

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**HEMOPLASMAS EM GATOS DOMÉSTICOS:
PREVALÊNCIA E SUA ASSOCIAÇÃO À
INFECÇÃO NATURAL PELOS VÍRUS DAS
IMUNODEFICIÊNCIA E/OU LEUCEMIA
FELINAS**

DANIEL DE BARROS MACIEIRA

2008



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

**HEMOPLASMAS EM GATOS DOMÉSTICOS: PREVALÊNCIA E SUA
ASSOCIAÇÃO À INFECÇÃO NATURAL PELOS VÍRUS DAS
IMUNODEFICIÊNCIA E/OU LEUCEMIA FELINAS.**

DANIEL DE BARROS MACIEIRA

Sob a Orientação da Professora
Rita de Cássia Alves Alcantara de Menezes

E Co-orientação das Professoras
Joanne Belle Messick
Nádia Regina Pereira Almosny

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica
Fevereiro de 2008

636.808961

54

M152h

T

Macieira, Daniel de Barros, 1976-

Hemoplasmas em gatos domésticos: prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus da imunodeficiência e/ ou Leucemia Felina/ Daniel de Barros Macieira. - 2008.

90f. : il.

Orientador: Rita de Cássia Alves Alcântara de Menezes.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinárias.

Bibliografia: f. 68-86.

1. Gato - Doenças - teses. 2. Doenças transmissíveis - Animais domésticos - Teses. 3. Leucose em animais - Teses. I. Menezes, Rita de Cássia Alves Alcântara de, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinárias. III. Título.

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

DANIEL DE BARROS MACIEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA em 28/02/2008

Rita de Cássia Menezes

Rita de Cássia Alves Alcantara de Menezes, Dr.^a, UFRRJ
(Orientadora)

Giane Regina Paludo

Giane Regina Paludo, Dr.^a, UnB

Heloisa Justen Moreira de Souza

Heloisa Justen Moreira de Souza, Dr.^a, UFRRJ

Mônica Rodrigues Campos

Mônica Rodrigues Campos, Dr.^a, FIOCRUZ

Rosângela Zacarias Machado

Rosângela Zacarias Machado, Dr.^a, UNESP

A todos aqueles que sempre
acreditaram em mim...
...(e aos que não acreditaram também).

AGRADECIMENTOS

À minha família, por tudo.

À minha Orientadora, Professora Rita Menezes, pelo apoio, amizade, força e, principalmente, por colocar meus pés no chão em momentos de ansiedade extrema.

À minha Co-orientadora, Professora Nádia Almosny, por toda a ajuda dispensada a este trabalho, sem a qual o mesmo não seria possível.

À minha Orientadora no exterior, Professora Joanne Messick, por me receber não só em seu laboratório, mas também em sua residência, me apoiar e tornar possível a realização deste trabalho, bem como me proporcionar um enorme crescimento pessoal e profissional. Estendo o agradecimento a Edward Wetzel, por também me receber em sua residência e pelas conversas e apoio durante esse período.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV), bem como todos os professores, funcionários e novos amigos que fiz aqui, por todo o apoio e hospitalidade prestados durante a realização deste Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento deste trabalho e de minha bolsa, bem como pelo Programa de Estágio de Doutorando no Exterior, que foi sem dúvida uma das experiências mais marcantes de minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo apoio à manutenção da infra-estrutura do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ por meio do Programa Labmulti.

À Coordenação do CPGCV e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRRJ por todo o apoio e voto de confiança para a realização do estágio do exterior.

Aos Doutores José Carlos e Dircéa pelo auxílio frente ao Ministério da Agricultura na liberação do envio das amostras de DNA para os EUA.

Ao Department of Population Medicine & Diagnostic Sciences do College of Veterinary Medicine (Cornell University, Ithaca, NY, EUA) e ao Department of Comparative Pathobiology da School of Veterinary Medicine (Purdue University, West Lafayette, IN, EUA). Agradeço a todos os chefes, secretários, professores, técnicos, alunos e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado durante o período que permaneci fora do Brasil.

Às técnicas de laboratório Heather McLane e Janelle Dadonna, pelos ensinamentos durante a realização da parte laboratorial deste estudo, bem como pela amizade durante minha estada em Ithaca, NY.

Ao Department of Statistics da Purdue University, bem como ao monitor David Anderson, pelo auxílio e ensinamentos acerca do uso do programa estatístico SPSS.

Ao Professor George Moore e a Joanne Daggy (ambos da Purdue University) por todo o auxílio em epidemiologia e estatística durante a ‘fase estrangeira’ da realização deste trabalho.

À Professora Heloisa Justen pelo apoio prestado durante a execução deste estudo, bem como à Clínica Veterinária Gatos & Gatos e seus profissionais, cuja ajuda e boa vontade foram de vital importância para a realização desta Tese.

Aos Professores Carlos Luiz Massard e Carlos Wilson Gomes Lopes, respectivamente, pelo empréstimo da cuba para coloração de lâminas e pela participação em minha banca de qualificação.

À amiga e colega de profissão Cristiane Damico pelos hemogramas, testes para detecção de retrovírus e todo o apoio indispensável para a realização deste estudo.

À colega e amiga Bianca Cramer pela ajuda prestada durante a análise de parte dos resultados deste estudo.

A todos os Proprietários, que permitiram a inclusão de seus animais no presente trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora deste estudo, por terem aceito o convite para a avaliação do mesmo e pelas valiosas contribuições apresentadas na ocasião de sua Defesa.

A todos os amigos, aqui omitidos, porém nunca esquecidos, que de alguma forma contribuíram comigo, seja neste trabalho ou ‘simplesmente’ por estarem presentes em minha vida.

RESUMO

MACIEIRA, Daniel de Barros. **Hemoplasmas em gatos domésticos: Prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus da imunodeficiência e/ou leucemia felinas.** 2008. 90p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

As doenças infecto-contagiosas possuem uma alta morbidade entre os gatos domésticos e um diagnóstico impreciso ou retardado pode resultar no óbito do paciente. A associação entre infecções pelos vírus da imunodeficiência (FIV) e/ou leucemia (FeLV) felina com hemoplasmas possui grande importância na clínica médica, uma vez que os agentes podem agir de modo sinérgico elevando os riscos para os animais acometidos. Devido ao fato de inexistirem no Brasil estudos que analisem criticamente a associação entre estes retrovírus e os hemoplasmas, o presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e possíveis fatores associados para as infecções por *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (Mhm) em gatos domésticos, testados para a presença de FIV e FeLV, através de um ‘kit’ comercial baseado na metodologia de ELISA. Com base no teste sorológico, os gatos foram agrupados como i) FIV-positivos (n=25); ii) FeLV-positivos (n=39); iii) FIV/FeLV-positivos (n=8); e iv) FIV/FeLV-negativos (n=77), ou grupo de referência para as comparações. Hemogramas foram seguidos da extração/purificação de DNA, reação em cadeia da polimerase espécie-específica para a detecção de Mhf e Mhm e Southern Blot/hibridização (SB) para todos os animais. Entre os 149 animais testados, 16,8%, 26,2% e 5,4% foram soropositivos para FIV, FeLV e ambos os retrovírus respectivamente. Fatores associados à infecção por retrovírus incluíram idade média mais elevada (FIV, $p < 0,001$), condição reprodutiva castrado e histórico de brigas/mordidas (FIV, $p = 0,033$ e $< 0,001$ respectivamente); presença de pulgas (FeLV, $p = 0,018$); transfusão de sangue e acesso ao ambiente externo (FIV/FeLV, $p = 0,028$ e $0,033$ respectivamente). Dentre as alterações clínicas avaliadas, anorexia e mucosas pálidas (FIV, $p = 0,004$ e $0,034$ respectivamente); letargia/depressão, icterícia e taquicardia (FeLV, $p = 0,033$, $0,036$ e $0,003$ respectivamente) foram identificadas. Dentre os parâmetros hematológicos a anemia esteve associada a presença de FIV ($p = 0,012$) e FeLV ($p < 0,001$) enquanto a trombocitopenia esteve apenas associada a infecções por FIV ($p = 0,015$). Animais com FIV ou com dupla infecção (FIV e FeLV) tiveram uma contagem de leucócitos reduzida ($p = 0,021$ e $0,012$ respectivamente). O DNA de Mhf foi achado em 4,0%, 2,6%, 12,5% e 7,8% dos gatos dos grupos i, ii, iii e iv, respectivamente, enquanto 32,0%, 5,1%, 50,0% e 5,2% desses animais tinham infecções por Mhm. Fatores inerentes ao hospedeiro que apresentaram associação com a presença do DNA de hemoplasmas incluíram o estado retroviral ($p = 0,001$), histórico de brigas/mordidas ($p = 0,003$), acesso ao ambiente externo ($p = 0,001$), coabitar com outros gatos ($p = 0,008$) e mucosas pálidas ($p = 0,033$). O modelo de regressão logística usado mostrou que gatos com FIV (OR=4,25, $p = 0,009$) e animais duplamente infectados para FIV e FeLV (OR=7,56, $p = 0,014$) estavam em maior risco de serem infectados por hemoplasmas do que animais negativos para ambos os retrovírus, principalmente em virtude de infecções por Mhm (OR=8,59, $p = 0,001$ e OR=18,25, $p = 0,001$ respectivamente). Entre os animais de raça definida, a positividade para FIV estava associada com infecções para hemoplasmas (OR=45, $p = 0,001$).

Palavras-chave: Hemoplasma, retrovírus felinos, epidemiologia

ABSTRACT

MACIEIRA, Daniel de Barros. **Hemoplasmas in domestic cats: Prevalence and its association to the Feline Immunodeficiency Virus and/or Feline Leukemia Virus natural infections.** 2008. 90p. Thesis (Doctorate in Veterinary Sciences, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Infectious diseases present high morbidity among domestic cats and a delayed or misdiagnosis may result in patient death. The association between feline immunodeficiency (FIV) and/or feline leukemia (FeLV) viruses' infections with hemoplasmas has great importance in veterinary practice, since agents may act synergically increasing risks for infected animals. To date, there are no studies in Brazil critically examining whether or not hemoplasma infections are associated with retroviral infection in cat. Thus, the aim of this study was to determine the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' (Mhm) infections in domestic cats tested for FIV and FeLV with a commercial ELISA kit. Based on serologic testing, cats were grouped as i) FIV-positive (n=25); ii) FeLV-positive (n=39); iii) FIV/FeLV-positive (n=8); and iv) FIV/FeLV-negative (n=77), or base-comparison group. CBCs were followed by DNA extraction, species-specific PCR (16S rRNA gene) for Mhf and Mhm and Southern blotting for all animals. Among all animals tested for retroviral infection (n=149), 16,8%, 26,2% and 5,4% were seropositive for FIV, FeLV and both retroviruses respectively. Associated factors to retroviral infections included an increased mean age (FIV, $p < 0,001$), neutered status and history of fights/bites (FIV, $p = 0,033$ and $< 0,001$ respectively); presence of fleas (FeLV, $p = 0,018$); history of blood transfusions and roaming outdoors (FIV/FeLV, $p = 0,028$ and $0,033$ respectively). Among evaluated clinical signs, anorexia and pale mucous (FIV, $p = 0,004$ and $0,034$ respectively); lethargy/depression, jaundice and tachycardia (FeLV, $p = 0,033$, $0,036$ and $0,003$ respectively) were identified. Among CBC findings, anemia was related to FIV ($p = 0,012$) and FeLV ($p < 0,001$) infections, whereas thrombocytopenia was only related to FIV infection ($p = 0,015$). Animals with FIV or double FIV and FeLV infections had a reduced WBC count ($p = 0,021$ and $0,012$ respectively). Mhf DNA was found in 4.0%, 2.6%, 12.5% and 7.8% of the cats from groups i, ii, iii and iv respectively, while 32.0%, 5.1%, 50.0% and 5.2% of these animals had a Mhm infection. Host factors that were associates to the presence of hemoplasma DNA included the retroviral status ($p = 0,001$), history of fights/bites ($p = 0,003$), roaming outdoors ($p = 0,001$), living with other cats ($p = 0,008$) and pale mucous ($p = 0,033$). The logistic regression model used herein showed that cats with FIV (OR=4,25; $p = 0,009$) and both FIV and FeLV (OR=7,56; $p = 0,014$) were at greater risk of being hemoplasma infected than retroviral negative cats, mainly due to Mhm infection (OR=8,59, $p = 0,001$ and OR=18,25, $p = 0,001$ respectively). Among pure-breed cats, FIV-positive status was associated with hemoplasma infection (OR 45,0; $p = 0,001$).

Keywords: Hemoplasma, feline retroviruses, epidemiology

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Classificação taxonômica dos hemoplasmas felinos, vigente até o início da presente década (esquerda), e a nova classificação instituída após a realocação do parasito no <i>Taxa</i> (direita).	3
Quadro 2.	Espécies de hemoplasmas não felinos que acometem animais domésticos com suas respectivas posições nos <i>Taxa</i> anterior (quando considerados membros da família Anaplasmataceae) e atual (depois de realocados para a Classe Mollicutes), bem como seus respectivos hospedeiros naturais.	4
Quadro 3.	Resumo de alguns estudos de prevalência/ocorrência de hemoplasmas em gatos domésticos realizados no mundo, relacionados os locais, coortes e número de animais utilizados, bem como os métodos de diagnóstico empregados.	15
Quadro 4.	Resumo dos fatores associados às infecções por hemoplasmas em gatos domésticos com base em diversos estudos realizados no mundo.	16
Quadro 5.	Classificação taxonômica vigente dos vírus das imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas	24
Quadro 6.	Valores de referência para os parâmetros hematológicos utilizados neste estudo.	29
Quadro 7.	Seqüências iniciadoras ('primers') e genes alvos utilizados no presente trabalho para a detecção de hemoplasmas felinos em gatos domésticos bem como para a detecção do gene codificador da Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), posição dos produtos da PCR nos genes-alvo, tamanho dos mesmos em pares de base (pb) e número de acesso das respectivas seqüências genéticas depositadas no 'genbank' utilizadas como referência.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Total de observações absolutas válidas para cada variável analisada entre todos os 149 animais testados para a presença do(s) Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	35
Tabela 2.	Soroprevalência por ELISA e intervalos de confiança (IC) a 95% para todos os animais testados (n=149) para a presença de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou antígenos do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) em uma clínica exclusiva no atendimento de gatos domésticos na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil, de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	36
Tabela 3.	Idade dos animais testados para a presença do(s) Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV), comparada com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	38
Tabela 4.	Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença de pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	39
Tabela 5.	Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	41
Tabela 6.	Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da leucemia felina (FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	42
Tabela 7.	Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença de ambos os vírus da imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	43
Tabela 8.	Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença de pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 9.** Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da imunodeficiência (FIV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 45
- Tabela 10.** Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da leucemia felina (FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 46
- Tabela 11.** Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença de ambos os vírus das imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 47
- Tabela 12.** Parâmetros laboratoriais mensurados de acordo com a condição retroviral dos animais (positivos para pelo menos um retrovírus) e a comparação destes com o grupo de referência, no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 49
- Tabela 13.** Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença de pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 51
- Tabela 14.** Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença do vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 51
- Tabela 15.** Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença do vírus da leucemia felina (FIV) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 16.** Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença de dupla infecção pelos vírus da imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 52
- Tabela 17.** Comparação dos resultados obtidos através dos métodos de Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Southern Blot/Hibridização (SB) para a detecção de hemoplasmas (n=149) em gatos domésticos em amostras obtidas em uma clínica exclusiva para o atendimento de gatos domésticos na Cidade do Rio de Janeiro, RJ, de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 53
- Tabela 18.** Prevalência e intervalos de confiança (IC) a 95% para infecções por pelo menos um hemoplasma, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *M. haemofelis* por Southern Blot/hibridização (SB+) entre todos os animais testados para os vírus da imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas em uma clínica exclusiva no atendimento de gatos domésticos na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil, de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 55
- Tabela 19.** Idade dos animais testados para a presença do DNA de hemoplasmas (*Mycoplasma haemofelis* e/ou ‘*Candidatus M. haemominutum*’), comparada com gatos testados negativos para ambos os parasitos, no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 57
- Tabela 20.** Fatores/achados clínicos relacionados aos animais testados positivos para a presença de DNA de pelo menos um hemoplasma, ‘odds ratio’ (OR), intervalo de confiança (IC) a 95% e p-valores, comparados aos animais cuja presença do referido DNA não foi observada. 58
- Tabela 21.** Parâmetros laboratoriais mensurados no presente estudo, de acordo com a presença de DNA de pelo menos um hemoplasma (*Mycoplasma haemofelis* e/ou ‘*Candidatus M. haemominutum*’) e comparação destes com um grupo de referencial, composto de animais negativos para a presença do DNA desses parasitos. Animais testados no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 60
- Tabela 22.** Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença de DNA de pelo menos um hemoplasma (*Mycoplasma haemofelis* e/ou ‘*Candidatus M. haemominutum*’) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os parasitos, no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 23.** Risco ('odds ratio' - OR) de infecções por hemoplasmas (resultado) e intervalos de confiança (IC) a 95% associados com a presença de um estado previamente positivo por ELISA para o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV), comparado com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006. 62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultados da PCR (abaixo) e Southern Blot (acima) para a detecção de uma porção do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (191 pb) entre gatos domésticos com um resultado positivo para FIV. (1): Marcador de peso molecular 100pb; (2): Controle positivo de DNA; (3): Controle negativo - água; (4): Controle Negativo – DNA; (5 a 30): Amostras clínicas testadas para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ DNA entre gatos com FIV. A figura mostra que todos os animais testados positivos na PCR, tiveram o resultado confirmado na técnica de SB. 53
- Figura 2.** Resultados da PCR (abaixo) e Southern Blot (acima) para a detecção de uma porção do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemofelis* (393 pb) entre gatos domésticos negativos para ambos FIV/FeLV. (1): Marcados de peso molecular 100pb; (2): Controle positivo de DNA; (3): Controle negativo - água; (4): Controle Negativo – DNA; (5 a 29): Amostras clínicas testadas para *M. haemofelis* nos gatos negativos para FIV/FeLV; (30): Amostra clinica com resultado positivo previamente conhecido. A figura mostra uma maior sensibilidade da técnica de SB, pela qual foram detectados resultados positivos adicionais. 54
- Figura 3.** Resultado ilustrativo da PCR direcionada para a detecção de uma porção do gene GAPDH cujo produto possui 399 pares de base, nas 149 amostras coletadas de gatos domésticos. A análise do gel de agarose corado com brometo de etídeo comprova a presença de DNA amplificável nas amostras utilizadas (1): Marcador de peso molecular 100pb; (2): Controle positivo de DNA; (3): Controle negativo - água; (4 a 23): amostras em estudo, todas positivas para a presença do gene em questão. 54
- Figura 4.** Esfregaço sangüíneo considerado positivo para Hemoplasma mediante a avaliação. Este resultado foi confirmado por técnicas moleculares, que detectaram o DNA de *M. haemofelis* na amostra. Coloração: Wright. 1200X. 56

