Zacarias Machado e pelo Prof. Dr. Marcos Rogério André (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, São Paulo), colaboradores do presente estudo. Água ultrapura livre de desoxirribonuclease (DNase) e de ribonuclease (RNase) (UltraPureTM, Invitrogen[®]) foi utilizada como controle negativo das reações.

3.5.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, a 80V, durante 90 minutos e corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 15 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular, de acordo com o tamanho do produto esperado (100pb/1kb DNA Ladder, Invitrogen®). Os resultados foram visualizados e analisados através do transiluminador de luz ultravioleta L-PIX Touch (Loccus biotecnologia®), no qual as bandas observadas nas amostras foram comparadas ao peso molecular para confirmação da amplificação do fragmento esperado.

3.6 Análise estatística

O teste Qui-quadrado ou exato de Fisher, em nível de 5% de significância, foi utilizado para verificar a correlação entre micoplasmas hemotróficos e os dados obtidos, incluindo as alterações hematológicas, bem como as variáveis relativas a idade, padrão racial, sexo, ao tipo de moradia, frequência de limpeza do local e bairros de área urbana e povoados/propriedades rurais de Araguaína.

Os parâmetros hematológicos foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade de *Lilliefors* e quando apresentaram distribuição normal foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste t de *Student*. Entretanto, quando a distribuição dos dados não foi normal, estes foram submetidos ao teste *Mann-Whitney*. Para a realização de todos os testes estatísticos foi utilizado o programa de análise estatística Bioestat 4.0.

4 RESULTADOS

4.1 Diagnóstico molecular de hemoplasmas, baseado no gene 16S rRNA

A detecção molecular de *Mycoplasma* spp. nas amostras de cães domésticos oriundos de áreas urbana e rural do município de Araguaína, Tocantins foi obtida por meio da técnica de PCR em tempo real (qPCR). Na análise dos resultados obtidos, 2,9% (3/105) dos cães amostrados na área urbana e 24,49% (24/99) na área rural apresentaram amplificação do fragmento do gene 16S rRNA (Figura 4), sendo, portanto, considerados positivos. O valor médio de C_T observado nas amostras positivas foi de 31,29 ciclos, com variação entre 22,35 e 44,11 ciclos.

A temperatura de dissociação (T_m) dos produtos amplificados foi semelhante à do controle positivo, indicando a especificidade da reação (Figura 5).

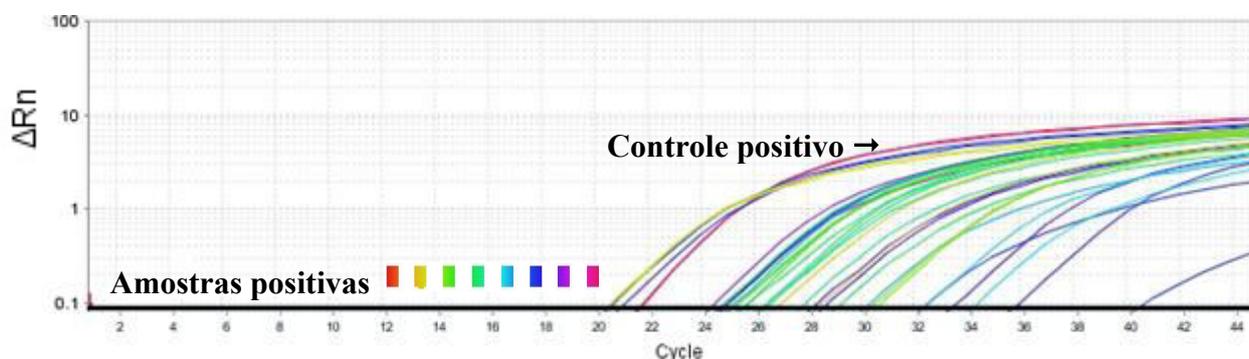


Figura 4. Curva de amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. em amostras de cães domésticos das áreas urbana e rural do município de Araguaína (Tocantins, Brasil), obtida pela PCR em tempo real (Sistema SYBRGreen®). A linha em cor-de-rosa indica o controle positivo; as demais, amostras positivas.

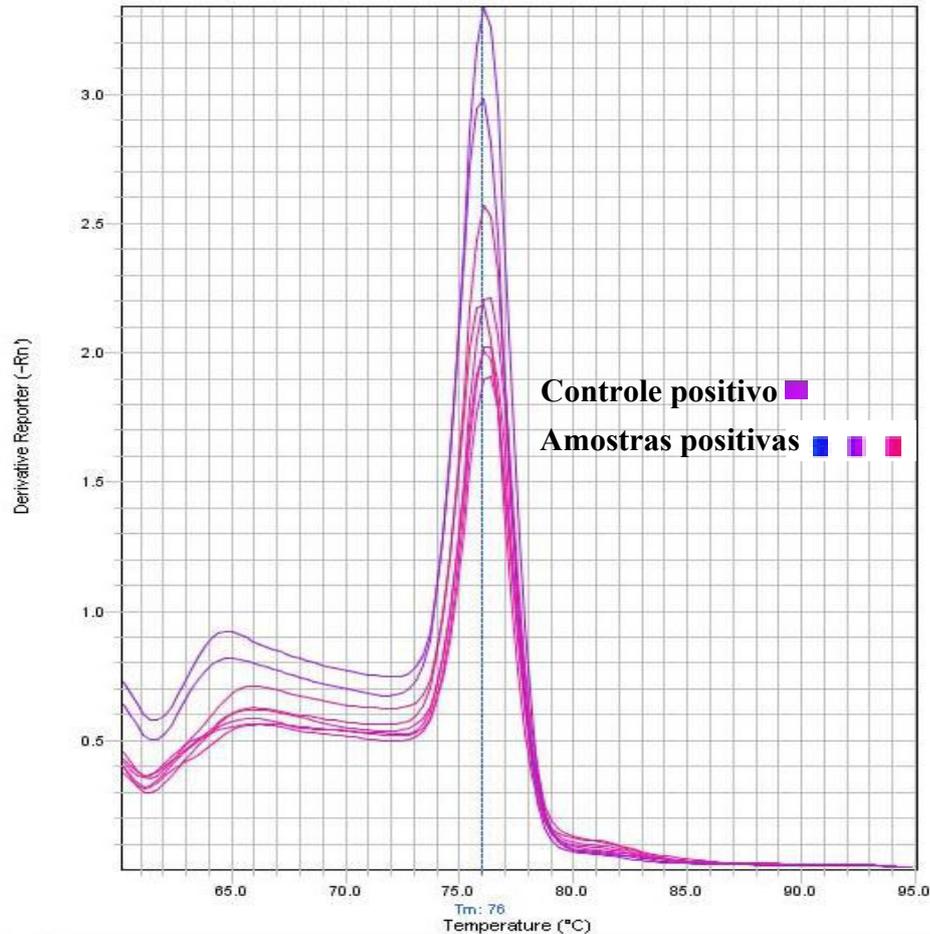


Figura 5. Curva de dissociação do fragmento do gene 16S rRNA do controle positivo e das amostras positivas de cães domésticos oriundos de áreas urbana e rural do município de Araguaína (Tocantins, Brasil), demonstrando a especificidade da reação de amplificação para *Mycoplasma* spp. na PCR em tempo real.

As amostras positivas na qPCR foram posteriormente submetidas à PCR convencional (PCRc) utilizando *primers* específicos para determinação das espécies infectantes. A frequência de positividade constatada na área urbana foi de: 1,9% (2/105) para *Mycoplasma haemocanis* (Figura 6), 0% (0/105) para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e 0% (0/105) para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (Figura 7). A frequência de positividade constatada na área rural, por sua vez, foi de: 13,26% (13/99) para *Mycoplasma haemocanis*, 0% (0/99) para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e 0% (0/99) para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’.

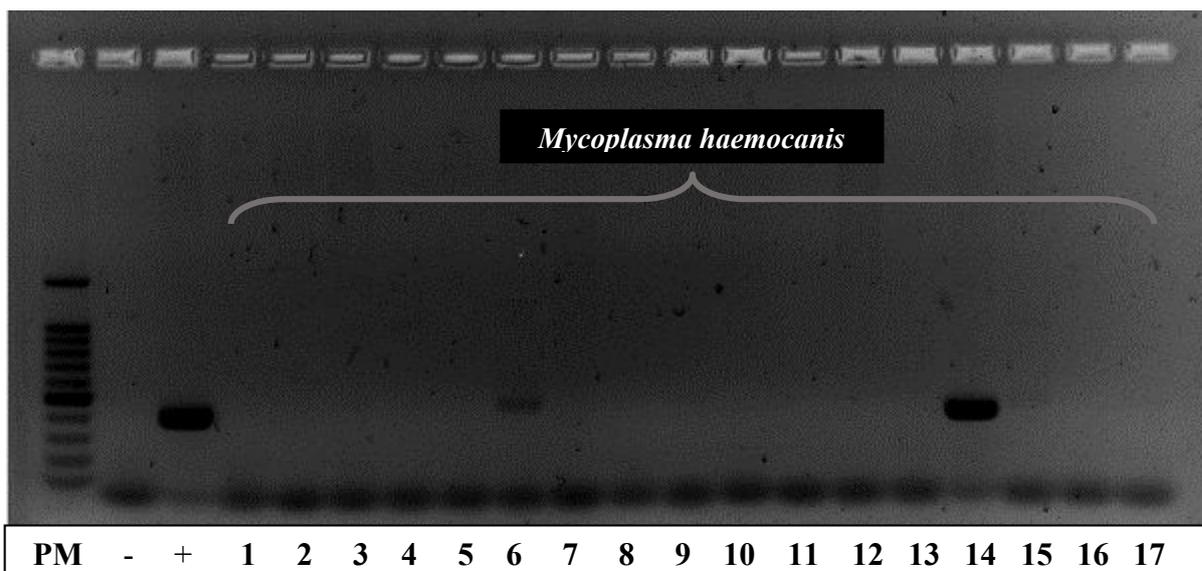


Figura 6. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 393 pares de bases do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemocanis*, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen®); -: controle negativo (água ultrapura); +: controle positivo; canaletas 1 a 5, 7 a 13 e 15 a 17: cães negativos; canaletas 6 e 14: cães positivos.