LISTAS DE ABREVIACÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

AIF	Anemia infecciosa felina
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Trifosfatos desoxirribonucleosídeos
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Do inglês, 'Enzyme-liked immunosorbent assay'
EUA	Estados Unidos da América
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Hb	Hemoglobinometria
HCl	Ácido clorídrico
IC	Intervalo de confiança
Ig	Imunoglobulina
KCl	Cloreto de potássio
Kda	Quilodalton
LG	Leucometria global
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OR	Do inglês, 'Odds ratio' ou razão de chances
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPT	Proteínas plasmáticas totais
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	PCR em tempo real
SB	Southern blot/hibridização
SDS	Sódio dodecil sulfato
SSC	Salina sódio citrato
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VG	Volume globular
VGM	Volume globular médio
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Histórico sobre Hemoplasmas Felinos	2
2.2	Hemoplasmas em Outras Espécies	3
2.3	Patogenia, Manifestações Clínicas e Achados Laboratoriais das Infecções por Hemoplasmas Felinos	4
2.3.1	Infecções por <i>M. haemofelis</i>	5
2.3.2	Infecções por ‘ <i>Candidatus M. haemominutum</i> ’ ou ‘ <i>Candidatus M. turicensis</i> ’	7
2.3.3	Alterações no leucograma em infecções por hemoplasmas	8
2.3.4	Alterações bioquímicas em infecções por hemoplasmas	9
2.3.5	Resposta imunológica em consequência à presença dos hemoplasmas	9
2.4	Estudos Epidemiológicos no Mundo	10
2.4.1	Hemoplasmas em gatos domésticos no Brasil	16
2.4.2	Hemoplasmas em felinos silvestres	17
2.4.3	Transmissão	17
2.5	Diagnóstico	19
2.5.1	Isolamento	19
2.5.2	Sorologia	19
2.5.3	Avaliação do esfregaço sangüíneo	19
2.5.4	Uso de técnicas moleculares para a identificação e classificação de microrganismos	21
2.5.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção dos hemoplasmas felinos	22
2.5.6	PCR em tempo real	23
2.6	Retrovírus Felinos (FIV e FeLV)	23
2.6.1	Associação entre infecções por retrovírus (FIV e/ou FeLV) e hemoplasmas felinos	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Animais	28
3.2	Divisão de Grupos	28
3.3	Coleta de dados	28
3.4	Hemograma e Concentração Total de Proteínas Plasmáticas	29
3.5	Extração/Purificação do DNA Genômico	29
3.6	Envio das Amostras	29
3.7	PCR	30
3.8	Southern Blot e Hibridização	32
3.9	Clonagem e Seqüenciamento dos Produtos	33
3.10	Análise Estatística	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Análise Descritiva dos Dados Obtidos	35
4.2	Prevalência dos Vírus da Imunodeficiência e Leucemia Felina nos Gatos Testados	35

SUMÁRIO

4.3	Fatores Associados às Infecções por FIV e/ou FeLV	37
4.4	Achados Clínicos Relacionados às Infecções por FIV e/ou FeLV	43
4.5	Achados Laboratoriais Relacionados às Infecções por FIV e/ou FeLV	47
4.6	PCR, Southern Blot e Prevalência dos Hemoplasmas	52
4.6.1	Fatores associados à infecção por hemoplasmas	56
4.7	Fatores Associados à Infecção por Hemoplasmas em Gatos com FIV e/ou FeLV	62
5	CONCLUSÕES	65
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXOS	87
A	- Termo de autorização apresentado aos proprietários dos animais visando a autorização para a inclusão destes no estudo.	88
B	- Ficha de entrevista com os proprietários, bem como orientações para o Clínico acerca da coleta de material e apresentação dos resultados do hemograma	89

1 INTRODUÇÃO

O paciente felino ganhou grande importância dentro da Medicina Veterinária na última década. Devido à verticalização das residências e redução do espaço das mesmas, bem como a independência e adaptabilidade do gato a diferentes condições, o número destes como animal de companhia teve recentemente um crescimento exponencial. Hoje, o paciente felino já responde por uma margem considerável de atendimentos em clínicas, bem como de pedidos de exames laboratoriais.

As doenças infecto-contagiosas possuem uma alta morbidade entre os animais e um diagnóstico impreciso ou retardado pode resultar, inclusive, no óbito do paciente. A aglomeração em áreas urbanas aumenta o risco de contágio dessas doenças, bem como as suas consequências, sejam elas sanitárias, econômicas ou sociais. O diagnóstico deve ser preciso e o mais prematuro possível, pois como em qualquer doença, a precocidade do mesmo desempenha grande papel no sucesso do tratamento e prognóstico do paciente.

Inexistem, até o presente, estudos no Brasil que examinem criticamente se infecções por hemoplasmas estariam ou não associadas à presença dos retrovírus nos gatos. O uso de uma população de gatos previamente positivos para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou vírus da leucemia felina (FeLV) foi um fator único a esse estudo. Espera-se que com este estudo tenham sido gerados subsídios para uma conduta clínica apropriada por parte dos Médicos Veterinários ao se depararem com o problema, e assim diminuir o alto risco de morte dos gatos coinfectados com retrovírus felinos e hemoplasmas. Ademais, uma maior atenção às doenças dos gatos domésticos se faz necessária dada a crescente importância destes na sociedade como animal de companhia.

Com base nessas informações, e na ausência de dados disponíveis em animais do Brasil acerca do problema, tomou-se como hipótese que gatos infectados com retrovírus estariam em maior risco para a presença de infecções por hemoplasmas felinos. Desta forma, o presente estudo se justifica pelos seguintes motivos: a) falta de informações sobre infecções por hemoplasmas felinos associados com retrovírus felinos no Brasil; b) necessidade de serem gerados subsídios para uma conduta clínica apropriada por parte dos Médicos Veterinários ao se depararem com o problema; e c) uma maior atenção às doenças dos gatos domésticos se faz necessária dada a crescente importância destes na sociedade como animal de companhia.

Este é o primeiro estudo profundo utilizando-se técnicas moleculares para avaliar a relação entre um estado positivo para retrovírus felinos e infecções por hemoplasmas em gatos domésticos no Brasil. O uso de uma população de animais positivos para retrovírus felinos e a comparação desses grupos com um grupo de referência, negativo para ambos FIV e FeLV foi exclusivo do planejamento e execução deste trabalho.

Outrossim, os objetivos deste trabalho foram determinar a ocorrência de infecções por hemoplasmas, em gatos selecionados com base em estarem naturalmente infectados por FIV e/ou FeLV, comparando os achados com um grupo de referência e, quando possível, analisar presença de fatores associados às infecções por hemoplasmas nos grupos estudados

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico sobre Hemoplasmas Felinos

Na África do Sul Clark (1942), que avaliava esfregaços de sangue periférico e impressões esplênicas de um gato doméstico macho e castrado, observou que aproximadamente 10% dos eritrócitos deste animal apresentavam parasitos compatíveis com o gênero *Eperythrozoon* em células basofílicas imaturas e maduras. Uma vez que o parasito nunca havia sido descrito em gatos ou outros felinos, o mesmo foi considerado uma nova espécie, batizada de *E. felis*. Uma década depois, um parasito semelhante foi descrito pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA) e apontado como o causador da enfermidade conhecida como Anemia Infecciosa Felina (AIF) (FLINT; MOSS, 1953). Neste estudo, um gato de quatro anos, macho, foi identificado como infectado durante uma avaliação hematológica de rotina, que revelou na microscopia corpúsculos pequenos e arredondados sobre as hemácias, aparentemente fixados às mesmas. Posteriormente, infecções experimentais com o sangue deste animal foram realizadas, sendo os parasitos detectados com sucesso nos receptores (SPLITTER et al., 1956). Os corpúsculos eram pleomórficos, aparecendo ora sólidos pequenos e arredondados, ora como pequenos anéis, vírgulas, raquetes de tênis ou pequenos bastões. Desta forma, e se baseando no seu processo de multiplicação e nos aspectos morfológicos das estruturas encontradas, esses autores sugeriram que as mesmas seriam semelhantes às pertencentes ao gênero *Haemobartonella*, e que as alterações causadas pela infecção seriam mais relacionadas à hemobartonelose do que as causadas por espécies de *Eperythrozoon*. Apontando para o estudo de Flint e Moss (1953), e devido à crença de que o agente etiológico em questão pertenceria ao gênero *Haemobartonella*, a denominação *H. felis* foi proposta para o mesmo (FLINT et al., 1958).

Os hemoplasmas felinos foram previamente classificados como *H. felis*, uma riquetsia (RISTIC; KREIER, 1984), entretanto, com base nas análises da seqüência da subunidade 16S de seu RNA ribossomal (16S rRNA), duas seqüências distintas foram identificadas em gatos domésticos. Até o início deste século, dois isolados (Ohio e Califórnia) de *H. felis* haviam sido descritos nesses animais, tendo como base análises morfológicas e no seqüenciamento do 16S rRNA do parasito (RIKIHISA et al., 1997; FOLEY et al., 1998). Entretanto, após novas análises desse mesmo gene e de características fenotípicas (tamanho reduzido do parasito e seu genoma, ausência de parede celular e flagelo, resistência à penicilina e análogos, e susceptibilidade à tetraciclina), os gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram removidos da ordem Rickettsiales, sendo alocados na classe Mollicutes. Os parasitos foram reclassificados como membros do gênero *Mycoplasma*, definindo um novo grupo de parasitos de eritrócitos neste gênero, genericamente chamados de hemoplasmas (NEIMARK et al., 2001; FOLEY; PEDERSEN, 2001; MESSICK et al., 2002; NEIMARK et al., 2002). Desta forma, os isolados Ohio e Califórnia de *H. felis*, foram realocados no *Taxa*, passando a integrar o gênero *Mycoplasma*, sendo nomeados, respectivamente, *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (NEIMARK et al., 2001; FOLEY; PEDERSEN, 2001). Assim, de uma forma geral, os hemoplasmas felinos são caracterizados como bactérias Gram-negativas que parasitam eritrócitos de gatos domésticos (NEIMARK et al., 2001; MESSICK, 2004).

Recentemente, uma terceira espécie de hemoplasma, ‘*Candidatus M. turicensis*’ foi identificada por Willi et al. (2005). Ademais, Sykes et al. (2007a) sugeriram que um hemoplasma canino, ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, poderia infectar felinos domésticos. A classificação taxonômica atual dos hemoplasmas felinos, bem como a anterior, está descrita no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação taxonômica dos hemoplasmas felinos, vigente até o início da presente década (esquerda), e a nova classificação instituída após a realocação do parasito no *Taxa* (direita).

	Classificação anterior [†]	Classificação atual [‡]
Reino	Procariotae	Bacteria
Filo	Proteobacteria	Firmicutes
Classe	Alphaproteobacteria	Mollicutes
Ordem	Rickettsiales	Mycoplasmatales
Família	Anaplasmataceae	Mycoplasmataceae
Gênero	<i>Haemobartonella</i>	<i>Mycoplasma</i>
Espécies	<i>H. felis</i>	<i>M. haemofelis</i> ^a ' <i>Candidatus M. haemominutum</i> ' ^b ' <i>Candidatus M. turicensis</i> ' ^c ' <i>Candidatus M. haematoparvum</i> ' ^{d,e}

[†]Ristic e Kreier (1984)

[‡]Neimark et al. (2001)^a; Foley e Pedersen, (2001)^b; Willi et al. (2005)^c; Sykes et al. (2005)^d; Sykes et al. (2007a)^e.

É importante salientar que a designação '*Candidatus*' é reservada para identificar membros do *Taxon* cujo cultivo é difícil ou impossível, sendo assim, sua descrição é limitada (MURRAY; SACEBRANDT, 1995).

2.2 Hemoplasmas em Outras Espécies

Os hemoplasmas já foram encontrados como parasitos em diversas espécies de mamíferos, causando alterações clínicas e patológicas de brandas a acentuadas. É importante salientar que todas as espécies dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram reclassificados como pertencentes ao gênero *Mycoplasma*. As espécies de hemoplasmas não felinos, bem como a nomenclatura, posição taxonômica anterior, atual e seus hospedeiros naturais se encontram listados no Quadro 2.

Quadro 2. Espécies de hemoplasmas não-felinos que acometem animais domésticos com suas respectivas posições nos *Taxa* anterior (quando considerados membros da família Anaplasmataceae) e atual (depois de realocados para a Classe Mollicutes), bem como seus respectivos hospedeiros naturais.

<i>Taxon anterior</i>	<i>Taxon vigente</i>	Hospedeiros naturais
<i>Eperythrozoon suis</i> ^a	<i>Mycoplasma suis</i> ^b	Suínos
<i>E. wenyonii</i> ^c	<i>M. wenyonii</i> ^b	Bovinos
<i>E. coccoides</i> ^d	<i>M. coccoides</i> ^e	Camundongos
<i>E. ovis</i> ^f	<i>M. ovis</i> ^g	Ovinos e caprinos
<i>Haemobartonella muris</i> ^h	<i>M. haemomuris</i> ^b	Ratos, camundongos e hamsters
<i>H. canis</i> ^h	<i>M. haemocanis</i> ⁱ	Cão
	‘ <i>Candidatus M. haemodidelphidis</i> ’ ⁱ	Gambás
	‘ <i>Candidatus M. haemolamae</i> ’ ⁱ	Alpaca
	‘ <i>Candidatus M. haematoparvum</i> ’ ^j	Cão

Referências: Splitter (1950)^a; Neimark et. al (2001)^b; Adler e Ellenbogen (1934)^c; Schilling (1928)^d *apud* Neimark et. al (2005)^e; Neimark et. al (2005)^e; Neitz et al. (1934)^f; Neimark et al. (2004)^g; Tyzzer e Weinman (1939)^h; Messick et al. (2002)ⁱ; Sykes et al. (2005)^j.

Os relatos de infecções por hemoplasmas em humanos são raros. Patógenos de animais que são raramente descritos em humanos vêm sendo reportados como causadores de novas infecções oportunistas (DUARTE et al., 1992). Estruturas associadas a eritrócitos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico sugerem uma associação entre a presença de organismos similares a hemoplasmas (*Haemobartonella*) (KALLICK et al., 1972).

2.3 Patogenia, Manifestações Clínicas e Achados Laboratoriais das Infecções por Hemoplasmas Felinos

Muitas espécies do gênero *Mycoplasma*, ao qual pertencem os hemoplasmas, comumente colonizam e infectam humanos, enquanto os hemoplasmas infectam primariamente animais vertebrados não-humanos. Estes não são achados na natureza como organismos de vida livre, e, além disso, dependem de uma célula hospedeira para a obtenção de compostos essenciais que não são capazes de produzir. Desta forma, como os hemoplasmas, outros *Mycoplasma* spp. causam tanto doença aguda quanto com risco de morte, assim como condições crônicas associadas com uma redução no crescimento e sinais clínicos variados em vários hospedeiros (MESSICK, 2004).

Os parasitos se aderem, mas não penetram, na superfície dos eritrócitos. Eles são achados em depressões superficiais ou invaginados mais profundamente na superfície, com uma zona de 15-20nm livre separando o parasito da membrana celular do eritrócito (MESSICK, 2004). Fibrilas delicadas a projetadas a partir do parasito parecem se lançar através dessa ‘zona livre’, conectando o organismo com a célula hospedeira (MAEDE; MURATA, 1978; MAEDE, 1979; MESSICK, 2004).

O espectro clínico das infecções pelos hemoplasmas felinos varia de animais assintomáticos até crises hemolíticas graves, que podem levar a morte (FOLEY et al., 1998). Essas crises dependem de fatores, como a espécie de hemoplasma envolvida, a susceptibilidade do hospedeiro, do grau e velocidade de desenvolvimento da anemia e se outras infecções agudas ou crônicas estão concorrentes (MESSICK, 2004; TASKER; LAPPIN, 2006; WILLI et al., 2007c). Gatos experimentalmente infectados com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ou *M. haemofelis* podem mostrar diferentes sinais. Enquanto no primeiro

caso os sinais de infecção são mínimos e a anemia é branda ou ausente, gatos infectados com *M. haemofelis* apresentam anemia hemolítica acentuada com certa frequência (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998). A rota de infecção e a dose do inóculo também podem influenciar na gravidade de uma infecção (WESTFALL et al., 2001)

2.3.1 Infecções por *M. haemofelis*

De acordo com Harvey e Gaskins (1977) a doença pode ser dividida, de forma arbitrária, em quatro fases:

- a) Fase pré-parasitêmica, que compreende do momento da inoculação do parasito até o aparecimento da primeira parasitemia; é a fase mais curta (2-17 dias) e raros parasitos são observados antes do primeiro episódio parasitêmico.
- b) Fase aguda, que compreende da primeira até a última parasitemia, sendo a fase onde ocorrem as parasitemias cíclicas e onde a anemia e os sinais clínicos se tornam evidentes;
- c) Fase de recuperação, que abrange o tempo entre o último pico parasitêmico e a recuperação do volume globular (VG) até 30% e;
- d) Fase de portador/fase crônica, que vai da fase anterior até o momento em que o animal esteja considerado livre do parasito.

Na fase aguda, os animais podem ser predispostos às infecções agudas devido à idade, doenças concomitantes, imunossupressão ou esplenectomia, entretanto, *M. haemofelis* também é responsável pela presença de anemia em gatos não esplenectomizados (MESSICK, 2004). A gravidade da doença produzida por *M. haemofelis* varia, com alguns animais apresentando uma anemia leve e ausência de sinais clínicos e outros com uma considerável depressão e anemia acentuada, resultando no óbito (HARVEY, 2006). Infecções agudas por *M. haemofelis* podem gerar crises hemolíticas acentuadas e às vezes fatais, inclusive em animais imunocompetentes, sendo a mortalidade elevada nesta fase (SYKES, 2003; WILLI et al., 2007c).

Os sinais clínicos da fase aguda da doença em animais natural e experimentalmente infectados incluem letargia, fraqueza, anorexia, perda de peso, desidratação, palidez, taquicardia, taquipnéia, esplenomegalia, febre intermitente (quando há um número elevado de parasitos no sangue), anemia, hepatomegalia, esplenomegalia (provavelmente em reflexo a uma hematopoiese extramedular), linfadenopatia e, ocasionalmente, icterícia (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001; HARRUS et al., 2002; MESSICK, 2003; SYKES, 2003; MESSICK, 2004; TASKER; LAPPIN, 2006; WILLI et al., 2007c). Jensen et al. (2001) relataram que gatos anêmicos estariam mais propensos à infecções por hemoplasmas. Entretanto, alguns estudos de prevalência, não revelaram essa associação (TASKER et al., 2003b; TASKER et al., 2004). O organismo pode ser detectado citologicamente em gatos anêmicos e clinicamente normais. A análise desses resultados aponta que a infecção por hemoplasmas felinos, detectada por citologia ou PCR, não indica necessariamente doença clínica, não importando a espécie de hemoplasma encontrada (WESTFALL et al., 2001). A variação de resultados nesses estudos pode refletir a metodologia de seleção das amostras bem como às diferenças na susceptibilidade individual às infecções (TASKER; LAPPIN, 2006; WILLI et al., 2007c). Os sinais clínicos dependerão sempre do estágio da doença e da rapidez que a anemia se desenvolve.

A doença aguda causada por *M. haemofelis* é associada com uma parasitemia acentuada das hemácias circulantes, causando uma anemia hemolítica grave, algumas vezes fatal (MESSICK, 2004). Nesta fase, os parasitos estão presentes no sangue circulante durante metade do tempo, que frequentemente dura mais de um mês. Um episódio parasitêmico raramente persiste além de quatro dias sendo que em média dura de um a dois dias

(HARVEY; GASKIN, 1977). O pico de bacteremia de maior queda do VG são constatados em torno de duas semanas após a infecção experimental por *M. haemofelis* (TASKER et al., 2006b). Esses episódios costumam ser seguidos por vários dias onde poucos ou nenhum parasito é observado, sendo possível a visualização em uma coleta e obter um resultado oposto na coleta seguinte (FLINT et al., 1958; HARVEY; GASKIN, 1977; BERENT et al., 1998).

Nesta fase, o VG se encontra reduzido nos dias onde muitos parasitos são encontrados no sangue e durante alguns dias após um episódio parasitêmico, sendo que a recorrência destes foi associada com o desenvolvimento de anemia nos gatos (HARVEY; GASKIN, 1977). O VG geralmente cai com o aumento do número de parasitos no sangue, mas se eleva após a saída dos organismos da circulação. Pode ocorrer febre durante as parasitemias, bem como anorexia e perda de peso.

Gatos com infecções agudas por *M. haemofelis* desenvolvem uma hemólise acentuada que pode ser caracterizada pela presença de um número elevado de cópias do DNA do parasito na circulação, detectado através de PCR em tempo real (WILLI et al., 2006b).

A anemia associada com a infecção por *M. haemofelis* é tipicamente regenerativa, mostrando anisocitose, policromasia, com um aumento no número absoluto de reticulócitos (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998; MESSICK, 2003; SYKES, 2003). Corpúsculos de Howell-Jolly e presença de hemácias nucleadas e eritrofagocitose são achados comuns após a queda do VG (FLINT et al., 1958; HARVEY; GASKIN, 1977; HARVEY; GASKIN, 1978; VANSTEENHOUSE et al., 1995; FOLEY et al., 1998; MESSICK, 2003; SYKES, 2003). A presença de eritrócitos nucleados sugere um trauma de medula óssea, possivelmente em decorrência à hipoxia, o que é consistente com a manifestação clínica de dispnéia (FOLEY et al., 1998). É importante assinalar que a gravidade da anemia depende do estágio da infecção, e o VG pode cair até abaixo dos 20% nos picos de parasitemia (MESSICK, 2003). Macrocitose e normocromia também são achados comuns em infecções por *M. haemofelis*, embora uma hipocromia possa ser assinalada em um momento mais adiantado da infecção (FOLEY et al., 1998; HARVEY, 2006). Em um estudo experimental com *M. haemofelis*, todos os animais infectados desenvolveram anemia hemolítica de 15 a 17 dias após a inoculação, com o volume globular variando de 15-19% (BERENT et al., 1998). Uma anemia não-regenerativa pode ser observada no estágio inicial da infecção, quando ainda não houve tempo para uma resposta medular efetiva do hospedeiro (SYKES, 2003). É possível ainda observar uma autoaglutinação em amostras de sangue refrigeradas durante o estágio agudo inicial da infecção (ZULTY; KOCIBA, 1990). Entretanto, o significado clínico deste achado necessita esclarecimentos (BÜCHELER; GIGER, 1991).

Uma vez que eritrócitos parasitados por *M. haemofelis* podem ser seqüestrados principalmente pelo baço e que os organismos podem ser removidos das células hospedeiras sem a destruição das mesmas, voltando à circulação, o VG pode não refletir a massa de eritrócitos do animal (HARVEY; GASKIN, 1977; 1978).

Deve-se apontar que, apesar de todas as alterações nos parâmetros hematológicos previamente descritas serem constantemente observadas na circulação durante a fase aguda da infecção, esses achados não são indicadores confiáveis de uma resposta regenerativa à anemia no gato.

A proporção mielóide:eritróide na medula óssea está normal nos estádios iniciais da doença, porém reduzida subseqüentemente. A hiperplasia eritróide é manifestada não apenas por um aumento no número total de células eritróides, mas também por uma proporção aumentada de estádios imaturos (HARVEY, 2006).

Na fase de recuperação os organismos são freqüentemente observados, porém sempre em número reduzido (HARVEY; GASKIN, 1977). A recuperação hematológica é mais demorada do que a clínica, podendo as variáveis sanguíneas dos gatos permanecer instáveis

por semanas ou meses após a recuperação clínica (HARVEY; GASKIN, 1978; BOBADE et al., 1988; FOLEY et al., 1998).

Animais infectados por hemoplasmas podem se tornar carreadores crônicos por um longo tempo, mesmo quando tratados com antibióticos efetivos contra a doença clínica (WILLI et al., 2007c). Nesta fase, os animais parecem viver em um estágio balanceado, no qual a replicação dos organismos está em equilíbrio com a fagocitose e remoção dos mesmos, apesar de que a reativação da infecção pode ocorrer e resultar em doença clínica (HARVEY, 2006; TASKER; LAPPIN, 2006). A doença clínica pode estar oculta ou pobremente definida em animais aparentemente saudáveis, imunocompetentes e não-esplenectomizados (MESSICK, 2004). Esses animais podem, mesmo na ausência de sinais clínicos, apresentarem altas concentrações de DNA de *M. haemofelis* no sangue, bem como podem ser visualizados parasitos na avaliação do esfregaço sangüíneo (HARVEY; GASKIN, 1978; WILLI et al., 2006b). Assim, estes portadores sadios podem ainda representar uma fonte de infecção para gatos no ambiente, além de ser possível a reativação da doença (HARVEY; GASKIN, 1978; FOLEY et al., 1998; FOLEY; PEDERSEN, 2001). A capacidade de transmissão do agente foi comprovada, uma vez que o sangue de gatos cronicamente infectados gerou doença quando inoculado em animal receptor livre de infecção (HARVEY; GASKIN, 1978).

Gatos portadores freqüentemente não podem ser hematologicamente diferenciados de gatos hígdos e clinicamente sadios, e raros ou nenhum parasito é observado na avaliação do esfregaço sangüíneo (HARVEY; GASKIN, 1978; MESSICK, 2004). Nesta fase, a eliminação completa dos parasitos não foi observada em gatos amostrados diariamente por mais de um ano. Pode haver queda branda do VG, mas dentro dos valores referenciais, assim como uma reticulocitose leve com policromasia e macrocitose ocasionais (HARVEY; GASKIN, 1977; HARVEY; GASKIN, 1978; HARVEY, 2006).

Infecções crônicas ou subclínicas por hemoplasmas se constituem, inclusive, em problemas para a experimentação animal, uma vez que esses parasitos causam alterações profundas na resposta de hospedeiros infectados a uma grande variedade de procedimentos (BAKER et al., 1971). Atualmente, pesquisadores que realizam ensaios experimentais em animais criados para este fim necessitam estabelecer uma vigilância eficaz e precisam, ademais, mostrar a ausência de infecções por hemoplasmas para assegurar a validade dos resultados científicos no futuro (KEMMING et al., 2004a; KEMMING et al., 2004b).

Estudos recentes sugerem diferenças entre os três hemoplasmas felinos e suas habilidades de estabelecer uma condição portadora. Um estado de portador parece ser comumente encontrado em infecções por '*Candidatus M. haemominutum*', mas menos freqüente em infecções por *M. haemofelis* (TASKER, 2006).

2.3.2. Infecções por '*Candidatus M. haemominutum*' ou '*Candidatus M. turicensis*'

Estudos recentes (experimentais e de prevalência) mostraram diferenças na patogenicidade entre *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001; JENSEN et al., 2001). Infecções por '*Candidatus M. haemominutum*' em animais sadios geralmente não resultam em mudanças hematológicas significativas ou aparecimento de sinais clínicos consideráveis (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001; GEORGE et al., 2002; LORIMIER; MESSICK, 2004). Entretanto, o parasito parece ter importante papel como cofator, que levaria ao aumento na patogenicidade, em casos de infecções por mais de um hemoplasma ou outras doenças debilitantes (FOLEY et al., 1998; GEORGE et al., 2002; WILLI et al., 2006b). Durante o curso da infecção o VG pode baixar, entretanto se mantém dentro do intervalo de referência e, adicionalmente, organismos isolados, e ocasionalmente múltiplos, podem ser detectados nos eritrócitos no pico de parasitemia (FOLEY et al., 1998; TASKER et al., 2003b). George et al.

(2002) sugeriram que este hemoplasma pode perder patogenicidade após passagens em diversos gatos livres de FeLV.

Embora as infecções com este hemoplasma sejam geralmente assintomáticas, quedas no VG têm sido associadas em animais imunocomprometidos, infectados por retrovírus ou em curso de tratamento quimioterápico (GEORGE et al., 2002; LORIMIER; MESSICK, 2004). Um outro estudo apontou uma significativa queda do VG após a infecção experimental por '*Candidatus M. haemominutum*' (TASKER et al., 2006a). Há outros relatos onde infecções por '*Candidatus M. haemominutum*' também poderiam causar alterações clínico-patológicas significativas. Um estudo realizado na Austrália envolvendo animais naturalmente infectados mostrou que gatos infectados com '*Candidatus M. haemominutum*' apresentavam VG significativamente menor do que animais negativos para hemoplasmas (TASKER et al., 2004). Lorimier e Messick (2004) ao relatarem um caso concluíram que uma anemia clinicamente significativa e com risco de causar a morte do animal poderia se desenvolver em um gato idoso infectado pelo parasito, na presença de alguma doença coexistente, como linfoma, algo que provoque estresse, ou imunossupressão. Por último, Reynolds e Lappin (2007) relataram que seis de 21 animais anêmicos analisados, não apresentaram outra justificava óbvia para a anemia se não a infecção pelo hemoplasma em questão. Ademais, os mesmos autores apontam que alguns gatos responderam satisfatoriamente ao tratamento com drogas anti-hemoplasmas, sugerindo que '*Candidatus M. haemominutum*' pode ser um patógeno primário em alguns gatos naturalmente infectados.

É importante reconhecer que, apesar da intensa resposta imunológica ou tratamento com antibióticos, gatos que estejam infectados tanto com '*Candidatus M. haemominutum*' quanto por *M. haemofelis* podem se manter portadores crônicos do parasito (FOLEY et al., 1998; MESSICK, 2003). Este fato explica os ciclos de recidiva em animais cronicamente infectados (FOLEY et al., 1998).

O potencial patogênico de '*Candidatus M. turicensis*' parece depender de cofatores, como imunossupressão iatrogênica, induzida por retrovírus, infecção concorrente com outro hemoplasma ou até mesmo outros fatores ainda não definidos (WILLI et al., 2005; WILLI et al., 2006b; WILLI et al., 2007c). Apenas animais infectados com este novo hemoplasma concomitantemente com os previamente conhecidos mostraram VG reduzido de forma significativa quando comparado aos animais sem infecção por hemoplasmas (WILLI et al., 2006a). Um efeito aditivo das infecções por hemoplasmas na doença clínica foi reportado para gatos coinfectados com *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' (WESTFALL et al., 2001). Esses achados sustentam a hipótese que cofatores, como infecções concomitantes com outros hemoplasmas ou imunossupressão podem estar envolvidos no desenvolvimento da anemia em animais positivos para '*Candidatus M. turicensis*', o que leva a necessidade de que um resultado PCR-positivo para este parasito seja interpretado em conjunto com os achados clínicos e laboratoriais (WILLI et al., 2006a). Apesar da doença ser caracterizada por hemólise extravascular, a existência de hemólise intravascular poderia ocorrer nos casos de parasitemia por '*Candidatus M. turicensis*', sendo uma anemia de leve à moderada (WILLI et al., 2005).

A eliminação total da infecção por '*Candidatus M. turicensis*' parece ter sido atingida com sucesso após o tratamento, pois tentativas de induzir uma recidiva através da administração de drogas imunossupressoras fracassaram (WILLI et al., 2005; WILLI et al., 2006b).

2.3.3 Alterações no leucograma em infecções por hemoplasmas

Uma neutrofilia com leve desvio à esquerda durante a fase aguda foi reportada por Flint et al., (1958) e Bobade et al., (1988). Entretanto, a leucometria global pode variar de

reduzida a aumentada, mas permanece na maioria das vezes dentro do intervalo de referência (HARVEY; GASKIN, 1977; VANSTEENHOUSE et al., 1995; SYKES, 2003). Em alguns casos, uma neutropenia moderada pode ocorrer logo após o aparecimento da anemia e neutrofilia, durante a recuperação (FOLEY et al., 1998).

2.3.4 Alterações bioquímicas em infecções por hemoplasmas

Achados bioquímicos incluem hiperbilirrubinemia, proteinúria e aumento das enzimas hepáticas, azotemia pré-renal (provavelmente em virtude da desidratação) e em alguns casos hiperproteinemia após episódios parasitêmicos (VANSTEENHOUSE et al., 1995; HARRUS et al., 2002; SYKES, 2003; WILLI et al., 2007c). Esta, também já foi relatada em infecções com '*Candidatus M. turicensis*' (WILLI et al., 2006a). As alterações na atividade das enzimas hepáticas podem refletir hipoxia secundária à anemia ou ainda lipidose hepática em virtude da anorexia (HARVEY, 2006).