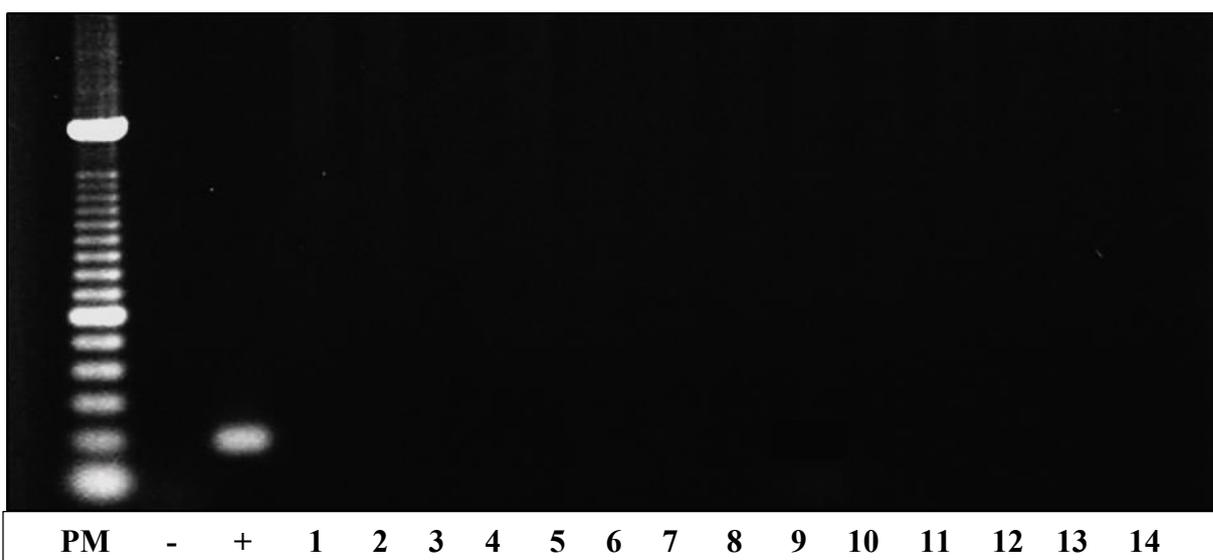


Figura 7. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 192 pares de base do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: controle negativo (água ultrapura); +: controle positivo; canaletas 1 a 14: cães negativos.

4.2 Distribuição de hemoplasmas no município de Araguaína, Tocantins

Foram avaliadas 105 amostras de cães domésticos oriundos de área urbana e 99 amostras de cães de área rural do município de Araguaína no Tocantins. O número de amostras por localidade/propriedade no município de Araguaína e os resultados na técnica qPCR estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Adicionalmente, na Tabela 4 foi correlacionada a positividade para o agente *Mycoplasma* spp. entre as áreas urbana e rural, observando-se associação entre a infecção por hemoplasmas e a área rural ($p=0,000$).

Tabela 2: Frequência de cães domésticos positivos pela PCR em tempo real (qPCR) para *Mycoplasma* spp., oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins.

Bairros	Positivos	Negativos	Total
Araguaína Sul	0 (0,0%) ^a	22 (100,0%) ^a	22
São João	1 (3,3%) ^a	29 (96,7%) ^a	30
Senador	0 (0,0%) ^a	10 (100,0%) ^a	10
Barros	0 (0,0%) ^a	9 (100,0%) ^a	9
Setor Palmas	0 (0,0%) ^a	9 (100,0%) ^a	9
Tereza Hilário	1 (12,5%) ^a	7 (87,5%) ^a	8
Tiúba	1 (12,5%) ^a	7 (87,5%) ^a	8
Vila Couto Magalhães	0 (0,0%) ^a	9 (100,0%) ^a	9

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%.

Tabela 3: Frequência de cães domésticos positivos pela PCR em tempo real (qPCR) para *Mycoplasma* spp., oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins.

Povoado/Propriedade	Positivos	Negativos	Total
Chácara Triângulo	3 (20,0%) ^a	12 (80,0%) ^a	15
Fazenda Amazonas	1 (25,0%) ^a	3 (75,0%) ^a	04
Fazenda Bela Vista	0 (0,00%) ^a	6 (100,0%) ^a	06
Fazenda Nossa Senhora de Fátima	1 (33,3%) ^a	2 (66,6%) ^a	03
Fazenda Serra das Palmeiras	2 (11,8%) ^a	15 (88,2%) ^a	17
Povoado Araçulândia	4 (25,0%) ^a	12 (75,0%) ^a	16
Povoado Floresta	5 (23,8%) ^a	16 (76,2%) ^a	21
Povoado Jarcilândia	3 (30,0%) ^a	7 (70,0%) ^a	10
Povoado Novo Horizonte	5 (71,4%) ^a	2 (28,6%) ^a	07

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%.

Tabela 4: Correlação entre a positividade para o agente *Mycoplasma* spp. em cães domésticos e as áreas urbana e rural do município de Araguaína, Tocantins utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR).

Área	Positivos	Negativos	Total	p-valor
Urbana	3 (2,8%)	102 (97,2%)	105	
Rural	24 (24,2%)	75 (75,8%)	99	0,000

4.3 Análise de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de *Mycoplasma* spp.

4.3.1 Área Urbana

Os valores médios de eritrograma e leucograma dos cães domésticos negativos e positivos para *Mycoplasma* spp., estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Nos resultados de parâmetros hematológicos foram observados valores médios de hemácias abaixo do valor de referência em ambos os grupos, entretanto, valores médios de hematócrito estavam dentro dos referenciais, em ambos os grupos. Diante destes resultados, anemia foi verificada, tanto nos animais positivos quanto nos negativos para *Mycoplasma* spp.

Os valores médios dos parâmetros volume globular médio (VGM), bastões e linfócitos de ambos os grupos se apresentaram superiores aos determinados como referência para espécie. Assim, nos animais provenientes de área urbana utilizados neste estudo, pode-se caracterizar os resultados do hemograma como sendo anemia macrocítica normocrômica, discreto desvio neutrofílico nuclear à esquerda (DNNE) e linfocitose.

Tabela 5: Análise descritiva de parâmetros relacionados ao eritrograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para *Mycoplasma* spp., oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins.

Parâmetro	Resultado	N	Média	Mínimo	Máximo	DP	EP	Referência*
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Positivo	3	4,2	3,3	5,1	0,9	0,5	5,5 - 8,5
	Negativo	102	5,3	0,3	10,9	2,0	0,2	
Hematócrito (%)	Positivo	3	42,7	34,0	47,0	7,5	4,3	37,0 - 55,0
	Negativo	102	38,5	15,0	54,0	8,3	0,8	
Hemoglobina (g/dL)	Positivo	3	13,7	10,2	16,5	3,2	1,9	12,0 - 18,0
	Negativo	102	12,8	5,9	18,3	2,9	0,3	
VGM (fL)	Positivo	3	102,1	93,1	108,8	8,1	4,7	60 - 77
	Negativo	102	85,2	34,1	600,0	58,4	5,8	
CHGM (%)	Positivo	3	31,9	30,0	35,1	2,8	1,6	31 - 34
	Negativo	102	33,6	23,1	55,0	5,1	0,5	

VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média N: número de cães; Mínimo: limite mínimo; Máximo: limite máximo; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. *Valores de referência segundo Jain (1993).

Tabela 6. Análise descritiva de parâmetros relacionados ao leucograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para *Mycoplasma* spp., oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins.