Uma elevação nos níveis de uréia, creatinina, proteínas plasmáticas totais e lipase, bem como diagnóstico de doença renal já foi relatado em infecção por '*Candidatus M. haemominutum*'. Entretanto, essa associação pode não ser causal, uma vez que, por exemplo, os animais infectados examinados no estudo tinham idade avançada (WILLI et al., 2006a). Uma glicemia reduzida também foi descrita por VanSteenhouse et al., (1995) em um animal moribundo.

Os mesmos autores citados previamente apontaram outras alterações bioquímicas pouco comuns, como hiperfosfatemia, hipoalbuminemia, elevação na concentração total de dióxido de carbono e conseqüente acidose.

2.3.5 Resposta imunológica em conseqüência à presença dos hemoplasmas

Danos aos eritrócitos podem induzir a produção de anticorpos anti-eritrocíticos, ou direcionados contra os hemoplasmas de forma direta, resultando em conseqüente destruição da célula hospedeira (TASKER; LAPPIN, 2006). Assim, se postula que a ligação do organismo aos eritrócitos pode não só expor antígenos escondidos das células vermelhas como resultar em alterações das mesmas, sendo que o hospedeiro responde produzindo anticorpos contra as hemácias (HARVEY, 2006). O teste de Coombs` é positivo, sendo postulado que a resposta imunológica do hospedeiro à infecção por hemoplasmas pode exacerbar o episódio hemolítico agudo e o teste permanecer positivo durante toda a fase aguda da doença (MESSICK, 2004; HARVEY, 2006). A presença de inclusões cristalóides em eritrócitos de animais positivos altera a forma dos glóbulos vermelhos, e seria uma característica intrínseca da hemoglobina de gato, entretanto, é possível que a infecção por *M. haemofelis* aumente a propensão da hemoglobina do gato formar cristais, diminuindo a capacidade de deformação dos eritrócitos e com isso aumentando as chances dos mesmos serem fagocitados (SIMPSON et al., 1978).

A ligação entre eritrócitos juntamente com organismos em comum aumenta o seqüestro das hemácias em espaços vasculares limitados, potencializando assim a fagocitose por macrófagos do sistema retículo-endotelial (SIMPSON et al., 1978). Tal fato pode explicar o rápido aumento do VG freqüentemente observado após a retirada dos organismos do sangue periférico bem como a eritrofagocitose vista comumente no sangue periférico em casos de doença aguda (HARVEY; GASKIN, 1977; HARVEY; GASKIN, 1978). Ademais, a visualização de parasitos livres, bem como de eritrócitos parasitados, em macrófagos no baço e pulmões pode explicar o destino destes após a 'eliminação' da circulação (SIMPSON et al., 1978). Ainda é possível que, além da anemia hemolítica imunomediada e infecção incidental por *M. haemofelis*, a resposta imune e destruição dos eritrócitos seja secundária à infecção,

uma vez que um aumento da fragilidade osmótica das hemácias foi observada em um estudo do mecanismo da anemia presente em gatos infectados por este hemoplasma, o que poderia levar à presença de células danificadas na circulação e conseqüente produção de anticorpos contra os eritrócitos (MAEDE; HATA, 1975). Essa hipótese seria reforçada pelo fato dos organismos se conectarem ao eritrócito causando invaginação da membrana celular e conseqüente alteração de forma da mesma (MAEDE; SONODA, 1975).

Gatos curados são susceptíveis à reinfeção (FLINT et al., 1959). Os gatos infectados com *M. haemofelis* não desenvolvem anticorpos específicos contra ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ao contrário da situação oposta, que ocorre de certa forma (FOLEY, PEDERSEN, 2001). Entretanto, infecções concomitantes com esses dois organismos já foram documentadas natural e experimentalmente (JENSEN et al., 2001; WESTFALL et al., 2001). Devido ao fato da anemia associada à infecção por *M. haemofelis* ser imunomediada, infecções anteriores com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ podem predispor o animal a doença imunomediada ao ser subseqüentemente exposto ao organismo mais patogênico (*M. haemofelis*) (WESTFALL et al., 2001).

Fortes evidências sugerem que a reação imunológica do hospedeiro desempenha importante papel no desenvolvimento dos sinais clínicos associados com infecções agudas e crônicas por *Mycoplasma* spp. (FOLEY et al. 1998; MESSICK, 2004). Gatos com infecção aguda por *M. haemofelis* podem desenvolver uma hemólise acentuada, por outro lado, animais cronicamente infectados que se recuperam da doença aguda podem não apresentar sinais clínicos mesmo com grande quantidade de parasitos no sangue (WILLI et al., 2007c).

Anticorpos específicos contra antígeno de *M. haemofelis* foram detectados no soro de um animal experimentalmente infectado no 14º dia pós-infecção, sugerindo que outro mecanismo de destruição imunomediada deveria ser considerado (ALLEMAN et al., 1999). Os mesmos autores sugeriram que o antígeno de 14 Kda não seria apenas o mais imunodominante dentre todos os antígenos de *M. haemofelis*, mas também seria reconhecido consistentemente pelo soro imune em diversos momentos durante o curso da infecção.

A primeira Imunoglobulina (Ig) da classe G, tanto contra *M. haemofelis* quanto ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi observada no 21º dia pós-infecção, sendo que no dia 28 PI o título atingiu 400. A possibilidade de reações cruzadas foi verificada entre esses dois hemoplasmas, indicando que lâminas com substrato de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ reagiriam apenas com soro de animal infectado por este parasito. Entretanto, substratos de *M. haemofelis* reagiram com ambos os hemoplasmas (FOLEY et al., 1998).

2.4 Estudos Epidemiológicos no Mundo

Os hemoplasmas felinos já foram observados em todos os continentes, com exceção do Antártico (CLARK, 1942; FLINT; MOSS, 1953; SEAMER; DOUGLAS, 1959; MANUSU, 1962; MASSARD et al., 1978; INOKUMA et al., 2004).

Baseado na morfologia dos organismos, sinais clínicos e achados laboratoriais, é provável que a maioria das publicações acerca de infecções por hemoplasmas felinos anteriores a 1998 se refira à forma ‘grande’ de *H. felis*, atualmente chamada de *M. haemofelis* (HARVEY, 2006). Ademais, devido à sensibilidade reduzida dos testes de diagnóstico para a detecção de hemoplasmas utilizados no passado, poucos estudos epidemiológicos acurados da infecção por hemoplasmas felinos foram reportados antes do ano 2000 (SYKES, 2003).

Um dos primeiros estudos epidemiológicos da anemia infecciosa felina, doença causada por *H. felis*, em gatos domésticos foi reportado por Hayes e Priester (1973). Neste estudo retrospectivo, foram usados dados de 43.514 gatos apresentados a 11 Universidades norte-americanas e uma prevalência de 0,86% foi encontrada, baseando-se em achados hematológicos e de necropsia. Gatos machos apresentaram 2,5 vezes mais chances de estarem

infectados por *H. felis*. Ademais, gatos sem raça definida, de pêlo curto ou ainda animais entre quatro e seis anos de idade também apresentaram um risco mais elevado de apresentar a doença. Durante a década de 1980, outro estudo de prevalência foi realizado na Europa por Nash e Bobade (1986). Usando a análise de esfregaços sangüíneos, os autores identificaram que 23% de 155 gatos apresentados à Escola de Veterinária da Universidade de Glasgow, Escócia, entre novembro de 1979 e julho de 1980 estavam infectados. Neste estudo, as infecções por *H. felis* foram mais prevalentes em gatos com pulgas, atingindo 61,1% dos mesmos. Além disso, 47,2% dos animais positivos para *H. felis* também tiveram o mesmo resultado para FeLV e, gatos com idade entre 7 e 8 anos apresentaram um maior risco de infecção pelo agente da anemia infecciosa felina (66,7%). Usando o mesmo método de diagnóstico, Grindem et al. (1990), acharam uma prevalência total de 4,9% (6/123) em coortes de animais doentes e sadios ao analisarem fatores de risco para infecções por *H. felis*. No mesmo estudo, ao analisarem as coortes em separado, 7,5% dos animais doentes estavam infectados por *H. felis* enquanto 3,6% dos gatos sadios estavam parasitados. Fatores responsáveis pela elevação do risco relativo para a infecção por *H. felis* identificados no referido estudo incluem a presença de doenças, anemia e/ou abscessos, positividade para FeLV, falta de vacinação, histórico de mordidas, idade (≤ 3 anos) e acesso a ambientes externos.

Devido às faltas de sensibilidade e especificidade da detecção microscópica do parasito, novas técnicas moleculares foram desenvolvidas a fim de fornecer um diagnóstico mais preciso e confiável. O desenvolvimento das técnicas de PCR específicas para um diagnóstico sensível e específico das infecções por hemoplasmas permitiu o estudo da epidemiologia e patogênese destes parasitos em maiores detalhes (WILLI et al., 2007c).

Usando um protocolo de PCR, Jensen et al. (2001) avaliaram 220 gatos domésticos dos EUA para a ocorrência de hemoplasmas. As amostras do grupo de estudo (82) foram obtidas de gatos domésticos com base nos sinais clínicos e hematológicos (febre, anemia ou ainda evidências citológicas do parasito). Amostras-controle (138) foram coletadas de animais sem nenhuma suspeita de infecção por hemoplasmas. Quarenta e três dos 220 animais (19,5%) apresentaram resultado PCR-positivo para hemoplasmas. Dentre os 82 gatos suspeitos, 10 (12,2%) tiveram o DNA de *M. haemofelis* (isolado Ohio de *H. felis*) detectado em seu sangue, enquanto nove (11%) apresentaram resultado PCR-positivo para '*Candidatus M. haemominutum*' e quatro (4,9%) animais estavam positivos para ambos os hemoplasmas totalizando assim uma frequência de 28% para infecções por hemoplasmas nesse grupo. Dentre os animais-controle, não houve resultados positivos apenas para *M. haemofelis*; por outro lado, 19/138 desses animais (13,8%) foram '*Candidatus M. haemominutum*'-positivos e apenas um (0,7%) apresentou PCR positiva para ambos os hemoplasmas. Assim, animais suspeitos estavam significativamente em maior risco de estarem infectados por hemoplasmas do que os animais-controle. No mesmo estudo, animais anêmicos estavam significativamente mais sujeitos à infecção por *M. haemofelis* (4/28; 14,3%) ou duplamente infectados (2/28; 7,1%) que animais sem anemia. Este foi o primeiro estudo molecular a diferenciar os dois isolados de hemoplasmas felinos conhecidos até então.

Em seqüência ao estudo previamente citado, diversos autores passaram a investigar a prevalência/frequência de infecções por hemoplasmas felinos no mundo utilizando técnicas moleculares. Ao analisarem amostras de 120 gatos saudáveis e 306 doentes no Reino Unido, frequências totais de 16,9 (72/426), 1,4 (6/426) e 0,2% (1/426) foram respectivamente encontradas para infecções por '*Candidatus M. haemominutum*', *M. haemofelis* e infecções múltiplas (TASKER et al., 2003a). Neste estudo os animais foram definidos como saudáveis ou doentes com base no histórico e motivo para a apresentação na clínica. Entre os gatos saudáveis, 10/120 (8,3%) apresentavam infecção por '*Candidatus M. haemominutum*', enquanto apenas 2/120 (1,7%) eram positivos para o DNA de *M. haemofelis*. Ao analisarem

os gatos doentes, 122/306 (39,9%) estavam anêmicos, e 184 (60,1%) apresentavam VG normal. No subgrupo de gatos anêmicos, 24/122 (19,7%) e 2/122 (1,6%) eram PCR-positivos para '*Candidatus M. haemominutum*' e *M. haemofelis* respectivamente. Dentre os animais doentes, porém não-anêmicos, 38/184 (20,7%) apresentaram DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' em seu sangue, enquanto que 2/184 (1,1%) e 1/184 (0,55%) estavam positivos para *M. haemofelis* e ambos os hemoplasmas respectivamente. Fatores de risco associados com a infecção por '*Candidatus M. haemominutum*' incluíram idade (mais velho, mais sujeito à infecção), sexo (machos), condição do grupo (animais doentes em maior risco, independentemente de anemia). Este estudo não conseguiu demonstrar nenhum fator de risco relacionado com *M. haemofelis*, provavelmente pelo baixo número de animais infectados.

Utilizando uma diferente abordagem na seleção das amostras, Kewish et al. (2004) estudaram uma população de 60 gatos no Canadá. Os autores dividiram os animais da seguinte forma: a) gatos com anemia regenerativa e presença de organismos no esfregaço sanguíneo (18/60; 30%); b) gatos com anemia não-regenerativa sem organismos identificados na análise microscópica (22/60; 36,7%); c) gatos sem alterações no hemograma e com sinais clínicos mínimos (20/60; 33,3%). Frequências de 66,7 (12/18) e 5,6% (1/18) para os DNA de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' foram encontradas respectivamente dentre os animais do grupo 'a'. Em relação ao grupo 'b', 4/22 (18,2%) dos gatos tiveram resultado positivo para *M. haemofelis*, sendo que a mesma frequência foi achada para infecções por '*Candidatus M. haemominutum*'. Não houve resultados positivos para *M. haemofelis* no grupo 'c', enquanto 10% (2/20) tiveram o DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' identificado. Uma taxa de infecção de 52,2% (21/40) foi obtida quando os dados dos grupos 'a' e 'b' foram combinados, mostrando que a anemia pode desempenhar um importante papel como fator associado para as infecções por hemoplasmas.

Através de técnicas de PCR e análise de digestão por enzimas de restrição, Inokuma et al. (2004) encontraram uma ocorrência de 17,7% para hemoplasmas em uma população de 102 gatos domésticos selecionados aleatoriamente dentre os apresentados à clínica universitária durante o período de um ano (março/2002 a março/2003) na região de Yamaguchi, Japão. Neste estudo, gatos foram agrupados como doentes (90/102) e sadios (12/102), sendo que todos os animais positivos para hemoplasmas foram identificados no primeiro grupo (18/90; 20%). Dentre os animais hemoplasma-positivos, 2/18 (11,1%) e 16/18 (88,9%) estavam infectados respectivamente por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*'. Dezesesseis de 52 (30,77%) dos gatos não confinados estavam infectados por alguma espécie de hemoplasma, enquanto apenas 1/36 (2,7%) dos animais sem acesso ao ambiente externo apresentavam a mesma infecção. Achados semelhantes foram revelados para animais positivos para FeLV. Três de quatro (75%) animais FeLV positivos apresentavam o mesmo resultado para a presença do DNA de algum hemoplasma, enquanto apenas nove, dentre os 63 animais FeLV-negativos tiveram uma infecção por hemoplasma identificada.

Usando um método mais recente de diagnóstico, a PCR em tempo real (RT-PCR), Tasker et al. (2004) testaram 147 gatos para a presença de DNA de hemoplasmas felinos na Austrália. A maioria das amostras foi coletada de gatos não sadios. Trinta e quatro de 147 animais (23,1%) eram positivos para '*Candidatus M. haemominutum*', enquanto 6/147 (4,1%) eram *M. haemofelis*-positivos. Apenas um dentre os 147 (0,7%) animais testados foi positivo para ambos os hemoplasmas. Neste estudo foram identificados os seguintes fatores associados a infecções por '*Candidatus M. haemominutum*': idade (animais mais velhos), sexo (machos), raça (mestiços), VG (reduzido). Não houve diferença significativa no número de animais anêmicos entre gatos positivos para *M. haemofelis* e animais negativos, entretanto, o número de casos positivos para *M. haemofelis* identificado neste estudo foi reduzido, impossibilitando qualquer análise estatística mais profunda.

Através de um protocolo de PCR convencional, Luria et al. (2004) testaram 484 gatos errantes na Flórida, EUA, para a presença de DNA de hemoplasmas. Quarenta animais (8,3%) de 484 eram positivos para *M. haemofelis* e 59/484 (12,2%) eram ‘*Candidatus M. haemominutum*’-positivos. Enquanto a presença de FIV foi considerada um fator de risco para ambas as infecções por hemoplasmas, a presença de FeLV se associou apenas com ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Neste estudo, gatos infectados com uma espécie de hemoplasma estavam em maior risco de estarem coinfectados com uma segunda espécie. Ademais, gatos machos apresentaram uma maior predisposição à infecção por hemoplasmas, assim como animais infectados com outros agentes patogênicos (*Toxoplasma gondii*, Coronavírus).

Uma vez que as pulgas são implicadas como uma das principais vias de transmissão horizontal dos hemoplasmas, um estudo relacionado à presença deste ectoparasito foi efetuado por Lappin et al. (2006). Os autores procuraram por infecções por hemoplasmas em 92 gatos infestados por pulgas, selecionados durante o exame clínico. Através de um protocolo de PCR convencional, foi achado que 20/92 gatos (21,7%) eram positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’, e 7/92 (7,6%) para *M. haemofelis*. Neste estudo, DNA de *M. haemofelis* foi detectado em apenas um gato e em suas respectivas pulgas (ambos estavam coinfectados com ‘*Candidatus M. haemominutum*’) e o DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi amplificado em apenas 15% das pulgas coletadas de animais positivos para esse hemoplasma. Desta forma, o papel de *Ctenocephalides felis* na transmissão dos hemoplasmas se manteve inconclusivo, não podendo ser indicado como um fator de risco para as infecções por hemoplasmas.