Parâmetro	Resultado	N	Média	Mín.	Máx.	DP	EP	Referência*
Leucócitos totais (x10 ³ /µL)	Positivo	3	14,73	11,60	16,50	2,72	1,57	6 - 17
	Negativo	102	14,06	4,60	28,30	4,84	0,48	
Monócitos (x10 ³ /µL)	Positivo	3	0,28	0,17	0,35	0,10	0,06	0,15 - 1,35
	Negativo	102	0,18	0,00	2,24	0,29	0,03	
Eosinófilos (x10 ³ /µL)	Positivo	3	0,40	0,00	1,04	0,56	0,32	0,1 - 1,25
	Negativo	102	0,99	0,00	3,63	0,83	0,08	
Segmentados (x10 ³ /µL)	Positivo	3	6,02	5,45	6,50	0,53	0,31	3 - 11,5
	Negativo	102	5,94	0,87	13,24	2,86	0,28	
Bastões (x10 ³ /µL)	Positivo	3	0,70	0,00	2,09	1,21	0,70	0 - 0,3
	Negativo	102	0,56	0,00	2,35	0,55	0,05	
Linfócitos (x10 ³ /µL)	Positivo	3	7,34	3,71	10,89	3,59	2,07	1 - 4,8
	Negativo	102	6,36	1,73	16,00	2,92	0,29	
Basófilos (x10 ³ /µL)	Positivo	3	--	--	--	0,00	0,00	Raros
	Negativo	102	0,03	0,00	0,29	0,06	0,00	

N: número de cães; Mín.: limite mínimo; Máx.: limite máximo; DP: desvio padrão; EP: erro padrão. *Valores de referência segundo Jain (1993).

A avaliação por frequência das alterações hematológicas observadas nos animais positivos e negativos demonstrou não haver associação estatística com a infecção por *Mycoplasma* spp. (Tabela 7).

Tabela 7. Alterações hematológicas associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR), oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins.

Alteração hematológica		qPCR <i>Mycoplasma</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos (n= 3)	Negativos (n= 102)	
Anemia (He, Hg, Ht)	Sim	1 (33,3) ^a	39 (38,2) ^a	1,000
	Não	2 (66,7)	63 (61,8)	
VGM reduzido	Sim	0 (0,0) ^a	21 (20,6) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	81 (79,4)	
VGM aumentado	Sim	3 (100,0) ^a	53 (52,0) ^a	0,2462
	Não	0 (0,0)	49 (48,0)	
CHGM reduzido	Sim	0 (0,0) ^a	21 (20,6) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	81 (79,4)	
CHGM aumentado	Sim	3 (100,0) ^a	52 (51,0) ^a	0,2445
	Não	0 (0,0)	50 (49,0)	
Leucopenia	Sim	0 (0,0) ^a	16 (15,7) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	86 (84,3)	
Leucocitose	Sim	0 (0,0) ^a	25 (24,5) ^a	0,5786
	Não	3 (100,0)	77 (75,5)	
Discreto DNNE	Sim	1 (33,3) ^a	57 (55,9) ^a	0,5856
	Não	2 (66,7)	45 (44,1)	
Neutropenia	Sim	0 (0,0) ^a	16 (15,7) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	86 (84,3)	
Neutrofilia	Sim	0 (0,0) ^a	5 (4,9) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	97 (95,1)	
Monocitose	Sim	0 (0,0) ^a	1 (0,98) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	101 (99,02)	
Eosinofilia	Sim	0 (0,0) ^a	34 (33,3) ^a	0,5493
	Não	3 (100,0)	68 (66,7)	
Linfopenia	Sim	0 (0,0) ^a	0 (0,0) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	102 (100,0)	
Linfocitose	Sim	2 (66,7) ^a	70 (68,6) ^a	0,9709
	Não	1 (33,3)	32 (31,4)	
Basofilia	Sim	0 (0,0) ^a	19 (18,6) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	83 (81,4)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; n: número de cães; He: hemácias; Ht: hematócrito; Hg: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; DNNE: desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

4.3.2 Área Rural

Os valores médios de eritrograma e leucograma dos cães domésticos negativos e positivos para *Mycoplasma* spp., estão apresentados nas Tabelas 8 e 9. Nos resultados de parâmetros hematológicos observou-se valores médios de hemácias abaixo do valor de referência em ambos os grupos.

Já os valores dos parâmetros volume globular médio (VGM), bastões e linfócitos de ambos os grupos se apresentaram superiores aos determinados como referência para espécie, enquanto que os valores médios de eosinófilos se apresentaram acima dos valores de referência para a espécie no grupo de animais positivos para *Mycoplasma* spp.

Assim, nos animais provenientes de área rural, utilizados neste estudo, pode-se caracterizar os resultados do hemograma como sendo praticamente semelhantes àqueles dos animais oriundos de área urbana, ou seja, anemia macrocítica normocrômica, discreto desvio neutrofílico nuclear à esquerda (DNNE) e linfocitose, além de eosinofilia no grupo de animais positivos.

Tabela 8. Análise descritiva de parâmetros relacionados ao eritrograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para *Mycoplasma* spp., oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins.

Parâmetro	Resultado	N	Média	Mín.	Máx.	DP	EP	Referência*
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Positivo	24	5,1	3,2	7,8	1,4	0,3	5,5 - 8,5
	Negativo	75	4,7	1,5	10,7	1,5	0,2	
Hematócrito (%)	Positivo	24	39,9	27,0	55,0	8,4	1,7	37,0 - 55,0
	Negativo	75	37,4	15,0	63,0	11,2	1,3	
Hemoglobina (g/dL)	Positivo	24	13,2	8,8	20,0	3,2	0,6	12,0 - 18,0
	Negativo	75	12,5	6,1	17,5	2,9	0,3	
VGM (fL)	Positivo	24	81,5	37,2	109,5	19,3	3,9	60 - 77
	Negativo	75	82,0	35,2	145,8	21,7	2,5	
CHGM (%)	Positivo	24	33,5	24,9	55,4	6,3	1,3	31 - 34
	Negativo	75	35,6	19,1	104,7	11,8	1,4	

VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média N: número de cães; Mín.: limite mínimo; Máx.: limite máximo; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; *Valores de referência segundo Jain (1993).

Tabela 9: Análise descritiva de parâmetros relacionados ao leucograma dos cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR) para *Mycoplasma* spp., oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins.

Parâmetro	Resultado	N	Média	Mínimo	Máximo	DP	EP	Referência*
Leucócitos totais (x10 ³ /μL)	Positivo	24	16,75	3,50	32,20	7,87	1,61	6 -17
	Negativo	75	14,99	5,00	41,20	6,60	0,77	
Monócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	24	0,28	0,00	1,23	323,93	0,07	0,15 - 1,35
	Negativo	75	0,24	0,00	1,28	251,83	0,03	
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	24	1,54	0,00	8,19	1907,40	0,39	0,1 - 1,25
	Negativo	75	0,74	0,00	5,64	1001,14	0,12	
Segmentados (x10 ³ /μL)	Positivo	24	5,93	0,88	11,97	3087,78	0,63	3 - 11,5
	Negativo	75	6,01	0,00	18,13	3178,78	0,37	
Bastões (x10 ³ /μL)	Positivo	24	0,46	0,00	1,01	365,40	0,07	0 - 0,3
	Negativo	75	0,59	0,00	2,81	609,03	0,07	
Linfócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	24	8,45	1,72	21,90	4630,67	0,95	1 - 4,8
	Negativo	75	7,33	0,30	21,42	4019,19	0,47	
Basófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	24	0,08	0,00	0,32	112,27	0,02	Raros
	Negativo	75	0,08	0,00	0,73	124,07	0,01	

N: número de cães; Mín.: limite mínimo; Máx.: limite máximo; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; *Valores de referência segundo Jain (1993).

Na avaliação por frequência das alterações hematológicas observadas nos animais positivos e negativos oriundos de área rural, não foram verificadas associações estatísticas com a infecção por *Mycoplasma* spp. (Tabela 10).

Tabela 10: Alterações no hemograma associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães domésticos positivos e negativos na PCR em tempo real (qPCR), oriundos de área rural do município de Araguaína, Tocantins.

Alteração hematológica		qPCR <i>Mycoplasma</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos (n= 24)	Negativos (n= 75)	
Anemia (He, Hg, Ht)	Sim	8 (33,3) ^a	31 (41,9) ^a	0,6140
	Não	16 (66,7)	43 (58,1)	
VGM reduzido	Sim	3 (12,5) ^a	9 (12,2) ^a	0,9920
	Não	21 (87,5)	65 (87,8)	
VGM aumentado	Sim	15 (62,5) ^a	40 (53,3) ^a	0,5819
	Não	9 (37,5)	35 (46,7)	
CHGM reduzido	Sim	11 (45,8) ^a	28 (37,8) ^a	0,6488
	Não	13 (54,2)	46 (62,2)	
CHGM aumentado	Sim	8 (33,3) ^a	24 (32,4) ^a	0,8660
	Não	16 (66,7)	50 (67,6)	
Leucopenia	Sim	2 (8,3) ^a	5 (6,8) ^a	0,9910
	Não	22 (91,7)	69 (93,2)	
Leucocitose	Sim	11 (45,8) ^a	24 (32,4) ^a	0,3444
	Não	13 (54,2)	50 (67,6)	
Discreto DNNE	Sim	16 (66,7) ^a	44 (59,5) ^a	0,6975
	Não	8 (33,3)	30 (40,5)	
Neutropenia	Sim	4 (4,2) ^a	11 (14,9) ^a	0,9985
	Não	20 (95,8)	63 (85,1)	
Neutrofilia	Sim	1 (4,2) ^a	4 (5,4) ^a	1,000
	Não	23 (95,8)	70 (94,6)	
Monocitose	Sim	0 (0,0) ^a	0 (0,0) ^a	1,000
	Não	24 (100,0)	74 (100,0)	
Eosinofilia	Sim	10 (41,7) ^a	11 (14,9) ^a	0,0126
	Não	14 (58,3)	63 (85,1)	
Linfopenia	Sim	0 (0,0) ^a	2 (2,7) ^a	1,000
	Não	24 (100,0)	72 (97,3)	
Linfocitose	Sim	18 (75,0) ^a	54 (73,0) ^a	0,9437
	Não	6 (25,0)	20 (27,0)	
Basofilia	Sim	10 (41,7) ^a	33 (44,6) ^a	0,9884
	Não	14 (58,3)	41 (55,4)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real; n: número de cães; He: hemácias; Ht: hematócrito; Hg: hemoglobina; VGM: volume globular médio; CHGM: concentração de hemoglobina globular média; DNNE: desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

4.4 Fatores associados à positividade para *Mycoplasma* spp., utilizando a técnica da PCR em tempo real (qPCR)

Dentre as variáveis analisadas (idade, sexo, padrão racial, frequência de limpeza do local e tipo de moradia) não foi verificada qualquer correlação estatística com a infecção pelo agente *Mycoplasma* spp. (Tabelas 11 e 12), seja na área urbana ou na rural.

Tabela 11: Correlação entre os dados de idade, sexo, padrão racial, frequência de limpeza do local e tipo de moradia, com o resultado da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o agente *Mycoplasma* spp. em cães domésticos oriundos de bairros da área urbana do município de Araguaína, Tocantins.

Fatores associados à infecção		<i>Mycoplasma</i> spp.		p-valor
		Positivos	Negativos	
Idade	≥ 6 meses	1 (8,3%) ^a	11 (91,7%) ^a	0,42
	> 6 meses e ≤ 2 anos	2 (4,0%) ^a	48 (96,0%) ^a	
	> 2 anos e ≤ 5 anos	0 (0,0%) ^a	30 (100,0%) ^a	
	> 5 anos	0 (0,0%) ^a	13 (100,0%) ^a	
Sexo	Macho	2 (3,8%) ^a	50 (96,2%) ^a	0,49
	Fêmea	1 (1,9%) ^a	52 (98,2%) ^a	
Padrão racial	Com raça definida	0 (0,0%) ^a	18 (100,0%) ^a	0,56
	Sem raça definida	3 (3,4%) ^a	84 (96,6%) ^a	
Limpeza do local	Diária	1 (1,1%) ^a	88 (98,9%) ^a	0,06
	Semanal	1 (7,7%) ^a	12 (92,3%) ^a	
	Não é feita	1 (33,3%) ^a	2 (66,6%) ^a	
Moradia	Interna	2 (5,4%) ^a	35 (94,6%) ^a	0,28
	Externa	1 (1,5%) ^a	67 (98,5%) ^a	

^a Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente através do teste de Qui-quadrado a 5% de significância (p<0,05).

Tabela 12: Correlação entre os dados de idade, sexo, padrão racial, frequência de limpeza do local e moradia, com o resultado da técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o agente *Mycoplasma* spp. em cães domésticos oriundos de povoados/propriedades da área rural do município de Araguaína, Tocantins.

Fatores associados à infecção		<i>Mycoplasma</i> spp.		p-valor
		Positivos	Negativos	
Idade	≥ 6 meses	5 (20,0%) ^a	20 (80,0%) ^a	0,58
	> 6 meses e ≤ 2 anos	10 (21,7%) ^a	36 (78,3%) ^a	
	> 2 anos e ≤ 5 anos	6 (28,6%) ^a	15 (71,4%) ^a	
	> 5 anos	3 (42,9%) ^a	4 (57,1%) ^a	
Sexo	Macho	16 (24,2%) ^a	50 (75,8%) ^a	0,59
	Fêmea	8 (24,2%) ^a	25 (75,8%) ^a	
Padrão racial	Com raça definida	2 (18,2%) ^a	9 (81,8%) ^a	0,47
	Sem raça definida	22 (25,0%) ^a	66 (75,0%) ^a	
Limpeza do local	Diária	14 (19,2%) ^a	59 (80,8%) ^a	0,14
	Semanal	7 (38,9%) ^a	11 (61,1%) ^a	
	Não é feita	3 (37,5%) ^a	5 (62,5%) ^a	
Moradia	Interna	3 (16,7%) ^a	15 (83,3%) ^a	0,30
	Externa	21 (25,9%) ^a	60 (74,1%) ^a	

^a Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente através do teste de Qui-quadrado a 5% de significância (p<0,05).

5 DISCUSSÃO

No Brasil, os estudos de prevalência de hemoplasmas caninos são escassos, havendo apenas relatos de casos isolados. Com isso, há a necessidade de mais estudos para investigar a ocorrência desses agentes na população canina que, se acredita, permanece subdiagnosticada por diversos fatores.

O método mais comumente utilizado para diagnóstico da hemoplasmose, como assinalado por Toledo-Pinto et al. (2005) é a demonstração de organismos na superfície dos eritrócitos, por meio da microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, associando-se com sinais clínicos, histórico e hábitos de vida do animal. Porém, devido à parasitemia cíclica e o fato da maioria dos animais apresentar infecção crônica, esta metodologia apresenta limitações quanto à sensibilidade e especificidade.

Com o surgimento das técnicas de diagnóstico molecular, como a PCR convencional e a PCR em tempo real (de elevada sensibilidade e especificidade), as mesmas têm sido amplamente utilizadas e com sucesso na identificação de animais agudamente e cronicamente infectados, de acordo com observações de Messick (2004) e Hoelzle (2008).

Neste sentido, o presente trabalho utilizou a PCR convencional (PCRc) e a PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico molecular de micoplasmas hemotróficos em animais da espécie canina, vivendo sob condições naturais, das áreas urbana e rural do município de Araguaína, Estado do Tocantins.

O diagnóstico molecular de *Mycoplasma* spp. em cães oriundos de áreas urbana e rural de Araguaína foi obtido utilizando-se a técnica de qPCR e a positividade de 2,9% (3/105) dos cães de área urbana e 24,49% (24/99) dos animais provenientes de área rural foi confirmada pela amplificação do fragmento do gene 16S rRNA, pelo valor médio de C_T (31,29 ciclos) e pela temperatura de dissociação (T_m) dos produtos amplificados, que foram semelhantes ao controle positivo, indicando também a especificidade da reação. Após esta fase e utilizando-se *primers* específicos para determinação de espécies, as amostras positivas à qPCR foram submetidas à PCRc, para a pesquisa de: *Mycoplasma haemocanis*, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e ‘*C. Mycoplasma haematoparvum / haemominutum*’.

No presente estudo, os resultados obtidos pela PCR convencional demonstraram uma ocorrência de 1,9% (2/105) para *Mycoplasma haemocanis* na área urbana, enquanto que na área rural a frequência de positividade foi de 13,26% (13/99). DNA de ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ não foi identificado nas amostras de cães oriundos de área urbana ou rural de Araguaína, Tocantins.

No Brasil, a maioria dos estudos diagnósticos utilizando biologia molecular obteve uma detecção inferior à relatada neste estudo. Ramos et al. (2010) no Recife identificaram apenas um animal positivo para *M. haemocanis*. Em Goiânia, 2,34% (7/300) das amostras testadas foram positivas para o citado hemoplasma (COSTA, 2011). Em Ribeirão Preto, a prevalência foi de apenas 1,9% (3/154) para *M. haemocanis* e 0,6% (1/154) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (ALVES et al., 2014). Valle et al. (2014) realizaram seu estudo em Porto Alegre, onde diagnosticaram 5,1% (17/331) de amostras positivas para *M. haemocanis*, 1,8% (6/331) para o agente ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 6,4% em coinfeção por *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ou ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. Por outro lado, uma frequência de positividade superior para *Mycoplasma* spp. foi relatada em recente estudo de Vieira et al. (2015) em cães procedentes de um assentamento rural na região Sul do Brasil, utilizando ensaios de qPCR para detecção de micoplasmas hemotróficos. Foram positivos para *Mycoplasma* spp. 44,7% (59/132) dos animais, sendo 15,9% (21/132) para *M. haemocanis* e 9,09% (12/132) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’.

As diferenças de frequência observada entre todos esses estudos podem estar associadas ao método de diagnóstico empregado, ao gene alvo na PCR, à população amostrada ou às condições climáticas.

A prevalência de diversas hemoparasitoses varia em função das condições climáticas (KEEFE et al., 1982), devido a alguns fatores epidemiológicos, como a distribuição do vetor, o comportamento animal, a faixa etária da população estudada (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005), e práticas de manejo e *habitat* onde vivem os animais (SAINZ et al., 1996). No presente estudo, a frequência de *M. haemocanis* em cães que vivem em áreas urbanas foi de 1,9%, muito inferior à relatada para animais de áreas urbanas (13,23%).

Os resultados sugerem que os cães que vivem em áreas rurais estão mais expostos à carrapatos vetores do que aqueles que vivem em áreas urbanas, e isso pode estar associado ao fato de que cães de localidades urbanas estão mais propensos a serem submetidos ao controle com o uso de ectoparasiticidas, enquanto que em propriedades rurais raramente há medidas de prevenção, controle e tratamento dos animais. (KEMMING et al., 2004b; SASAKI et al., 2008; HII et al., 2012; BARKER et al., 2012). E, de fato, a baixa prevalência de hemoplasmas caninos, na Suíça, foi atribuída ao fato do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* não estar permanentemente estabelecido na referida localidade, como relatado por Wengi et al. (2008).