Um dos estudos epidemiológicos mais recentes foi realizado na Europa, por Willi et al. (2006b). Através da técnica de PCR em tempo real, 713 gatos foram testados para a presença de DNA de hemoplasmas felinos na Suíça. A maioria das amostras (627/713; 87,9%) foi coletada de animais doentes, e 86/713 (12,1%) a partir de animais sadios. Das 713 amostras, 98 (13,7%) apresentavam uma suspeita para infecção por hemoplasma, sendo denominadas amostras pré-selecionadas, e 615 foram provenientes de animais sem suspeita para infecções por hemoplasmas (não pré-selecionadas), independentemente de suas condições de saúde. Neste último grupo, 52/615 (8,5%) animais tiveram um resultado positivo para o DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ao mesmo tempo em que três de 615 (0,5%) foram *M. haemofelis* positivos. Seis animais deste grupo (1%) foram positivos para o novo hemoplasma, ‘*Candidatus M. turicensis*’, sendo que três destes gatos (50%) também apresentaram infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Ao incluírem as amostras pré-selecionadas na análise (n total=713), 71 (10%), 11 (1,5%) e 9 (1,3%) dos animais apresentaram um resultado positivo para *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ respectivamente. Dentre os animais ‘*Candidatus M. haemominutum*’-positivos, 2/71 (2,8%) estavam coinfectados com *M. haemofelis* e, entre os gatos em cujo sangue foi achado DNA de ‘*Candidatus M. turicensis*’, 6/9 (67%) também apresentaram DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Fatores associados à infecção por hemoplasmas incluíram idade mais avançada, sexo masculino, ter acesso ao ambiente externo, habitar nas regiões Oeste e Sul da Suíça (temperaturas médias mais elevadas e presença de artrópodes, prováveis vetores). Os mesmos fatores estavam associados à infecção apenas por ‘*Candidatus M. haemominutum*’, que também apresentou relação significativa com infecções por ‘*Candidatus M. turicensis*’. Gatos doentes e PCR-positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ tiveram as concentrações de uréia sérica, creatinina, proteínas totais e lipase mais elevadas, bem como maior presença de insuficiência renal do que os gatos também doentes, porém negativos para o DNA deste hemoplasma. Os únicos fatores associados à infecção por *M. haemofelis* foram o sexo masculino e a residência em áreas com temperaturas mais elevadas, bem como o fato de serem animais mestiços. ‘*Candidatus M. turicensis*’

apresentou apenas uma associação com infecções por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e a totalidade dos casos positivos em animais sem raça definida (SRD).

‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ foi posteriormente identificado na Austrália, África do Sul e Reino Unido, através de um estudo retrospectivo, onde foram analisadas amostras de outros trabalhos, que se encontravam congeladas (WILLI et al. 2006a). Incluindo todos os animais do estudo, 43/642 (6,7%) apresentaram o DNA deste novo hemoplasmas em suas amostras, sendo 10/426 (2,3%), 18/69 (26%) e 15/147 (10,2%) no Reino Unido, Austrália e África do Sul respectivamente. Ademais, a infecção por ‘*Candidatus M. turicensis*’ estava associada à presença de DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e/ou *M. haemofelis* bem como ao sexo do animais (macho).

Sykes et al. (2007a) identificaram recentemente a presença de ‘*Candidatus M. turicensis*’ nos EUA através do seqüenciamento do 16S rRNA de uma amostra suspeita. Neste trabalho, foram usados animais com (n=135) e sem (n=128) anemia, cujos sangues foram obtidos de junho/2002 até maio/2003 no hospital veterinário da Universidade de Davis, Califórnia. Uma ocorrência geral de 18% (n=47) foi encontrada para os hemoplasmas, sendo a grande maioria dos casos referentes à presença de DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Fatores associados com a infecção por este parasito incluíram acesso ao ambiente externo, infecção por FIV, presença de carcinoma de células escamosas, estomatite, idade mais avançada e, quanto mantidos na análise apenas gatos hemoplasma-positivos houve também uma associação com a infecção por FeLV. No Brasil, esse novo parasito foi descrito apenas em felinos selvagens mantidos em cativeiro (WILLI et al., 2007a).

‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ foi descrito pela primeira vez no continente asiático por Fujihara et al. (2007). Neste estudo, os autores identificaram a ocorrência de três espécies de hemoplasmas em 60 gatos domésticos apresentados a clínicas e hospitais veterinários de diversas partes do Japão entre 2004 e 2005. Tiveram resultados positivos para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ 6/60 (10%), 21/60 (35%) das amostras analisadas, respectivamente. Dois animais (3,4%) estavam coinfectados com *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, enquanto que apenas um animal (1,7%) apresentou DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ associado à infecção por ‘*Candidatus M. turicensis*’, assim como apenas um gato (1,7%) teve resultado duplo-positivo para ‘*Candidatus M. turicensis*’ e *M. haemofelis*. Quatro dos 60 animais testados (6,7%) apresentaram resultados triplamente positivos, para todos os hemoplasmas pesquisados. O estudo concluiu que existe uma forte associação da infecção por ‘*Candidatus M. turicensis*’ com uma segunda e até mesmo uma terceira infecção por outra(s) espécie(s) de hemoplasma(s) no mesmo animal.

Devido ao fato de vários parasitos poderem ser transmitidos por transfusão sanguínea, Wardrop et al. (2005) sugeriram novos procedimentos para o mapeamento de doenças infecciosas em doadores felinos e caninos. Baseando-se nessas recomendações e utilizando uma técnica de PCR convencional, Hackett et al. (2006) mapearam 146 gatos doadores de sangue para a presença de diversos agentes patogênicos, inclusive hemoplasmas. Entre esses gatos, 28 eram animais de laboratório, e 118 provenientes da comunidade. Não houve resultado positivo para a presença de DNA de hemoplasmas entre os animais do primeiro grupo. Catorze dos 118 gatos da comunidade (11,86%) apresentaram infecção por pelo menos um hemoplasma. Nove desses 118 animais (7,62%) eram positivos para ‘*Candidatus M. haemominutum*’, enquanto quatro (3,4%) eram positivos para *M. haemofelis*. Apenas um entre os 118 gatos (0,85%) estava duplamente infectado. Este trabalho também identificou que gatos infestados por pulga ou que tinham acesso ao ambiente externo estavam mais propícios a uma infecção por hemoplasma.

Uma síntese acerca de diversos estudos de prevalência/ocorrência de hemoplasmas em gatos domésticos realizados no mundo encontra-se no Quadro 3.

Quadro 3. Resumo de alguns estudos de prevalência/ocorrência de hemoplasmas em gatos domésticos realizados no mundo, relacionados os locais, coortes e número de animais utilizados, bem como os métodos de diagnóstico empregados.

Local	Coorte	n	MD*	Referência
EUA	Análise retrospectiva dos registros de Universidades do país	43514	AES [†]	(1)
Escócia	Atendimentos do Hospital Universitário (HU) local	155	AES [†]	(2)
EUA	Animais doentes e sadios atendidos no HU local	123	AES [†]	(3)
EUA	Animais suspeitos ou não, para infecções por hemoplasmas	220	PCR [†]	(4)
Reino Unido	Animais sadios e doentes	426	PCR [†]	(5)
Espanha	Amostras coletadas em clínicas	60	PCR/RFLP**	(6)
Japão	Seleção aleatória de animais atendidos no HU local	102	PCR [†]	(7)
EUA	Gatos errantes	484	PCR [†]	(8)
Canadá	Animais com anemia regenerativa, arregenerativa ou com hemograma sem alterações	60	PCR [†]	(9)
Austrália	Animais não-sadios (maioria)	147	RT-PCR [‡]	(10)
África do Sul	Animais doentes considerados positivos pela AES para a presença de hemoplasmas	78	RT-PCR	(11)
Suíça	Animais doentes e sadios	713	RT-PCR [‡]	(12)
EUA	Animais doadores de sangue	146	PCR [†]	(13)
Austrália, África do Sul e Reino Unido	Estudo retrospectivo realizado a partir de amostras congeladas de gatos doentes e sadios	642	RT-PCR [‡]	(14)
EUA	Animais com pulgas	92	PCR [†]	(15)
EUA	Animais anêmicos ou não, atendidos no HU local	263	RT-PCR [‡]	(16)
Japão	Animais atendidos em clínicas do país	60	PCR [†]	(17)

*Método de diagnóstico utilizado.

[†]Avaliação do esfregaço sangüíneo corado por técnica de Romanowsky.

[‡]Reação em cadeia da polimerase.

**PCR seguida de digestão por enzimas de restrição

[‡]PCR em tempo real.

Referências: 1- Hayes e Priester (1973); 2- Nash e Bobade (1986); 3- Grindem et al. (1990); 4- Jensen et al. (2001); 5- Tasker et al. (2003a); 6- Criado-Fornelio et al. (2003); 7- Inokuma et al. (2004); 8- Luria et al. (2004); 9- Kewish et al. (2004); 10- Tasker et al. (2004); 11- Lobetti e Tasker (2004); 12- Willi et al. (2006b); 13- Hackett et al. (2006); 14- Willi et al. (2006a); 15- Lappin et al. (2006); 16- Sykes et al. (2007a); 17- Fujihara et al. (2007).

Além disso, um resumo dos fatores associados às infecções por hemoplasmas está descrito no Quadro 4.

Quadro 4. Resumo dos fatores associados às infecções por hemoplasmas em gatos domésticos com base em diversos estudos realizados no mundo

Fator associado	Referência
Positividade para FeLV	(2); (3); (6); (7) e (14)
Positividade para FIV	(7) e (14)
Presença de pulgas	(2) e (12)
Anemia	(3); (4); (8) e (9)
Gatos doentes/suspeitos	(4); (5); (6) e (8)
Falta de vacinas	(3)
Histórico de abscessos por mordedura de gatos	(3)
Idade (elevada)	(3); (5); (9); (11) e (14)
Idade (reduzida)	(1)
Acesso ao ambiente externo	(3); (6); (11); (12) e (14)
Sexo (masculino)	(1); (5); (7); (9); (11) e (13)
Animais sem raça definida	(1); (9); (11)
Infecções por <i>Toxoplasma gondii</i> ou Coronavírus	(7)
Infecção por algum outro hemoplasma	(7); (11); (13) e (15)
Diagnóstico de insuficiência renal	(11)
Alterações na bioquímica sérica	(11)
Alterações no hemograma	(10) e (13)
Estomatite	(14)
Carcinoma de células escamosas	(14)

Referências: 1- Hayes e Priester (1973); 2- Nash e Bobade (1986); 3- Grindem et al. (1990); 4- Jensen et al. (2001); 5- Tasker et al. (2003a); 6- Inokuma et al. (2004); 7- Luria et al. (2004); 8- Kewish et al. (2004); 9- Tasker et al. (2004); 10- Lobetti e Tasker (2004); 11- Willi et al. (2006b); 12- Hackett et al. (2006); 13- Willi et al. (2006a); 14- Sykes et al. (2007a); 15- Fujihara et al. (2007)

2.4.1 Hemoplasmas em gatos domésticos no Brasil

Desde que Massard et al. (1978) identificaram o primeiro caso de infecção por *H. felis* no Brasil, pouco se pesquisou sobre este parasito no país, sendo poucos os estudos sobre a prevalência/freqüência de hemoplasmas felinos em gatos domésticos. Souza (2002), a partir de amostras coletadas de 56 animais durante uma campanha de vacinação anti-rábica no Município de Niterói, RJ, encontrou uma freqüência total de 50% para infecções por hemoplasmas (provavelmente *M. haemofelis*) através de análise por microscopia óptica. Usando a mesma metodologia de diagnóstico, uma freqüência de 38% foi encontrada em gatos errantes da área do zoológico da Cidade do Rio de Janeiro, RJ (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2004).

Em um estudo realizado na Região Sul do Brasil, Baumann et al. (2006) analisaram uma população de animais anêmicos através de PCR e infecções por hemoplasmas foram encontradas em 56,7% dos gatos testados, sendo que a ocorrência de *M. haemofelis* foi maior quando comparada com a de '*Candidatus M. haemominutum*' (37,8 e 10,8% respectivamente). Utilizando a mesma técnica de diagnóstico, infecções por mais de uma

espécie de hemoplasma ocorrendo de forma concomitante no mesmo animal também foram descritas em três gatos domésticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Paraná (MORAIS et al., 2007). Em nenhum dos dois estudos previamente citados houve análise de fatores associados à infecção por hemoplasmas felinos.

2.4.2 Hemoplasmas em felinos silvestres

Poucos são os relatos sobre a ocorrência de hemoplasmas em felinos silvestres. Haefner et al. (2003) detectaram a variante Ohio de *H. felis* – *M. haemofelis* – em dois tigres (*Panthera tigris*) mantidos em cativeiro nos EUA. No Brasil, um hemoplasma menos patogênico, ‘*Candidatus M. haemominutum*’, foi encontrado em um leão (*P. leo*) mantido em cativeiro no jardim zoológico de Curitiba, Paraná (GUIMARÃES et al., 2007).

Um trabalho mais detalhado acerca da ocorrência de *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ em animais silvestres foi realizado por Willi et al. (2007a) através da técnica de PCR em tempo real. Os autores analisaram 257 amostras de felinos silvestres mantidos em cativeiro em diversos países, bem como de uma população selvagem. No Brasil, apenas felídeos mantidos em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo foram analisados (n=110). Estes animais incluíam dois guepardos (*Acinonyx jubatus*), quatro leopardos (*P. pardus*), cinco leões (*P. leo*), 11 tigres siberianos (*P. tigris altaica*), dois leopardos da neve (*Uncia uncia*), sete gatos-do-mato grandes (*Oncifelis geoffroyi*), 23 jaguarundis (*Herpailurus yaguaroundi*), nove gatos-maracajá (*Leopardus wiedii*), seis jaguatiricas (*L. pardalis*), 33 gatos-do-mato pequenos (*L. tigrinus*), cinco gatos-dos-pampas (*O. colocolo*), e dois pumas (*Puma concolor*). Dentre todos esses animais, um gato-maracajá (1/110; 0,9%) apresentou resultado duplamente positivo para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’, enquanto uma jaguatirica (1/110; 0,9%) teve o DNA dos três hemoplasmas pesquisados encontrado em seu sangue. Nove dos 110 animais (8,2%) tiveram um resultado positivo apenas para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (um leão, um gato-do-mato grande, três jaguatiricas, três gatos-do-mato pequenos e um puma). Não houve infecções isoladas por *M. haemofelis* ou ‘*Candidatus M. turicensis*’. Neste estudo também foram amostrados 35 lince ibérico (*Lynx pardinus*) da Espanha, 36 lince da eurásia (*Ly. lynx*) da Suíça, 31 gatos selvagens europeus (*Felis silvestris silvestris*) da França, e 45 leões (*P. leo*) provenientes da Tanzânia. Considerando todos os animais usados no estudo, inclusive aqueles com infecções múltiplas, (n=257), ocorrências de 18% (45/257), 32% (83/257) e 20% (51/257) foram encontradas para *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’, respectivamente. O trabalho também mostrou o elevado número de casos de infecções por hemoplasmas em animais silvestres (n=129), onde 43 animais (33%) foram positivos para *M. haemofelis*, enquanto 70 (54%) e 49 (39%) obtiveram um resultado PCR-positivo para, respectivamente, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’.

2.4.3 Transmissão

O modo de transmissão dos hemoplasmas felinos permanece nebuloso. Experimentalmente, os hemoplasmas felinos podem ser transmitidos por inoculação intraperitoneal, parenteral e até mesmo por ingestão de sangue contaminado (FLINT; MOSS, 1953; FLINT et al., 1959; HARVEY; GASKIN, 1977).

A disseminação da infecção por meio de artrópodes hematófagos, como pulgas, é considerada por muitos autores como sendo o modo primário de transmissão do parasito (HARVEY, 2006). Em um estudo recente, Shaw et al. (2004) descobriram DNA de hemoplasmas em 40% das pulgas coletadas de cães e gatos no Reino Unido. Este número se

elevou para 49% quando abrangeu apenas a população de pulgas encontradas nos gatos domésticos. Ademais, várias amostras obtidas a partir de indivíduos ou de um pool de pulgas revelaram a presença de DNA de mais de um patógeno, incluindo *Bartonella henselae*, *Rickettsia felis* e hemoplasmas. A participação de *Ct. felis* na transmissão de hemoplasmas ainda não foi totalmente elucidada e, de acordo com Lappin et al. (2006), carece de informações, sendo alvo de diversos estudos. A transmissão dos hemoplasmas por meio da pulga *Ct. felis* foi testada experimentalmente por Woods et al. (2005), sugerindo que a transferência hematófaga de '*Candidatus M. haemominutum*' e *M. haemofelis* do animal para o inseto é viável, corroborando inclusive estudo anterior realizado por Lappin et al. (2003), entretanto o caminho inverso não pôde ser comprovado. Subseqüentemente, Woods et al. (2006) sugeriram que a ingestão de *Ct. felis* infectadas por hemoplasmas não se consiste em um importante meio de transmissão desses parasitos para gatos.