Mundialmente a prevalência de infecção por micoplasmas hemotróficos, baseada nos resultados das técnicas de biologia molecular qPCR e PCRC demonstram resultados de frequência superiores e inferiores ao estudo em questão, semelhante ao que se evidenciou em estudos publicados no Brasil. A prevalência molecular de *M. haemocanis* para França, Espanha, Suíça, Tanzânia, Trinidad e Tobago, Estados Unidos e Grécia foi de 3,3% (15/460), 14,3% (26/182), 0,9% (8/889), 19% (19/100), 4,9% (9/184), 0,6% (3/506), e 5,6% (8/142), respectivamente (KENNY et al., 2004; WENGI et al., 2008; ROURA et al., 2010; BARKER et al., 2010; TENNANT et al., 2011; COMPTON et al., 2012). Num estudo com cães da Itália, Espanha e Portugal, a prevalência de *M. haemocanis* foi de 3,7% (22/600), 0,5% (1/200) e 40,0% (20/50), respectivamente (NOVACCO et al., 2010).

Em trabalho de levantamento semelhante ao presente estudo, no Estado do Rio de Janeiro, da Silva (2016), utilizando as mesmas metodologias, observou, à qPCR, positividade em 20,27% (45/222) para *Mycoplasma* spp. e, quando realizou a PCRC, observou frequências de 13,06% (29/222) para *M. haemocanis*, 0% (0/222) para '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' e 2,25% (5/222) para '*C. M. haematoparvum/haemominutum*', verificando-se assim que *M. haemocanis* foi também a espécie de maior ocorrência na população estudada.

Estes resultados demonstram que, neste grupo de agentes identificados, *M. haemocanis* tem se adaptado bem aos seus hospedeiros, não sofrendo grandes influências do meio e dependendo apenas de certas condições de seus hospedeiros e dos transmissores, particularmente o *R. sanguineus*. E ao menos neste aspecto, infere-se que ambas as localidades dos estudos (Rio de Janeiro e Tocantins) dividem potenciais semelhantes.

Conforme relatado por Hoskins (1991), Kemming et al. (2004), Chalker (2005), Huebner et al. (2006) e Novacco et al. (2010), a maioria dos cães infectados por hemoplasmas é portador assintomático crônico e, nesta forma de infecção, os micro-organismos são encontrados apenas periodicamente e em número reduzido no sangue. Apenas casos esporádicos de formas graves, com anemia hemolítica têm sido relatados, geralmente em animais imunocomprometidos, com doenças coexistentes ou cães esplenectomizados (BUNDZA et al., 1976; KEMMING et al., 2004a; KENNY et al., 2004; SIKES et al., 2004; CHALKER, 2005; WILLI et al., 2010). Por outro lado, conforme observações de Brinson & Messick (2001), Inokuma et al. (2006) e Novacco et al. (2010), a infecção por *M. haemocanis*, o qual apresenta distribuição mundial, geralmente induz à anemia clinicamente significativa, particularmente em cães imunocomprometidos.

No diagnóstico de agentes hemotróficos em cães considerando-se, comparativamente, áreas urbana e rural, são poucas as referências encontradas na literatura. Ainda assim, em um estudo de investigação de prevalência em um assentamento de área rural na região Sul do Brasil, utilizando a qPCR, foram avaliados 132 cães, das quais 59 amostras (44,7%) foram positivas para hemoplasmas: 21% para *M. haemocanis*, 12% para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e 21% para ambos agentes (VIEIRA et al., 2015).

Em recente levantamento, utilizando-se a PCR, realizado em Belo Horizonte e regiões vizinhas, para comparar taxas de infecção por *M. haemocanis* entre áreas rural e urbana, Vieira et al. (2015) observaram que 20 (11,3%) amostras de 176 cães vivendo em áreas rurais foram positivas, enquanto que 6 de 104 cães (5,8%) provenientes de áreas urbanas estavam parasitados.

Neste trabalho, nas condições em que o estudo foi feito, à qPCR revelou que na área rural também havia um alto nível de infecção, pois 24 em cada 99 animais foram positivos, enquanto que na área urbana apenas 3 animais para cada 105 foram positivos. Estes resultados indicam que os animais de área urbana, relativamente à área rural, sendo mais bem cuidados por seus tutores, recebendo, por exemplo, uma alimentação nutricionalmente mais balanceada e submetidos mais frequentemente à medidas de controle e profilaxia de parasitos, estão menos expostos às condições que propiciam doenças, principalmente as parasitárias e infecciosas, bem como à presença do vetor *R. sanguineus*.

Segundo da Silva (2016), uma possível justificativa para tais resultados provavelmente é o fato de que em muitas áreas, como as rurais, geralmente há uma grande densidade populacional de animais, dificultando-se, assim, o controle de doenças e de ectoparasitas, além do maior contato de diversas espécies de animais silvestres e de gatos com os cães.

O hemograma completo pode ser considerado um instrumento para avaliação do estado fisiológico do animal, servindo para complementar o exame clínico realizado pelo médico veterinário, devendo-se considerar que alterações hematológicas são susceptíveis a oscilações, de acordo com o estágio clínico da doença. Ainda, fatores associados à infecção e relacionados aos aspectos clínicos devem sempre ser considerados e demonstram grande importância no diagnóstico precoce de doenças e, conseqüentemente, na abordagem terapêutica escolhida para o processo patológico em questão. O exame clínico do animal pode ser subjetivo em alguns aspectos, devendo-se, por esta razão, sempre utilizá-lo em conjunto com os exames laboratoriais e demais exames complementares necessários a cada caso.

Fazendo-se a análise de parâmetros hematológicos médios e correlacionando-os à ocorrência de *Mycoplasma spp.*, nas áreas urbana e rural de Araguaína, nas condições deste estudo, verifica-se que os resultados foram praticamente semelhantes em ambas as áreas, caracterizando-se como anemia macrocítica normocrômica, discreto desvio neutrofilico nuclear à esquerda (DNNE) e linfocitose, porém, nenhum destes apresentou correlação estatística com a infecção pelo agente. Resultados semelhantes são relatados na literatura por diversos grupos de pesquisa, os quais não obtiveram êxito em correlacionar estatisticamente a anemia com a infecção por *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (WENGI et al., 2008; BARKER et al., 2010; NOVACCO et al., 2010; ROURA et al., 2010; TENNANT et al., 2011; VALLE et al., 2014; da SILVA, 2016).

Conforme descrito em Jain (1993), anemia é definida como a redução dos níveis referenciais da contagem de eritrócitos e/ou da concentração de hemoglobina e/ou do volume globular (hematócrito) para idade, sexo e raça do animal considerado e, raramente é de natureza primária, sendo mais frequentemente consequência de processos sistêmicos, generalizados.

Ainda, o mesmo autor indica que as anemias podem ser classificadas, morfológicamente, com base em dois índices hematimétricos: o volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM), devendo-se sempre correlacionar com o exame microscópico da população eritrocitária. Comenta ainda, que esta classificação

não é específica quanto à causa, porém, ajuda na determinação dos indícios acerca de mecanismos fisiopatológicos envolvidos, como também forma uma base para considerações e seleção de protocolos de tratamento.

É digno de nota também, segundo o mesmo autor, que a anemia causada por *Mycoplasma* spp. provavelmente não resulta de dano direto ao eritrócito, mas pode envolver outros mecanismos, tais como destruição imunomediada (MAEDE & HATA, 1975; ALLISON & MEINKOTH, 2010).

Anemia macrocítica normocrômica é uma classificação de anemia regenerativa que ocorre mais comumente devido à perda sanguínea ou hemólise, contudo, também pode estar associada a fatores relacionados à eritropoiese defeituosa, dentre os quais pode-se destacar a deficiência de ácido fólico (folato) e cianocobalamina (vitamina B₁₂). Segundo Stockham & Scott (2011), tal deficiência pode afetar o metabolismo do ácido nucleico e, conseqüentemente, causar macrocitose.

É válido mencionar também, que a deficiência de cianocobalamina é responsável por reduzir a atividade da metiltransferase que bloqueia o metabolismo do folato, uma vez que esta é um cofator necessário nas vias metabólicas que envolvem o ácido fólico, sendo assim, há uma deficiência funcional dessa substância na carência de vitamina B₁₂, mesmo que sua concentração sérica esteja dentro ou até acima dos valores referenciais para a espécie, devido à uma menor utilização deste (STOCKHAM & SCOTT, 2011; SEDDON, 2015).

Ainda em relação à deficiência dessas vitaminas, é importante destacar que tal condição também é um distúrbio que pode ser associado às causas de anemias arregenerativas, já que a deficiência de nutrientes pode ocasionar uma eritropoiese ineficiente (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

O discreto DNNE, neste caso, deve-se, provavelmente, ao estresse de natureza não inflamatória, uma vez que não se observou leucocitose neutrofílica; por fim, a linfocitose, pode ter várias interpretações, até mesmo como sendo pós-vacinal, mas, nenhuma interferindo nos demais resultados, visto não ter sido verificada qualquer correlação com a infecção por *Mycoplasma* spp.