Carrapatos são outros artrópodes suspeitos de transmitirem os hemoplasmas felinos. DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' foi encontrado em carrapatos *Ixodes ovatus* coletados da vegetação, o que além de sugerir a participação do carrapato como vetor, levanta a possibilidade de haver transmissão transtadial do parasito (TAROURA et al., 2005). Willi et al. (2007b) também encontraram DNA de hemoplasmas em diferentes espécies de artrópodes. Enquanto o DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' foi encontrado em carrapatos do gênero *Ixodes* e em pulgas *Ct. felis*, o DNA de '*Candidatus M. turicensis*' foi achado em carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*.

Outros estudos apontam para a importância da transmissão direta no ciclo de vida dos hemoplasmas. Dean et al. (2005) encontraram DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' na saliva e em glândulas salivares de gatos domésticos experimentalmente infectados. Abscessos por mordedura parecem ser a alteração mais freqüente reconhecida como precedente da hemoplasmose felina. Apesar dos abscessos serem indubitavelmente estressantes e com isso poderem ser um fator de ativação de uma infecção latente, a possibilidade da transmissão direta do agente através da mordedura deve ser considerada (HARVEY, 2006). Esses resultados estão de acordo com um estudo mais recente, que ao monitorar dois gatos domésticos experimentalmente infectados com '*Candidatus M. turicensis*' pôde detectar o DNA do referido hemoplasma na saliva e fezes dos animais até nove semanas após a infecção (WILLI et al. 2007b). Esse mesmo estudo sugere, entretanto, que interações agressivas seriam necessárias para a transmissão direta dos hemoplasmas, devido à pequena quantidade de DNA encontrado.

Mycoplasma haemofelis também pode ser transmitido de fêmeas com doença clínica para sua prole na ausência de um vetor artrópode. Entretanto, é desconhecido se a transmissão ocorreria *in utero*, durante o parto, ou ainda durante os cuidados da mãe com a sua cria nos momentos seguintes (HARBUTT, 1963; HARVEY; GASKIN, 1977; HARVEY, 2006). A transmissão iatrogênica dos hemoplasmas pode ocorrer também por transfusão de sangue (WILLI et al., 2006b; GARY et al., 2006). Assim, gatos utilizados como doadores de sangue devem ser investigados para a presença de infecções por hemoplasmas, uma vez que os parasitos conseguem sobreviver até por uma hora (*M. haemofelis*) e uma semana ('*Candidatus M. haemominutum*') em sangue estocado sob refrigeração (GARY et al., 2006).

Hemoplasmas de felídeos selvagens mostraram mais de 97% de identidade na seqüência do gene 16S rRNA quando comparada com isolados da mesma espécie de hemoplasma derivada de gatos domésticos (WILLI et al., 2007a). Este fato pode indicar a possibilidade de transmissão entre felídeos selvagens e domésticos através de artrópodes vetores (WILLI et al., 2007c).

2.5 Diagnóstico

2.5.1 Isolamento

A impossibilidade em cultivar esses agentes fora de seus hospedeiros naturais tem limitado a investigação acerca dos hemoplasmas, sendo que a manutenção e propagação dos organismos é realizada *in vivo* através de múltiplas passagens nos hospedeiros (FOLEY; PEDERSEN, 2001; WILLI et al., 2007c). Tentativas de se isolar os hemoplasmas felinos em laboratório não tiveram sucesso, incluindo aqueles que usaram meios específicos para *Mycoplasma* spp. e ágar-sangue fresco de gato (FOLEY; PEDERSEN, 2001).

2.5.2 Sorologia

Anticorpos se tornaram detectáveis por imunofluorescência indireta 21 dias após a infecção experimental, e persistiram por 6 meses, mesmo sem doença clínica (FOLEY et al., 1998). A detecção de anticorpos contra *M. haemofelis* entre 14 e 60 dias após a infecção experimental indica ser possível diagnosticar infecções naturais, tanto na fase aguda (quando alterações clínicas são frequentemente observadas) quanto nas fases de recuperação e de portador, sendo possível, desta forma, o desenvolvimento de um ensaio sorológico baseado em um ou mais dos antígenos específicos identificados no estudo para a detecção direta de gatos infectados por esse hemoplasma (ALLEMAN et al., 1999).

Entretanto, a inabilidade de se cultivar esses microrganismos *in vitro* inviabiliza a produção de reagentes em uma escala comercial, sendo então uma técnica inviável até o momento (FOLEY; PEDERSEN, 2001; HARVEY, 2006; WILLI et al., 2007c)

2.5.3 Avaliação do esfregaço sangüíneo

O método mais comum para a identificação de *M. haemofelis* é a visualização do parasito no esfregaço sangüíneo corado por alguma técnica de Romanowsky, sendo os organismos e tipicamente achados em torno da periferia dos eritrócitos, podendo estar isolados, em pares ou em cadeias. Ocasionalmente podem estar livres dos eritrócitos, por terem se soltado dos mesmos (TASKER; LAPPIN, 2002).

Um exame cuidadoso do esfregaço sangüíneo corado por alguma técnica de Romanowsky é necessário, uma vez que os organismos são frequentemente confundidos com corpúsculos de Howell-Jolly, de Heinz, precipitados de corante, inclusões siderocíticas e até mesmo outros hemoparasitos, como *Cytauxzoon* spp. Ademais, artefatos causados por secagem e/ou fixação imprópria(s) também podem gerar confundimento no processo de identificação dos hemoplasmas (BUTT, 1990; SYKES, 2003; HARVEY, 2006). Para que precipitados (geralmente achados sobre o plano focal do eritrócito, sendo mais densamente corado e maior que o parasito) sejam evitados, os corantes devem ser frescos e filtrados. Artefatos refratários ocorrem quando a umidade adere às células na lâmina e essas tendem a apresentarem bordas irregulares, além de aparecerem descoradas quando o eritrócito estiver em foco (BUTT, 1990; TASKER; LAPPIN, 2002). Devido à natureza cíclica das parasitemias, a ausência do organismo *M. haemofelis* em esfregaços sangüíneos não exclui um diagnóstico de infecção por hemoplasma (HARVEY; GASKIN, 1977; ALLEMAN et al., 1999; HARVEY, 2006). Isto contribui para a baixa sensibilidade do método de avaliação do esfregaço sangüíneo, que foi calculada como menor que 50%, quando comparada aos resultados obtidos através de PCR (WESTFALL et al., 2001). A crenação excessiva das hemácias de felinos pode acontecer se os esfregaços forem preparados com sangue passado algum tempo da coleta, ou ainda se a secagem ocorrer de forma muito lenta. Essa crenação

pode obscurecer a presença de parasitos e geralmente indicam um esfregaço inadequável à busca destes parasitos (BUTT, 1990).

Desta forma, o diagnóstico citológico é conhecido por estar associado tanto a resultados falso-positivos quanto falso-negativos (TASKER; LAPPIN, 2006). Os esfregaços sangüíneos devem ser examinados antes do início da terapia, pois os organismos não são detectáveis enquanto os gatos estiverem em tratamento com antibióticos derivados da tetraciclina (HARVEY, 2006). Uma medida que poderia minimizar o aparecimento de resultados falso-negativos seria a preparação de múltiplos esfregaços com sangue fresco durante um período de 24 horas, ou mesmo durante alguns dias (TASKER; LAPPIN, 2002)

De maneira ideal, os esfregaços sangüíneos devem ser feitos imediatamente após a coleta do material, pois os organismos podem se soltar dos eritrócitos durante o contato com o EDTA; desta forma, alguns autores recomendam a confecção de esfregaços de sangue fresco ou coletar as amostras em tubos com heparina (ALLEMAN et al., 1999). Todavia, a baixa concentração de EDTA nos tubos de coleta não deveria afetar a adesão do organismo (TASKER; LAPPIN, 2002, 2006).

Outros métodos para a preparação, coloração e exame de esfregaços para facilitar uma identificação precisa dos hemoplasmas foram descritos (BUTT, 1990; TASKER; LAPPIN, 2002). Métodos de coloração utilizando laranja de acridina, que se liga aos ácidos nucléicos e pode ser visualizada com um microscópio para fluorescência, mostrou um aumento de sensibilidade na detecção do parasito (SMALL; RISTIC, 1967; TURNER et al., 1986; BOBADE; NASH, 1987). Todavia, corpúsculos de Howell-Jolly também são corados por laranja de acridina e precisam ser diferenciados dos hemoplasmas (HARVEY; GASKIN, 1977). É importante salientar que, em um estudo mais recente, não foi identificada uma maior sensibilidade desta técnica quando comparada a avaliação convencional de esfregaços sangüíneos (BERENT et al., 1998). Preparados de novo azul-de-metileno e colorações para reticulócitos não devem ser usadas, pois precipitados de material ribossomal em eritrócitos não podem ser efetivamente diferenciados dos hemoplasmas felinos (HARVEY, 2006).

Uma anemia regenerativa com um teste de Coombs' positivo, a presença de autoaglutinação em amostras de sangue refrigeradas ou eritrofagocitose pelos monócitos sangüíneos sugerem uma infecção por hemoplasma. Entretanto, outras doenças como anemia hemolítica auto-insone primária ou induzida por FeLV, por exemplo, devem ser consideradas (HARVEY, 2006). Flutuações no volume globular também costumam estar relacionadas aos ciclos de parasitemia por *M. haemofelis* (HARVEY; GASKIN, 1978).

'*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' são raramente visualizados no sangue, e, quando presentes, são de difícil identificação, visto seu tamanho bem reduzido e similaridade com artefatos, logo, a diferenciação molecular é o único método confiável para a diferenciação das espécies de hemoplasmas (MESSICK et al., 1998; GEORGE et al. 1998; INOKUMA et al., 2004; TASKER; LAPPIN, 2006). O mesmo ocorre com '*Candidatus M. turicensis*' e '*Candidatus M. haematoparvum*', que até a presente data só foram identificados através de técnicas moleculares (WILLI et al., 2005; WILLI et al., 2006a; WILLI et al., 2006b; SYKES et al., 2007a; WILLI et al., 2007c).

Desta forma, devido à sensibilidade reduzida dos testes de diagnóstico para a detecção de hemoplasmas, poucos estudos epidemiológicos acurados da infecção por hemoplasmas felinos foram reportados antes do ano 2000 (SYKES, 2003).

2.5.4 Uso de técnicas moleculares para a identificação e classificação de microrganismos

Uma vez que alguns segmentos do RNA ribossomal são conservados, enquanto que outros são variáveis em diferentes graus, é possível sintetizar oligonucleotídeos que sejam complementares aos segmentos que podem ser específicos para qualquer nível na árvore filogenética, do Reino a Espécie (GUTELL et al., 1985; GÖBEL et al., 1987; GIOVANNONI et al., 1988; GÖBEL, 1991; ROSSAU, 1991). Assim, técnicas moleculares permitem que os pesquisadores detectem um pequeno número de bactérias quando se usam sondas ou oligonucleotídeos direcionados às seqüências do rRNA específicas (WILSON et al., 1990). Ademais, sondas complementares ao rRNA podem ser ferramentas universais para a identificação de bactérias, fungos e protozoários, podendo ser aplicados no diagnóstico e epidemiologia das doenças infecciosas assim como na microbiologia industrial e ambiental (GÖBEL, 1991). Começando a partir de seqüências dos genes do rRNA obtidos previamente, estas sondas ou oligonucleotídeos com seqüências complementares às regiões variáveis ou semiconservadas podem ser sintetizadas quimicamente (ROSSAU, 1991).

A análise do gene 16S rRNA pode permitir que pesquisadores separem o rRNA de bactérias a partir de seqüências de organismos superiores em amostras compostas, sendo de grande utilidade diagnóstica e epidemiológica (WILSON, 1990; ROSSAU, 1991). Não seria necessário o cultivo dos organismos para marcá-los ou até seqüenciá-los quando o método de amplificar uma região do 16S rRNA for usado. Este importante atributo do método tornou possível a detecção de bactérias não cultiváveis levando inclusive a descoberta de novos patógenos (WILSON et al., 1990).

A revolução na ecologia dos microrganismos e a interferência das estruturas moleculares causam conseqüências práticas diretas. Os dados referentes aos estudos filogenéticos envolvendo o rRNA, principalmente o gene 16S rRNA, trouxeram uma nova perspectiva para a clínica médica. Muitos organismos clinicamente importantes são atualmente submetidos às análises filogenéticas moleculares. Esses dados e análises vêm sendo utilizados para o desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico, e para guiar as pesquisas na natureza (e controle) de vários patógenos (OLSEN et al., 1994).

Vários métodos foram desenvolvidos para se amplificar uma seqüência-alvo. A aplicação da técnica de PCR tornou possível a amplificação *in vitro* de um determinado DNA alvo. Assim, ciclos repetidos de replicação *in vitro* são realizados com o auxílio de uma enzima DNA-polimerase e um par de seqüências iniciadoras ou ‘primers’ alvejando o gene ou fragmento de DNA a ser amplificado, se tornando um marco na história da ciência (MULLIS et al., 1986). Nos anos seguintes, o mesmo grupo de pesquisadores aperfeiçoou a técnica de PCR com a introdução de uma enzima DNA-polimerase termoestável, sendo este passo talvez tão revolucionário quanto o próprio desenvolvimento da PCR (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988).

O uso de sondas específicas é a abordagem mais utilizada. Essas sondas são compostas por um fragmento de DNA clonado ou por um oligonucleotídeo sintético. Uma ‘sonda A’ irá identificar a bactéria ‘A’, mesmo em um ambiente com vários microrganismos. As sondas podem ser direcionadas para várias regiões, que variam de fatores de virulência até grupos taxonômicos. O método mais direcionado, é, então, identificar no gene 16S rRNA ou 23S rRNA uma seqüência curta, que é a específica para o *Taxon* desejado, que pode estar em qualquer nível na árvore filogenética. O uso de uma sonda universal e posterior digestão por enzimas de restrição para se verificar o padrão formado também constitui uma importante ferramenta neste tipo de análise (GRIMONT; GRIMONT, 1991).

2.5.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção dos hemoplasmas felinos

A PCR, assim como outras ferramentas moleculares para a detecção de microrganismos, uma vez consideradas apenas como instrumentos de pesquisa, vem sendo utilizada na rotina laboratorial de diagnóstico desde meados da década de 1990 (FREDRICKS; RELMAN, 1999). O advento da técnica de PCR aumentou substancialmente a capacidade de se detectar a presença de hemoplasmas felinos no sangue (SYKES, 2003), possibilitando estudos mais profundos a respeito da epidemiologia dos hemoplasmas (MESSICK et al., 1998).

A PCR é uma técnica molecular extremamente sensível que permite a amplificação *in vitro* de um fragmento determinado de DNA de um organismo, sendo a subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) a base para todos os ensaios de PCR desenvolvidos até o presente para a detecção dos hemoplasmas, com diversos protocolos já descritos (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998; MESSICK et al., 1998; FOLEY; PEDERSEN, 2001; JENSEN et al., 2001; MESSICK, 2003; TASKER et al., 2003a; TASKER et al., 2003b; WILLI et al., 2005; WILLI et al., 2006b; PETERS et al., 2008).

Por detectar frações mínimas do ácido nucléico dos hemoplasmas, a PCR é mais sensível do que a avaliação do esfregaço sangüíneo para a detecção de hemoplasmas em animais (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001; JENSEN et al., 2001; TASKER et al., 2003a; TASKER et al., 2003b). Desta forma, a PCR e suas variações e avanços são considerados os métodos de escolha para o diagnóstico de infecções por hemoplasmas felinos (TASKER; LAPPIN, 2006).

Em estudos experimentais, a PCR se torna positiva bem antes do aparecimento de sinais clínicos e da soroconversão em animais experimentalmente infectados (FOLEY et al., 1998). Ademais, a PCR é capaz de detectar o parasito em animais assintomáticos durante vários meses, o que indica uma habilidade da técnica em diagnosticar animais cronicamente infectados (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998). Entretanto, a PCR pode falhar na detecção de animais com uma carga de DNA bacteriano abaixo de seus limiares de detecção (WESTFALL et al., 2001; FOLEY et al., 1998; BERENT et al., 1998; MESSICK et al., 1998; JENSEN et al., 2001).

Devido à falta de padronização dos ensaios de PCR entre laboratórios, juntamente com controles de qualidade variáveis, os resultados de PCR para hemoplasmas felinos devem ser sempre interpretados com cautela e sob a luz dos achados clínicos (SYKES, 2003). Ademais, as amostras devem ser enviadas ao laboratório para análise antes de iniciada a antibioticoterapia, que poderá causar um resultado negativo (BERENT et al., 1998; SYKES, 2003; HARVEY, 2006). Seqüestros de eritrócitos parasitados da corrente sangüínea para o baço e pulmões já foram descritos por Simpson et al. (1978), que relataram a presença de eritrócitos parasitados dentro de vacúolos fagocíticos em macrófagos nesses órgãos. Assim, de acordo com Braddock et al. (2004) este fator pode ser responsável por resultados negativos na PCR quando utilizado o sangue periférico como sítio de coleta, sendo então necessária uma coleta feita diretamente a partir desses órgãos específicos, a fim de se avaliar a possibilidade do parasito ter sido eliminado do animal em questão.