Acredita-se que a redução dos valores dos parâmetros neste estudo também possa estar associada à uma alimentação de baixa qualidade nutricional, má absorção intestinal ou mesmo à espoliação sanguínea por ectoparasitas e endoparasitas, como também foi relatado por Stockham & Scott (2011), o que poderia justificar a discreta eosinofilia observada nos animais positivos da área rural, já que esta resposta pode-se relacionar às funções anti-inflamatórias, distúrbios de hipersensibilidade devido ao prurido por picada de ectoparasitas e à infecções por helmintos.

Ressalta-se, também, que a ingestão dietética de cianocobalamina e folato deve ser um fator considerado em casos de anorexia prolongada, visto que tal condição pode interferir nas concentrações séricas dessas vitaminas. A diminuição sérica de vitamina B₁₂ e folato sugere doença difusa envolvendo o intestino delgado, como por exemplo a doença intestinal inflamatória, deficiência congênita ou ainda insuficiência pancreática exócrina (SEDDON, 2015).

Deve-se levar em consideração que, em geral, em áreas rurais, por causa de diversos fatores estruturais e financeiros, é difícil ter um controle adequado de ectoparasitas e endoparasitas, o que provavelmente contribuiu para a eosinofilia observada no presente estudo.

Neste trabalho, outra justificativa plausível para as alterações observadas e descritas também por Weiss et al. (2010) é que, com a liberação de adrenalina que ocorre nas várias formas de estresse agudo, físico ou emocional a que os animais estão sujeitos, há transitória neutrofilia por desvio de células do *pool* marginal para o *pool* circulante, resposta mediada através dos efeitos beta-adrenérgicos da adrenalina, o que causa liberação de adenosina monofosfato (AMP) de células endoteliais e, assim, diminuição da aderência dos neutrófilos à

parede vascular e esta desmarginação de neutrófilos é frequentemente acompanhada por linfocitose e, algumas vezes, por monocitose e eosinofilia, sendo esta resposta mais comum em animais jovens do que em adultos.

Nos esfregaços sanguíneos pode-se observar anisocitose, poiquilocitose, policromasia, corpúsculo de Howell-Jolly e corpos de inclusão semelhantes a cocos e formas dispostas em cadeia na superfície dos eritrócitos (BUNDZA et al., 1976; KEMMING et al., 2004a; WILLI et al., 2010). Porém, estes achados são verificados em casos de infecções agudas graves que cursam com anemia hemolítica em animais imunocomprometidos (BUNDZA et al., 1976; SYKES et al., 2004; KEMMING et al., 2004a,b; KENNY et al., 2004; CHALKER, 2005; WILLI et al., 2010). Nenhuma destas observações foi verificada neste estudo.

Dentre os fatores associados, foram consideradas neste trabalho variáveis como idade, sexo, padrão racial, frequência de limpeza do local e tipo de moradia, não sendo verificadas correlações estatísticas com a infecção pelo agente *Mycoplasma* spp. Entretanto, da Silva (2016) observou em seu estudo que, dentre as variáveis analisadas durante a anamnese, foi verificada associação com a infecção pelo agente *Mycoplasma* spp. com as variáveis sexo ($p=0,0062$) e idade ($p=0,0041$): em relação ao gênero, observou-se um maior percentual de infecção em cães machos; quanto à faixa etária, evidenciou-se maior percentual de infecção nos cães adultos.

De acordo com Messick (2004), os animais podem ser predispostos à infecção aguda por hemoplasmas devido à idade, não como único fator, mas, desde que ocorra doença concomitante ou imunossupressão.

O conhecimento da ocorrência de micoplasmas hemotróficos em qualquer região, visto que os mesmos têm distribuição mundial, auxiliará o médico veterinário a investigar a presença desse agente infeccioso, concomitantemente com outras doenças imunossupressoras e, devido a isto, não responderem de forma adequada ao tratamento.

Ainda, vale destacar que a utilização de técnicas moleculares na rotina clínica está sendo expandida, com isso possibilita ao clínico veterinário uma ferramenta diagnóstica eficiente, cujo resultado deve ser associado aos sinais clínicos e demais achados laboratoriais e de outros exames complementares, para uma melhor compreensão da infecção por estes agentes e também para auxiliar na implementação das diretrizes de tratamento dos animais.

Como considerações finais, chamando-se atenção particularmente para o aspecto de saúde pública, historicamente infecções por organismos semelhantes aos hemoplasmas foram relatadas em humanos por meio de diagnóstico citológico, especialmente naqueles portadores de alterações sistêmicas, tais como neoplasias, lúpus eritematoso sistêmico e portadores do vírus HIV (CLARK, 1975; PUNTARIC et al., 1986; DUARTE et al., 1992; YANG et al., 2000; BOSNIC et al., 2010). Por outro lado, Tasker et al. (2010) não conseguiram confirmar as infecções reportadas previamente por Clark et al. (1975) e Yang et al. (2000) a partir de DNA obtido dos respectivos esfregaços sanguíneos dos humanos, indicando que, possivelmente, tratavam-se de infecções por outros agentes.

No Brasil, *M. haemofelis* foi detectado no sangue de um paciente humano HIV positivo hospitalizado com sintomas clínicos, coinfectado por *Bartonella henselae* e com histórico de mordidas e arranhaduras por gatos. Neste caso, os gatos do paciente também foram positivos para *M. haemofelis* e para *Bartonella* spp. (SANTOS et al., 2008). Ainda, Tasker et al. (2010) encontraram DNA de hemoplasma em uma paciente sul-africana portadora do vírus HIV, entretanto, a espécie não pode ser caracterizada devido à baixa parasitemia.

Acrescenta-se a isso, a similaridade apresentada em estudos de filogenética do gene 16S rRNA, com homologia acima de 99% entre *M. haemofelis* de ocorrência em felinos com *M. haemocanis* em cães (BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002; TASKER et al., 2003). Logo, deve-se considerar que hemoplasmas podem, possivelmente, atuar como um agravante em pacientes imunocomprometidos.

Profissionalmente, médicos veterinários também representam um grupo de risco a estas infecções. Maggi et al. (2013) reportaram coinfeção por *Anaplasma platys*, *B. henselae* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ em uma médica veterinária que estava frequentemente em contato com animais domésticos e silvestres e artrópodes vetores, e apresentava histórico de mordidas e arranhaduras; além disso, na China, Hu et al. (2009) evidenciaram infecção pelo micoplasma hemotrófico, *Mycoplasma suis*, em médicos veterinários e fazendeiros.

Ainda assim, pode-se considerar que poucas informações estão disponíveis a respeito da ocorrência de micoplasmas hemotróficos em humanos, bem como sobre seu potencial zoonótico. Desta forma, médicos veterinários, os quais representam um grupo de risco, devem manipular o sangue ou qualquer material biológico de animais infectados com cautela (SYKES, 2010) além de utilizar equipamentos de proteção individual e ter hábitos corretos de higiene em qualquer procedimento com animais (MAGGI et al., 2013).

6 CONCLUSÕES

- Esta é a primeira descrição de infecção por *Mycoplasma haemocanis* em cães domésticos provenientes do município de Araguaína, no Estado de Tocantins.
- Cães domésticos oriundos de áreas urbana e rural no município de Araguaína, no Estado do Tocantins, são expostos a micoplasmas hemotróficos, com maior frequência para *Mycoplasma haemocanis*.
- As técnicas de biologia molecular empregadas no presente estudo (PCR convencional e PCR em tempo real) foram adequadas e seguras para o diagnóstico da infecção por *Mycoplasma haemocanis* em cães domésticos do município de Araguaína, Tocantins.
- Não foram observadas correlações estatísticas entre as alterações hematológicas (anemia macrocítica normocrômica, desvio neutrofílico nuclear à esquerda, linfocitose e eosinofilia), bem como com algumas variáveis (idade, sexo, padrão racial, frequência de limpeza do local e tipo de moradia) e a infecção por *Mycoplasma haemocanis* em cães domésticos do município de Araguaína, Tocantins.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINPET. Divulgação de dados (Pesquisa quinzenal). Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado/>>. Acesso em 20 de novembro de 2016.

ALLISON, R.W.; MEINKOTH, J.H. Anemia caused by Rickettsia, Mycoplasma and Protozoa. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. (editors). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed., Ames (Iowa): Wiley-Blackwell, p.199-210, 2010.

ALVES, T.B.; FAGGION, S. A.; SANTOS, E. V.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; FACHIN, A. L.; MARINS, M. Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, p. 333-336, 2014.

BAKER, H.J.; CASSELL, G.H.; LINDSEY, J. R. Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. **American Journal of Pathology**, v. 64, p.625-32, 1971.

BARKER, E.N.; TASKER, S.; DAY, M.J.; WARMAN, S.M.; WOOLLEY, K.; BIRTLES, R.; GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; NEWAJ-FYZUL, A.; CAMPBELL, M.D.; SPARAGANO, O.A.E.; CLEAVELAND, S.; HELPS, C.R. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum' in dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 167-170, 2010.

BARKER, E.N; HELPS, C.R.; PETERS, I.R; DARBY, A.C.; RADFORD, A.D.; TASKER, S. Complete genome sequence of *Mycoplasma haemofelis*, a hemotropic mycoplasma. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 8, p. 2060-2061, 2011.