No caso de infecções por '*Candidatus M. haemominutum*', uma identificação precisa da espécie precisa ser efetuada, uma vez que os resultados da PCR nem sempre se relacionam com os achados clínicos. Por outro lado, apesar de alguns gatos assintomáticos testarem positivamente para *M. haemofelis*, em gatos naturalmente infectados existe uma forte correlação entre a positividade de PCR para *M. haemofelis* e anemia (SYKES, 2003).

É importante salientar que um resultado PCR-positivo não significa doença clínica, fato que torna sua interpretação problemática. Tal resultado deve ser interpretado alinhado com a espécie identificada, achados hematológicos e sinais clínicos reportados (TASKER;

LAPPIN, 2002). A técnica de PCR convencional ainda pode ter a sua sensibilidade aumentada para a detecção de hemoplasmas se combinada com Southern Blot (SB) e hibridização de DNA (GUIMARÃES et al., 2007). Outra alternativa para se elevar a sensibilidade é a utilização da técnica de nested-PCR, onde há duas etapas de amplificação (FUJIHARA et al., 2007).

2.5.6 PCR em tempo real

Recentemente, uma nova técnica foi descrita: a PCR em tempo real (TASKER et al. 2003b). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação à PCR convencional. É altamente específica, devido ao uso de um terceiro nucleotídeo (uma sonda marcada com reagente fluorescente), além de ser extremamente rápida quando comparada à técnica previamente citada. Espera-se que essa técnica possa ajudar o Veterinário a determinar a importância desse resultado positivo, que pode ser problemático em infecções com hemoplasmas, uma vez que as mesmas nem sempre resultam em doença no hospedeiro. Isto pode ser promovido através da quantificação do DNA do hemoplasma em questão no sangue, que além de facilitar o entendimento do processo infecção-doença, pode ser útil na avaliação da resposta perante o tratamento com antibióticos (TASKER et al., 2003b; BRADOCK et al., 2004; WILLI et al. 2007c). O fato de esses ensaios serem realizados em sistemas de tubos fechados do início ao fim, reduz o risco de contaminação e resultados falso-positivos, se constitui em uma vantagem adicional (WILLI et al. 2007c).

Sykes et al., (2007b) encontraram uma sensibilidade similar entre as técnicas de PCR convencionais e em tempo real, sendo a segunda mais vantajosa pela quantificação do DNA e velocidade na obtenção dos resultados. A comparação foi realizada mediante infecção experimental de gatos domésticos. Entretanto, a PCR convencional não foi útil na detecção de infecções múltiplas em amostras de sangue coletadas a partir de gatos infectados com dois organismos (*M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*'), provavelmente como resultado de inibição competitiva no ensaio, uma vez que os autores utilizaram o protocolo convencional descrito por Jensen et al., (2001), que detecta ambos os hemoplasmas em apenas uma reação e utilizando um par de iniciadores, sendo as espécies diferenciadas por seu peso molecular. Ademais, de acordo com Willi et al., (2005) não é possível diferenciar *M. haemofelis* de '*Candidatus M. turicensis*' sem o seqüenciamento do produto da PCR convencional. O mesmo ocorre para a diferenciação entre '*Candidatus M. haemominutum*' e '*Candidatus M. haematoparvum*' (SYKES et al., 2007a; SYKES et al., 2007b).

Desta forma, o uso de múltiplos protocolos de PCR em tempo real deve então ser considerado para estudos de epidemiologia das infecções por hemoplasmas felinos (SYKES et al., 2007b). Outra alternativa é o desenvolvimento de técnicas mais precisas; ensaios capazes de detectarem níveis reduzidos da seqüência do hemoplasma-alvo na presença de altos níveis de DNA de outras espécies. Isto foi alcançado com o desenvolvimento de um novo ensaio para a detecção desses microrganismos, que utilizou seqüências iniciadoras e sondas espécie-específicas ao invés de iniciadores universais e sondas específicas utilizados até então nas técnicas de PCR em tempo real (PETERS et al., 2008)

2.6 Retrovírus Felinos (FIV e FeLV)

As infecções por FIV e FeLV são responsáveis por duas das doenças infecciosas mais prevalentes em gatos domésticos e esporadicamente em alguns gatos não domésticos (SHELTON et al., 1989; O'CONNOR et al., 1991; CRAWFORD; LEVY, 2007). Estas infecções ocorrem em todo o mundo, com a prevalência variando de acordo com o local,

sendo freqüentemente fatais (COURCHAMP; PONTIER, 1994; HARTMANN, 1998; HARTMANN et al., 2001; HARTMANN, 2006; LEVY, 2000).

Apesar dos vírus induzirem manifestações que são clinicamente indiferenciáveis e fazerem parte da família Retroviridae (HARTMANN et al., 2001), as propriedades físicas das partículas virais são bem distintas (PEDERSEN et al., 1989). FeLV foi inicialmente descrito por Jarrett et al. (1964), enquanto o FIV identificado e isolado por Pedersen et al. (1987). A classificação taxonômica vigente dos retrovírus felinos previamente citados está apresentada no Quadro 5.

Quadro 5. Classificação taxonômica vigente dos vírus das imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas*

Nível taxonômico		
Família	Retroviridae	Retroviridae
Subfamília	Orthoretrovirinae	Orthoretrovirinae
Gênero	Lentivirus	Gammaretrovirus
Espécie	FIV	FeLV

*Taxonomy browser: National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>. Chave de busca: Retroviridae

Infecções por FIV e FeLV resultam em diversas seqüelas, como infecções oportunistas, tumores, anormalidades hematológicas, e, principalmente, a imunossupressão, sendo que os sinais clínicos variam de acordo com a doença relacionada (HARTMANN et al., 2007). Ademais, devido a esta última propriedade citada, a utilização dos mesmos como modelos para o estudo da imunodeficiência humana já foi apontada por diversos autores (HARDY; ESSEX, 1986; GARDNER; LUCIW, 1989; BENDINELLI e tal., 1995).

2.6.1 Associação entre infecções por retrovírus (FIV e/ou FeLV) e hemoplasmas felinos

Diversos autores sugeriram que os hemoplasmas felinos poderiam reduzir a resistência dos gatos a infecções concomitantes ou secundárias (SEAMER; DOUGLAS, 1959; MANUSU, 1962; MacWILLIAMS, 1987).

Esse fenômeno foi documentado em outras espécies de hospedeiros infectados com hemoplasmas, particularmente animais de laboratório, nos quais uma infecção latente estaria entre as maiores complicações na pesquisa biomédica moderna, pois a presença do parasito confundiria estudos com outros patógenos, bem como ensaios experimentais para aferições diversas (BAKER et al., 1971; KEMMING et al., 2004a; KEMMING et al., 2004b). Ademais, diversos autores já apontaram, por exemplo, que a infecção por uma espécie de hemoplasma estaria associada com a presença de uma segunda e até de uma terceira espécie desse parasito (LURIA et al., 2004; WILLI et al., 2006a; WILLI et al., 2006b; FUJIHARA et al., 2007).

Hemoplasmas podem ser agentes oportunistas que existem comumente em gatos saudáveis e que produzem doença quando o animal é estressado por outra desordem ou mesmo procedimentos cirúrgicos, apesar de, alguns gatos com hemoplasmas não apresentam doenças ou condições de estresse preexistentes (HARVEY, 2006). Associações entre doenças com infecções latentes por *Mycoplasma* spp., tanto em pacientes saudáveis quanto em imunodeprimidos, estão se tornando emergentes. Assim, os hemoplasmas também poderiam agir como cofatores no progresso de doenças retrovirais e debilitantes (MESSICK, 2004).

Mycoplasma haemofelis pode causar doença primária em gatos, sendo reconhecido como o causador da anemia infecciosa felina (BERENT et al., 2000). Este parasito também é reconhecido como um patógeno em conjunto com retrovírus felinos (FIV e FeLV) e outras doenças debilitantes (KOCIBA et al., 1983; BOBADE et al., 1988; GRINDEM et al., 1990; LAPPIN, 1995; GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002). Já foi sugerido que gatos apresentando uma doença retroviral preexistente poderiam estar em maior risco de se tornarem infectados por hemoplasmas felinos (NASH; BOBADE, 1986; GRINDEM et al., 1990; LAPPIN, 1995; GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002; INOKUMA et al., 2004; LURIA et al., 2004). Gatos experimentalmente infectados com retrovírus e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ desenvolveram uma anemia mais acentuada do que gatos infectados apenas com o parasito (GEORGE et al., 2002). Alguns estudos também indicam que *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ podem agir como cofatores, acelerando a progressão de doenças relacionadas com os retrovírus. Desta forma gatos coinfectados com hemoplasmas e retrovírus podem estar em maior risco para o desenvolvimento de linfoma, leucemia e síndrome da imunodeficiência (PRIESTER; HAYES, 1973; COTTER et al., 1975; BOBADE et al., 1988; GEORGE et al., 2002; HARRUS et al., 2002).

Existem possibilidades para uma seqüência temporal de infecções por hemoplasmas e FeLV. Os gatos podem ser infectados por ambos os agentes ao mesmo tempo, ou então serem infectados por um agente sendo posteriormente acometidos pelo segundo patógeno (GEORGE et al., 2002).

George et al. (2002) avaliaram o cenário onde a infecção por FeLV precede o hemoplasma, revelando um efeito sinérgico de uma infecção prévia por este retrovírus em uma posterior infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em uma situação experimental. Esta seqüência de infecção corrobora MacWilliams (1987), que assume que o hemoplasma não seria apenas um patógeno primário, mas que também pode aparecer de forma oportunista a outras doenças infecciosas e problemas médicos, assim, uma infecção por FeLV precederia e, em conseqüência, predisporia a uma doença induzida por hemoplasma.

Coinfecções com FeLV são achados comuns em gatos com hemoplasmas (NASH; BOBADE, 1986; Grindem et al., 1990; HAGIWARA et al., 1997; INOKUMA et al., 2004; LURIA et al., 2004; SYKES et al., 2007a). Assim, a infecção com este retrovírus é em muitas vezes considerada como um fator de risco para a presença do hemoplasma (GRINDEM et al., 1990). Desta forma, o mecanismo de susceptibilidade aumentada a uma infecção por FeLV poderia envolver uma imunossupressão mediada pelo hemoplasma, hiperplasia eritróide ou ainda um aumento da atividade de fagócitos mononucleares de forma secundária à anemia hemolítica (KOCIBA et al., 1983). Weiser e Kociba (1983) sugeriram a possibilidade de um evento hemolítico, como o causado por infecções por hemoplasmas, durante a infecção viral potencializaria a ocorrência e o grau de macrocitose. No mesmo trabalho os autores apontaram que hemoplasmas seriam achados freqüentes em animais infectados com FeLV. Ademais, o efeito imunossupressivo de FeLV poderia contribuir para a infecção por hemoplasma, e o vírus ainda ajudaria na indução dos sinais clínicos (HARRUS et al., 2002).

Gatos coinfectados com hemoplasma e FeLV apresentam uma doença mais grave em relação aos animais apenas hemoplasma-positivos. Temperaturas mais baixas, provavelmente em decorrência de uma perfusão sangüínea comprometida, resultando em acidose e colapso circulatório, bem como VG, hematimetria e hemoglobinometria reduzidos em contrapartida a uma macrocitose foram observadas (HARRUS et al., 2002). Essas condições, principalmente a redução na temperatura corporal, ocorreriam em estádios avançados da doença, quando os animais estariam moribundos (HARVEY, 2006). Entretanto, Bobade et al. (1988) encontraram altas temperaturas em gatos positivos para hemoplasmas e FeLV, o que pode refletir o estágio da doença no qual o animal foi examinado.

Esses resultados confirmam o estudo de Harrus et al. (2002), que também encontraram um VGM mais elevado em animais duplamente infectados, sugerindo uma associação desses achados com um aumento da regeneração dos eritrócitos nestes animais. Essas alterações podem ser explicadas pelo fato de que a extensão da hemólise, e conseqüente resposta da medula óssea, é maior em casos onde ocorre este tipo de coinfeção (BOBADE et al., 1988). Desta forma, foi sugerido que gatos coinfectados com FeLV e hemoplasmas sofrem de uma doença mais grave do que animais infectados apenas pelo hemoplasma, entretanto, essa coinfeção não afetou significativamente a expectativa de vida do animal em um curto prazo (HARRUS et al., 2002). Este fato foi confirmado por George et al. (2002) que mostraram que infecções preexistentes com FeLV e FIV/FeLV em gatos aparentemente saudáveis potencializaram a gravidade da anemia produzida pela infecção apenas por '*Candidatus M. haemominutum*', um hemoplasma conhecido por causar alterações clínico-patológicas mínimas quando encontrado isoladamente.

Em um estudo experimental, enquanto gatos infectados isoladamente com hemoplasmas apresentaram apenas uma anemia, gatos FeLV-positivos não mostraram nenhuma alteração. Entretanto, quando analisados gatos infectados primariamente com *H. felis* e posteriormente com FeLV, houve um aumento acentuado na susceptibilidade dos animais em apresentarem viremia e anemia aplásica (KOCIBA et al., 1983). Infecções concomitantes com FeLV e hemoplasma atuam de forma sinérgica, levando na maioria dos casos, a uma anemia mais acentuada do que a produzida pelos agentes de forma isolada. Esta anemia é predominantemente macrocítica e hipocrômica, enquanto em gatos apenas com FeLV é basicamente normocítica e normocrômica. Esta diferença não pode ser atribuída apenas à infecção por FeLV, mas provavelmente a um efeito sinérgico entre as duas infecções concomitantes (BOBADE et al., 1988). Segundo Shelton e Linenberger (1995), a maioria dos gatos FeLV positivos que apresenta hemólise está coinfectada com hemoplasma ou apresenta anemia hemolítica imunomediada. Esses achados indicam que uma infecção pelo parasito aumentaria a susceptibilidade dos gatos a uma infecção por FeLV bem como a virulência deste segundo agente, sendo essa predisposição provavelmente importante na patogênese e infecções progressivas por FeLV em gatos adultos (KOCIBA et al., 1983). Em contraste, uma infecção por FeLV também é capaz de suprimir a resposta imunológica normal a antígenos não relacionados, assim, essa infecção viral poderia aumentar a susceptibilidade dos gatos à hemobartonelose, ou ainda converter uma infecção latente em ativa, com aparecimento de doença clínica (HARVEY, 2006).

Uma forte associação entre infecções por hemoplasmas e FeLV também foi identificada por VanSteenhouse et al. (1993). Oito, dos 26 animais positivos para o parasito (31%) apresentaram infecção associada com o retrovírus em questão. Uma vez que nem todos os animais do estudo foram testados para a presença do vírus, essa ocorrência se elevou para 44,4% (8/18) quando analisados apenas os gatos hemoplasma-positivos testados.

Ao se analisarem animais naturalmente infectados por hemoplasmas em Israel, foi encontrado que 38% desses animais cujos dados estavam disponíveis (13/34) apresentaram coinfeção com FeLV. Ademais, 22% dos animais positivos para o parasito (8/37) obtiveram o mesmo resultado para infecção concomitante por FIV (HARRUS et al., 2002). Esta frequência foi muito maior do que a encontrada na população de gatos de Israel (BANETH et al., 1999). Assim, foi sugerido que essa diferença seria atribuída à coinfeção com *H. felis* (HARRUS et al., 2002). Essa associação ainda é reforçada por Cotter et al., (1975), que, dentre 13 gatos diagnosticados como positivos para hemoplasmas, seis (46,2%) apresentaram o mesmo resultado para infecção por FeLV.

Os achados previamente citados estão de acordo com Lappin et al. (1995), que apontam a presença de hemoplasmas como uma infecção associada à presença de um resultado positivo para o vírus da leucemia felina.

O trabalho experimental de Kociba et al. (1983) citado anteriormente não avaliou a relação entre infecções por hemoplasmas e indução de neoplasias em gatos infectados por retrovírus. Entretanto, Messick (2003) sugeriu que infecções crônicas por *M. haemofelis* também poderiam promover transformações neoplásicas em gatos FeLV-positivos. Essas infecções crônicas ou secundárias por hemoplasmas, assim como deficiências nutricionais poderiam ser importantes cofatores no desenvolvimento de anormalidades no sangue e na medula óssea de pacientes FeLV-positivos, podendo até desencadear transformações neoplásicas células hematopoiéticas desses animais (BOBADE et al., 1988; SHELTON, LINENBERGER, 1995).

Um estudo realizado na década de 1970, apesar das evidências, não pôde ser considerado uma demonstração clara de que uma infecção por hemoplasma ativaria uma leucemia felina, entretanto mostra claramente que há uma associação entre essas condições (PRIESTER; HAYES, 1973). Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que a hemoplasmosose seria seguida de leucemia; ou ainda que uma leucemia converteria uma infecção por hemoplasma latente em doença clínica, todavia, é importante salientar que os deste estudo não foram testados para a presença do FeLV de forma específica. Adicionalmente, George et al. (2002) demonstraram que infecções por '*Candidatus M. haemominutum*' podem induzir o aparecimento de doenças mieloproliferativas em gatos previamente infectados com FeLV.