BARKER, E.N.; LANGTON, D.A.; HELPS, C.R.; BROWN, G.; MALIK, R.; SHAW, S.E.; TASKER, S. Haemoparasites of free-roaming dogs associated with several remote Aboriginal communities in Australia. **BioMed Central Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 55, 2012.

BATISTA, T.N. **Frequência de infecção de *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' em gatos (*Felis catus*)**. Botucatu, 2004. 44f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

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

BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.S.; VIEIRA, R.F.C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B.; ALMOSNY, N.R.P.; MOLENTO, M.B.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.D.; MESSICK, J.B. Uma revisão da ocorrência dos hemoplasmas (micoplasmas hemotrópicos) no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 1-7, 2009.

BIRKENHEUER, A.; BREIDTSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, R.; PITULLE, C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1385-1388, 2002.

BOSNIC, D.; BAREŠIĆ, M.; ANIĆ, B.; SENTIĆ, M.; CEROVEC, M.; MAYER, M.; CIKES, N. Rare zoonosis (hemotrophic mycoplasma infection) in a newly diagnosed systemic lupus erythematosus patient followed by a *Nocardia asteroides* pneumonia. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 14, p. 92–95, 2010.

BRACCINI, G.L.; CHAPLIN, E.L.; STOBBE, N.S.; ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, N.R. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (1986-1990). **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 20, p. 134-149, 1992.

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

BUNDZA, A.; LUMSDEN, J.H.; McSHERRY, J.; VALLI, V.E.O.; JANZEN, E.A. Haemobartonellosis in a dog in association with Coombs positive anemia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 17, p. 267-270, 1976.

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

CLARK, K.G. A basophilic micro-organism infecting human red cells. **British Journal of Haematology**, v. 29, p. 301–304, 1975.

COMPTON, S.M.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. ‘*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum’ and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, p. 557–62, 2012.

COSTA, H.X. **Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia**. Goiânia, 2011. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Goiás.

da SILVA, A.T. Avaliação hematológica, bioquímica, clínica e diagnóstico molecular de agentes micoplasmas hemotrópicos em cães domésticos oriundos de abrigos da região metropolitana do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro, 2016, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brasil (review). **Parasites and Vectors**, v.1, n. 25, 2008.

de MORAIS, H.S.A.; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma haemocanis* (previously, *Haemobartonella canis*) infection in non-splenectomized dogs in Brazil: 4 cases (1999-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 421, 2003.

de MORAIS, H.S.A.; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J.B. Infecção com Micoplasma Hemotrópico pequeno em um cão no Brasil (Small Haemotropic Mycoplasma infection in dog in Brazil). In: Anais do XXVII Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA, Vitória, 2006.

de MORAIS, H.A; GUIMARÃES, A.M.S.; VIDOTTO, O.; BAUMANN, A.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in three cats from Brazil. **Journal of Feline and Medicine Surgery**, v. 9, n. 6, p. 518-520, 2007.

DUARTE, M.I.; OLIVEIRA, M.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARIANO, O.N.; TAKAKURA, C.F.; PAGLIARI, C.; CORBETT, C.E. *Haemobartonella*-like micro-organism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, p. 976–977, 1992.

FERREIRA, R.F.; CERQUEIRA, A.M.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; AZEVEDO, R.R.M. et al. Avaliação da ocorrência de reação cruzada em cães PCR positivos para *Anaplasma platys* testados em ELISA comercial para detecção de anticorpos de *Anaplasma phagocytophilum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. 17, supl. 1, p. 5-8, 2008.

FIGUEIREDO, M.R. Babesiose e erliquiose caninas. 2011. 30p. Monografia (Especialização) – Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica de Pequenos Animais, Instituto Qualittas. Rio de Janeiro, 2011.

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

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

HANDCOCK, W.J. Clinical haemobartonellosis associated with use of corticosteroid. **Veterinary Record**, v. 125, n. 23, p. 584-585, 1989.

HII, S.F.; KOPP, S.R.; THOMPSON, M.F.; O’LEARY, C.A.; REES, R.L.; TRAUB, R.J. Canine vector-borne disease pathogens in dogs from south-east Queensland and north-east Northern Territory. **Australian Veterinary Journal**, v. 90, p. 130-135, 2012.

HOELZLE, L.E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 215-226, 2008.

HOSKINS, J.D. Canine haemobartonellosis, canine hepatozoonosis, and feline cytauxzoonosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p.129-140, 1991.

HUEBNER, J.; VAHLENKAMP, T.W.; MULLER, E.; LANGBEIN-DETSCH, I. Mycoplasma infection in anaemic and non anaemic dogs in Germany. In: **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 712, 2006.

HU, Z.; YIN, J.; SHEN, K.; KANG, W.; CHEN, Q. Outbreaks of Hemotrophic Mycoplasma Infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 1139-1140, 2009.

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

JAIN, N.C. Comparative hematology of common domestic animals. In: JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.19-53, 1993.

KEEFE, T.J., HOLLAND, C.J., SALYER, P.E., RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, p. 236-238, 1982.

KEMMING, G.; MESSIK, J.B.; MUELLER, W.; ENDERS, G.; MEISNER, F.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; SCHROPP, A.; WOJTCZYK, C.; PACKERT, K.; MESSMER, K.; THEIN, E. Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old problem – New insight. **European Surgical Research**, v. 36, p. 198-205, 2004a.

KEMMING, G.; MESICK, J.B.; ENDERS, G.; LORENZ, B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSMER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis*: underestimated widespread Kennel-related Disease?. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 4, p. 284-289, 2004b.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5397–5399, 2004.

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

KRAJE, A.C. Canine haemobartonellosis and babesiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 23, p. 310-18, 2001.

KRAKOWKA, S. Transplacentally acquired microbial and parasitic disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, p. 750-753, 1977.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.

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

LUMB, W.V. **A study of canine haemobartonellosis**. PhD dissertation. School of Veterinary Medicine. University of Minnesota. St.Paul, Minn., 1957.

LUMB, W.V. More information on haemobartonellosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, p. 732-33, 2001.

MacWILLIAMS, P. & FURNEAUX, R.W. Haemobartonellosis in a dog in Saskatchewan. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 14, n. 1, p. 21-22, 1973.

MAEDE, Y. & HATA, R. Studies on Feline Haemobartonellosis. II. The Mechanism of Anemia Produced by Infection with *Haemobartonella felis*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.37 (1), p. 49-54, 1975.

MAGGI, R.G.; MASCARELLI, P.E.; HAVENGA, L.N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E.B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum' in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 103, 2013.

MESSICK, J.B.; WALKER, P.G.; RAPHAEL, W.; BERENT, L.; SHI, X. 'Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis' sp. nov., 'Candidatus Mycoplasma haemolamae' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasma. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 693-698, 2002.

MESSICK, J.B. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 6, p.1453-65, 2003.

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

MESSICK, J.B.; SANTOS, A.P. Identification, Bioinformatics Analyses, and Expression of Immunoreactive Antigens of *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 1275-1281, 2011.

MESSICK, J.B. & HARVEY, J.W. Micoplasmose Hemotrópica (Hemobatonelose) In.: GREENE, C.E. Doenças Infeciosas em cães e gatos. 4th ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 325-335, 2015.

NASCIMENTO, N.C.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANMIGUEL, P.J.; MESSICK, J.B. Complete genome sequence of *Mycoplasma haemocanis* Strain Illinois. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 6, p. 1605-06, 2012.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKHISA, Y. et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis', 'Candidatus Mycoplasma haemomuris', 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenvonii'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 891-899, 2001.

NOVACCO, M.; MELI, M.L.; GENTILINI, F.; MARSILIO, E.; CECI, C.; PENNISI, M.G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 276-284, 2010.

OBARA, H.; FUJIHARA, M.; WATANABE, Y.; ONO, H.K.; HARASAWA, R. A feline hemoplasma 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', detected in dog in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 6, p. 841-43, 2011.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; McAULIFFE, L.; NEIMARK, H.; LAPPIN, M.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J.; HOELZLE, L.E.; WILLI, B.; MELI, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. RNase P RNA gene (*rnpB*) phylogeny of hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v, 46, p. 1873-1877, 2008.

PINTO, R.L. **Babesiose canina – Relato de caso**. 2009. 25p. Monografia (Especialização) – Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica de Pequenos Animais, Universidade Federal Rural do Semiárido. Porto Alegre, 2009.

PITORRI, F.; DELL'ORCO, M.; CARMICHAEL, N.; BARKER, E. N.; HOLLYWOOD, M.; TASKER, S. Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of *Mycoplasma haemocanis* infection with doxycycline in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.41, n.4,p. 493-496, 2012.

PRYOR, W.H. & BRADBURY, R.P. *Haemobartonella canis* infection in research dogs. **Laboratory Animal Science**, v. 25, n. 5, p. 566-569, 1975.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1115–20, 2010.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, YEHUDITH. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RODRIGUEZ-VIVAS, R.I., ALBORNOZ, R.E.F., BOLIO, G.M.E. Ehrlichia canis in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 75-79, 2005.

ROURA, X.; PETERS, I.R.; ALTET, L.; TABAR, M.; BARKER, E.N.; PLANELLAS, M.; HELPS, C.R.; FRANCINO, O.; SHAW, S.E.; TASKER, S. Prevalence of hemotropic mycoplasma in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 270-274, 2010.

SAINZ, A., DELGADO, S., AMUSATEGUI, I., TESOURO, M., CARMENES, P. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Leon (north–west Spain). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 29, p. 1–7, 1996.

SANTOS, A.P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre, 2008. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SANTOS, A.P.; MESSICK, J.B.; BIONDO, A.W.; OLIVEIRA, S.T.; PEDRALLI, V.; LASTA, C.S.; LACERDA, L.A.; ESTEVES, V.S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; WILLI, B.; GONZALEZ, F.H.D. Design, optimization and application of a conventional PCR assay with an internal control of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 443-452, 2009.

SASAKI, M.; OHTA, K.; MATSUU, A.; HIRATA, H.; IKADAI, H.; OYAMADA, T. A molecular survey of *Mycoplasma haemocanis* in dogs and foxes in Aomori Prefecture, Japan. **Journal of Protozoology Research**, v. 18, p. 57–60, 2008.

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

STOCKHAM, S.L. & SCOTT, M.A. Proteínas In: STOCKHAM, S.L. & SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 303-339, 2011.

SYKES, J.E.; BAILIFF, N.L.; BALL, L.M.; FOREMAN, O.; GEORGE, J.W.; FRY, M.M. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 1946-1951, 2004.

SYKES, J.E.; BAILIFF, N.L.; BALL, L.M.; FRY, M.M. ‘*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum’, a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 27-30, 2005.

SYKES, J. Feline hemotropic micoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p. 62-69, 2010.

TALUKDER, M.H.; MATSUU, A.; IGUCHI, A.; ROY, B.C.; NISHII, N.; HIKASA, Y. PCR-based survey of vector-borne pathogens in dogs in Dhaka, Bangladesh. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 2, p. 249-254, 2013.

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

TASKER, S. Feline Infectious Anaemia. In: CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Feline Medicine and Therapeutics**, 3ed. Blackwell Publishing. p. 669- 678, 2004.

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

TENNANT, K.V.; BARKER, E.N.; POLIZOPOULOU, Z.; HELPS, C.R.; TASKER, S. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of haemoplasmas in healthy and unhealthy dogs from Central Macedonia, Greece. **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, p. 645–649, 2011.

TOLEDO-PINTO, E.P.; SALVARANI, R.S.; SANTOS, G.J.; MOÇO, H.F. Hemobartonelose em gatos: Revisão de Literatura. In: **Anais da 3ª Semana de Patologia Veterinária**. Garça: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2005.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. A. S. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 177–80, 2006. [Short Communication].

VALLE, S.F.; MESSICK, J.B.; SANTOS, A.P.; KREUTZ, L.C. et al. Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, p. 259-265, 2014.

VENABLE, J.H. & EWING, S.A. Fine-structure of *Haemobartonella canis* (*Rickettsiales: Bartonellaceae*) and its relation to the host erythrocyte. **The Journal of Parasitology**, v. 54, p. 259-268, 1968.

VIEIRA, R.F.C.; VIDOTTO, O.; VIEIRA, T.S.W.J.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; NASCIMENTO, N.C.; SANTOS, N.J.R.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B.; MARCONDES, M.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in human beings, dogs and horses in a rural settlement in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 353-357, 2015.

VILLIERS, E. Disorders of erythrocytes. In: VILLIERS, E.; BLACKWOOD, L. **Manual of canine and feline clinical pathology**, 2ed. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA), p. 44-45, 2005.

WARDROP, K.J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A. et al. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 135-142, 2005.

WARMAN, S.M.; HELPS, C.R., BARKER, E.N. et al. Haemoplasma infection is not a common cause of canine immune-mediated haemolytic anaemia in the UK. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, p.534-539, 2010.

WEISS, D.J.; RAMAIAH, S.K.; WALCHECK, B. Neutrophil distribution and function. In: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. (editors). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed., Ames (Iowa): Wiley-Blackwell, p. 268-274, 2010.

WENGI, N.; WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; RIOND, B.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 132-141, 2008.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M.L.; REUSCH, C.; LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2581– 2585, 2005.

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

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

WILLI, B.; NOVACCO, M.; MELI, M.L.; WOLF-JACKEL, G.; BORETTI, F.S.; WENGI, N.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Haemotropic mycoplasma of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 152, p. 237– 244, 2010.

WOODS, J.E.; BREWER, M.M.; HAWLEY, J.R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M.R. Evaluation of experimental transmission of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 1008–1012, 2005.

WRIGHT, I.G. The isolation of *Haemobartonella canis* in association with *Babesia canis* in a splenectomized dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 157-159, 1971.

YANG, D.; TAI, X.; QIU, Y.; YUN, S. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiology and Infection**, v. 125, p. 421–426, 2000.

ZHUANG, Q. J.; ZHANG, H. J.; LIN, R. Q.; SUN, M. F.; LIANG, X. J.; QIN, X. W.; PU, X.; ZHU, Q. The occurrence of the feline ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 689–92, 2009.

8 ANEXOS

ANEXO A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Proprietário: _____ Data: ___/___/___

Convite à participação da pesquisa intitulada “**Diagnóstico molecular e avaliação hematológica de micoplasmas hemotróficos em cães domésticos (*Canis familiaris*) nas áreas urbana e rural de Araguaína, Tocantins.**” que tem como objetivo investigar a presença de infecção pelos agentes micoplasmas hemotróficos em cães domésticos por meio de ensaios moleculares, bem como correlacionar a infecção às alterações clínicas e hematológicas.

A pesquisa **não oferece riscos físicos para você ou seus animais**, no entanto, seu animal será devidamente contido para coleta da amostra de sangue, procedimento que pode trazer algum desconforto ao animal e indiretamente ao proprietário.

Sua participação baseia-se no **consentimento da coleta de amostra de sangue do seu animal por um profissional da equipe de pesquisa e na resposta a um questionário padronizado** que será aplicado em todas as propriedades pesquisadas. As informações obtidas serão utilizadas somente para fins da pesquisa acima mencionada, sua identificação e dados confidenciais serão mantidos em sigilo.

Pela participação no projeto o (a) senhor (a) não receberá qualquer remuneração, assim como não será cobrada qualquer taxa. Está assegurada sua liberdade de recusa em participar da pesquisa ou de retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. Qualquer dúvida em relação à pesquisa o Sr^(a) poderá procurar a pesquisadora responsável no endereço abaixo:

Cristiane Divan Baldani, DSc. Prof. Adjunto

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Instituto de Veterinária - Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária

BR 465, Km 7, Seropédica, RJ CEP: 23890-000

Telefone: 21 2682-1711 / Ramal 232/ e-mail: crisbaldani@ufrj.br

Concordo voluntariamente em participar do estudo, dispondo da informação de que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício adquirido.

(Proprietário participante)

Declaro a participação voluntária do proprietário e asseguro a entrega dos resultados dos exames realizados.

(Integrante grupo de pesquisa)

ANEXO B: QUESTIONÁRIO

Animal n° (Registro):		Data:	
Nome do cão:	Sexo:	Raça:	Idade:
Nome do proprietário/responsável:			
Endereço:		Tel.:	

HISTÓRICO:

- 1) Castrado: () Sim () Não
- 2) Há quanto tempo o animal foi adquirido? E qual a procedência? _____
- 3) Local de moradia: () Casa () Apartamento () Abrigo () Canil () Rua/solto () Sítio
- 4) Frequência de limpeza do local () Diariamente () Semanalmente () Mensalmente () Outra: _____
- 5) Acesso à rua: () Sim () Não
- 6) Histórico de brigas: () Sim () Não
- 7) Histórico de ectoparasitas: () Sim () Não. Quais? _____
- 8) Convívio com outros cães? () Sim () Não. Quantos? _____
- 9) Convívio com outras espécies? () Sim () Não. Qual(is)/Quantos? _____
- 10) Presença de ectoparasitos? () Sim () Não.
Quais: () Pulgas () Carrapatos () Piolhos () Sarna () Intensidade: _____
- 11) Uso de ectoparasiticida? () Sim () Não. Qual: _____
- 12) Animal é vermifugado? () Sim () Não. Qual a frequência? _____
- 13) Animal é vacinado? () Sim () Não. Qual(is)? _____
- 14) Faz uso de alguma medicação? () Sim () Não. Qual(is)? _____

SINAIS CLÍNICOS:

- 1) Estado corporal: () Normal () Magro () Sobrepeso/Obeso
 - 2) Comportamento: () Receptivo/carinhoso () Apático/ Quieto () Agressivo () Medo
 - 3) Anorexia: () Sim () Não
 - 4) Letargia/Depressão: () Sim () Não
 - 5) Mucosas: () Normal () Hipocorada () Ictérica () Azulada
a. Intensidade: () Discreta () Moderada () Intensa
- | |
|-----------|
| TPC _____ |
|-----------|
- 6) Frequência respiratória: _____ (Referência: 10 - 30 rpm)
 - 7) Frequência cardíaca: _____ (Referência: 70 - 160 bpm)
 - 8) Temperatura retal: _____ (Referência: 37,5° - 39,3°C)
 - 9) Turgor cutâneo: _____
 - 10) Linfonodos: () Normais () Aumentados _____
 - 11) Histórico de doenças e demais observações clínicas relevantes: _____

Total de animais do local: _____ **Animais amostrados:** _____