Existem poucas evidências de uma relação sinérgica entre infecções por FIV e hemoplasmas. Sparkes et al. (1993) encontraram uma elevada ocorrência de infecções pelo parasito em gatos FIV-positivos com anemia, alguns em estágio terminal. Embora não tenham obtido evidências de relação causa-efeito, alguns estudos recentes também conseguiram demonstrar uma associação entre infecções por FIV e hemoplasmas (LURIA et al., 2004; SYKES et al., 2007a). Em adendo, um estudo envolvendo gatos de vida livre encontrados em fazendas mostrou uma correlação negativa entre a soropositividade para FIV e infecções por hemoplasmas (YAMAGUCHI et al., 1996).

Todavia, não houve evidências a partir do estudo que um estímulo externo ao sistema imunológico administrado sob a forma de infecções incidentais e vacinas aumentariam a replicação do FIV através do tempo. Desta forma, não houve diferenças qualitativas na doença provocada por hemoplasmas entre gatos FIV-positivos ou negativos (REUBEL et al., 1994). Ademais, dois estudos recentes falharam em demonstrar um efeito significativo de uma infecção crônica preexistente por FIV no número de cópias de DNA de *M. haemofelis* ou '*Candidatus M. haemominutum*' em sua cinética, bem como nas principais alterações hematológicas causadas pelos hemoplasmas estudados (TASKER et al., 2006b; TASKER et al., 2006a). Essa também foi a conclusão de Harrus et al. (2002), que, apesar de corroborarem os trabalhos previamente citados, apontaram que coinfeções com este retrovírus e hemoplasmas mostraram uma tendência de queda na expectativa de vida dos animais (HARRUS et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Amostras sanguíneas de 149 gatos domésticos atendidos em uma clínica exclusiva para o atendimento de felinos¹ na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, no período de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2006, foram coletadas prospectivamente. Essas amostras englobaram todos os animais testados para exposição/infecção aos retrovírus felinos FIV e FeLV neste período. A maioria dos testes foi realizada por indicação clínica e algumas por motivos profiláticos, como a introdução de um novo animal no recinto, por exemplo. O plasma ou soro dos animais foi testado para as retrovirose com o 'kit' de diagnóstico rápido Snap FIV antibody/FeLV antigen Combo² de acordo com as instruções do fabricante. Este teste detecta o antígeno de FeLV p27 e anticorpos específicos para o FIV. É importante salientar que um resultado positivo para anticorpos contra o FIV, nas condições em que foi realizado o presente estudo, é considerado sinônimo de infecção com o agente viral em questão (YAMAMOTO et al., 1989; CRAWFORD; LEVY, 2007), sendo desta forma tratados no decorrer do trabalho. Todos os procedimentos realizados neste estudo contaram com autorização por escrito dos proprietários através de termo próprio para este fim (Anexo A).

3.2 Divisão de Grupos

Com base nos testes sorológicos os animais foram agrupados para análise estatística dos resultados da seguinte maneira: I) FIV-positivos (n=25); II) FeLV-positivos (n=39); III) FeLV e FIV-positivos (n=8) e IV) FeLV e FIV-negativos (n=77), também definido como grupo de referência ou base de comparação.

3.3 Coleta de dados

Informações acerca do histórico do animal, bem como sobre a presença ou exposição a fatores de risco para infecções para hemoplasmas e retrovírus felinos foram obtidos pelo Médico Veterinário (a partir do proprietário e exame clínico do animal) no momento da consulta ou através de pesquisa subsequente nos registros da Clínica. Informações não disponíveis sobre qualquer possível fator de risco foram consideradas variáveis 'faltosas' para efeito de análise estatística posterior. As informações coletadas sobre cada animal podem ser visualizadas no anexo B. Para efeito de análise estatística, foram consideradas as seguintes informações sobre os animais: idade, sexo, raça (definida ou indefinida), castração (sim ou não), histórico de brigas/mordidas com outros gatos, histórico de transfusão de sangue, presença de pulgas (histórico ou exame clínico), acesso ao ambiente externo, presença de outros gatos vivendo no mesmo recinto e ainda histórico de vacinação (herpesvirus felino, vírus da panleucopenia felina, FeLV e/ou raiva). Os animais também foram avaliados clinicamente para anorexia, letargia/depressão, presença de mucosas pálidas, icterícia, taquicardia (>220 batimentos por minuto), taquipnéia (>60 movimentos respiratórios por minuto) e febre ($\geq 39,2^{\circ}\text{C}$).

¹ Clínica Veterinária Gatos & Gatos, Rio de Janeiro, RJ.

² Idexx Laboratories, Westbrook, ME, EUA.

3.4 Hemograma e Concentração Total de Proteínas Plasmáticas

Uma amostra adicional de sangue dos animais foi coletada em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para posterior processamento. O hemograma foi realizado nas dependências da própria clínica, e os resultados, cujos valores de referência se encontram no Quadro 6, foram avaliados como fatores associados para infecções por hemoplasmas neste estudo. Ademais, a concentração de proteínas plasmáticas totais (VR 5,8-8,0 g/dl; 58-80 g/l SI) foi obtida por meio de refratometria. Todos os valores de referência utilizados neste estudo foram baseados em dados fornecidos pelo laboratório onde os exames foram realizados. Após a realização dos exames descritos, o sangue com EDTA foi armazenado sob refrigeração (4°C) até o momento da extração/purificação do DNA.

Quadro 6. Valores de referência para os parâmetros hematológicos utilizados neste estudo.

	Valores de referência*	
	Unidades usadas no laboratório	Unidades do Sistema Internacional
Volume Globular	24-45%	0,24-0,45
Hematimetria	5-10x10 ⁶ /mm ³	5x10 ¹² -10x10 ¹² /l
Hemoglobinometria	8-15 g/dl	80-150 g/l
VGM	39-55 fl.	39-55 fl.
CHGM	31-35%	31-35 g/dl
Plaquetometria	200000-400000/mm ³	20x10 ⁹ -40x10 ⁹ /l
Leucometria Global	5000-19500/mm ³	5x10 ⁹ -19.5x10 ⁹ /l

VGM: Volume Globular Médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média.

*Valores de referência adotados pelo Laboratório de Patologia Clínica da Clínica Veterinária Gatos & Gatos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

3.5 Extração/Purificação do DNA Genômico

O DNA total contido no sangue coletado de cada animal foi extraído e purificado no prazo de no máximo uma semana após a coleta. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, com o uso do 'kit' comercial Generation Capture Column³ de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o envio das mesmas para processamento nos EUA, onde o autor desta Tese desenvolveu parte do trabalho através do Programa de Doutorado no País com estágio do Exterior (PDEE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

3.6 Envio das Amostras

As amostras foram acondicionadas em caixa térmica contendo gelo seco e enviadas para a Cornell University, College of Veterinary Medicine, Department of Population Medicine & Diagnostic Sciences Ithaca, NY, EUA, aos cuidados da Orientadora estrangeira, Dra. Joanne B. Messick. O envio das amostras foi feito através de serviço de entrega expressa internacional (Federal Express) e respeitou todas as exigências legais brasileiras e norte-americanas para transporte e envio deste tipo de material. Uma vez recebidas, as amostras

³ Gentra Systems, Minneapolis, MN, EUA.

foram colocadas em ‘ultra-freezer’ (-80°C), até a chegada do Bolsista no país de destino para o processamento das mesmas.

3.7 PCR

Todas as amostras foram testadas para a presença do gene 16S rRNA de *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ nas dependências do Laboratório de Pesquisa do setor de Patologia Clínica Veterinária do ‘Department of Population Medicine & Diagnostic Sciences, College of Veterinary Medicine, Cornell University’, Ithaca, NY, EUA.

Para amplificar o fragmento parcial de 393 pares de base (pb) do gene 16S rRNA de *M. haemofelis*, a PCR foi executada com 5 µl de DNA extraído em solução para um volume total de 25 µl por reação. As concentrações finais dos reagentes da PCR foram: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl⁴, 0,1% Triton X-100⁴, 2,5mM MgCl₂⁴, 0,2mM de cada dNTP⁴, 0,2mM de cada seqüência iniciadora⁵ ou ‘primer’, 1U de Taq DNA polimerase⁴, e água estéril para biologia molecular q.s.p. 25 µl. As condições de reação consistiram de uma etapa inicial de desnaturação por 10 minutos (min) a 94°C, seguida de 43 ciclos de 94°C por 45 segundos (seg), 54°C por 45 seg, 72°C por um minuto e um passo final de extensão a 72°C por 7 min. (BERENT et al., 1998).

Com o intuito de verificar a presença do DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’, a PCR foi executada com a mesma quantidade de DNA em solução descrita anteriormente e uma concentração final de 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,2mM de cada seqüência iniciadora ou ‘primer’, 1U de Taq DNA polimerase, e água estéril q.s.p. 25 µl. Os reagentes utilizados foram dos mesmos fabricantes que os da reação previamente descrita. As condições de reação utilizadas consistiram em uma etapa inicial de desnaturação de 4 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 53°C por 1 min e 70°C por 45 seg, se encerrando com uma etapa adicional de extensão por 5 min a 70°C, resultando assim em um produto de 191 pb (FOLEY et al., 1998). Para ambos os protocolos foi utilizado o termociclador programável⁶, sendo as amostras mantidas sob refrigeração (4°C) após o procedimento final de extensão.

Visto que as células sanguíneas podem apresentar componentes inibidores que levam a um resultado falso-negativo na PCR (AL-SOULD; RADSTRÖM, 2001), o gene codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como verificador para a presença de DNA amplificável na amostra, uma vez que é encontrado em todos os mamíferos e resultou na formação de um produto de 399 pares de base (BIRKENHEUER et al., 2003). As condições de reação⁷ consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 45 seg e 72°C por 45 seg, finalizando com uma extensão adicional de 2 min a 72°C. Foram utilizados os seguintes reagentes em suas concentrações finais: 1X Green GoTaq[®] Flexi Buffer⁴, 1,5mM MgCl₂⁴, 0,2mM de cada dNTP⁴, 0,2mM de cada seqüência iniciadora⁵, 1,25U GoTaq[®] DNA Polimerase⁴, e água estéril q.s.p. 25 µl.

Os pares de seqüências iniciadoras utilizadas neste estudo, bem como o tamanho de cada produto obtido e a posição destes no alinhamento com as seqüências específicas do gene codificador da unidade 16S do rRNA ou do gene GAPDH estão descritos no Quadro 7.

⁴ Promega, Madison, WI, EUA.

⁵ Integrated DNA Technologies – IDT – Coralville, IA, EUA.

⁶ PTC-100, MJ Research Inc, Waltham, MA, EUA.

⁷ Informação pessoal fornecida via correio eletrônico pelo Dr. A. J. Birkenheuer. Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, EUA.

Quadro 7. Sequências iniciadoras (‘primers’) e genes alvos utilizados no presente trabalho para a detecção de hemoplasmas felinos em gatos domésticos bem como para a detecção do gene codificador da Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), posição dos produtos da PCR nos genes-alvo, tamanho dos mesmos em pares de base (pb) e número de acesso das respectivas sequências genéticas depositadas no ‘genbank’ utilizadas como referência.

‘Primer’	Sequência (5’ – 3’)	Gene alvo	Posição do produto da PCR no gene alvo	Tamanho aproximado do produto (pb)	Número de acesso do genbank [†]	Referência
Hfelis-F1	GACTTTGGTTTCGGCCAAGG	16S rRNA de <i>Mycoplasma. haemofelis</i> (‘foward’)	61 – 453	393	U95297	(1)
Hfelis-R3	CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC	16S rRNA de <i>M. haemofelis</i> (‘reverse’)				
Cali-F1	GCATAATGTGTCGCAATC	16S rRNA de ‘ <i>Candidatus M. haemominutum</i> ’ (‘foward’)	1195 – 1386	191	U88564	(2)
Cali-R1	GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC	16S rRNA de ‘ <i>Candidatus M. haemominutum</i> ’ (‘reverse’)				
GAPDH-F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	GAPDH de mamíferos (‘foward’)	101 – 500	399	AB038241	(3)
GAPDH-R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	GAPDH de mamíferos (‘reverse’)				

[†] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide>

Referências: 1- Berent et al. (1998); 2- Rikihisa et al. (1997); 3- Birkenheuer et al. (2003)

As misturas da PCR foram preparadas em estação de trabalho especial 'PCR Workstation'⁸ a fim de se evitarem ao máximo os riscos de contaminação.

Para todas as amplificações, controles positivos (clones de fragmentos específicos do 16S rRNA dos hemoplasmas testados) e negativos (animal clinicamente sadio e água estéril) foram utilizados.

Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose⁹ a 1,5% em solução tampão Tris-acetato-EDTA (40mM Tris-Acetato e 1mM EDTA) contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídeo⁸. Os amplicons foram adicionados à solução contendo glicerol a 50%; EDTA 0,1M e azul de bromofenol 0,1% e posteriormente levados ao gel previamente solidificado em cuba 'Sub cell GT DNA electrophoresis cell'¹⁰. Nas reações envolvendo a amplificação de um fragmento do gene GAPDH, os amplicons foram adicionados diretamente ao gel, sem a necessidade do passo anterior, uma vez que os reagentes utilizados tornam a etapa previamente citada desnecessária. A corrida durou aproximadamente 90 minutos a 80 volts em fonte 'PowerPac HC Power Supply', do mesmo fabricante. Como solução de corrida, se utilizou o tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1x) (40mM Tris-Acetato e 1mM EDTA). Os resultados foram visualizados e documentados sob transluminador ultra-violeta¹¹. As fotografias obtidas digitalmente foram posteriormente ajustadas no programa Adobe Photoshop CS2¹² para melhor visualização e acabamento.

Para a determinação do tamanho dos produtos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb¹³.

3.8 Southern Blot e Híbridização

A transferência dos produtos da PCR foi realizada em todas as amostras testadas após eletroforese e visualização/documentação do gel. Usando um sistema rápido de transferência¹⁴ os géis de PCR foram submetidos à desnaturação alcalina (3 M NaCl, 0,4 M NaOH) e neutralização (1M tampão fosfato, pH 6,8) e transferidos para uma membrana de nylon positivamente carregada¹⁵ (CHOMCZYNSKI, 1992). Sondas específicas para o DNA de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' foram sintetizadas através da substituição dos dNTPs utilizados na PCR convencional pelo 'PCR DIG Labeling mix', resultando em seqüências quimicamente marcadas de 393pb e 191pb para ambos os hemoplasmas respectivamente. Essas etapas foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes. Uma vez contendo os produtos transferidos do gel, as membranas foram pré-híbridizadas por duas horas (h) a 45°C usando a solução 'DIG Easy Hyb', seguida por híbridização durante a noite ou por 12h a 45°C com as sondas específicas. Após a híbridização, a primeira etapa de lavagem das membranas foi realizada em solução salina-sódio-citrato (SSC) duas vezes concentrada/0,1% sódio-dodecil-sulfato (SDS), em temperatura ambiente (TA), três vezes, por 10 min cada; e depois em 0,2 x SSC/0,1% tampão SDS a 68°C por 30 min. A membrana foi bloqueada por 4 h com solução tampão de bloqueio 2x / 1x ácido maleico em TA. Essa etapa foi seguida pela estabilização da membrana em solução de lavagem ('washing solution') por 5 min em TA e ligação a anticorpo conjugado com anti-DIG-fosfatase em 1x solução de bloqueio ('blocking solution')/ 1x ácido maleico (1:20000). As membranas foram estabilizadas com solução de detecção por 5 min/TA e depois embebidas em substrato

⁸ Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA.

⁹ Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA.

¹⁰ Bio-Rad, Hercules, CA, EUA.

¹¹ Kodak Gel Logic 100 Imagins System, Eastman Kodak Corporation, Rochester, NY, EUA

¹² Adobe Systems Incorporated, San Jose, EUA.

¹³ 100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Carlsbad, EUA

¹⁴ Turboblotter™ Rapid Downward Transfer Systems (Whatman® Schleicher & Schuell, Keene, NH)

¹⁵ Nytran® SuPerCharge TurboBlotter™ (Whatman® Schleicher & Schuell, Keene, NH, EUA)

queminulescente para fosfatase alcalina pronto para o uso CDP-*Star*, e mais uma incubação adicional de 5 min. Finalmente, as membranas foram seladas em envelopes plásticos e radiografadas em sistema automatizado¹⁶. Exceto pelo SSC e SDS¹⁷, todo o ensaio de hibridização, incluindo a síntese de sondas foram realizadas utilizando-se reagentes de kit comercial¹⁸, sendo os nomes das soluções traduzidos de forma livre, bem como apresentados pelo fabricante na língua original.

3.9 Clonagem e Seqüenciamento dos Produtos

Com o intuito de se confirmar a identidade dos produtos da PCR, foi selecionada uma amostra positiva de cada gel de eletroforese que mostrou amplicons específicos para serem clonados e seqüenciados. Previamente à clonagem dos produtos da PCR, os fragmentos de 393 pb de *M. haemofelis* e 191 pb de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foram purificados diretamente a partir dos géis de agarose através do Zymoclean gel DNA recovery kit¹⁹. Fragmentos purificados foram posteriormente clonados no vetor PGEM T-Easy Vector System II²⁰. Recombinantes foram selecionados com base nas cores azul/branca das colônias e amplificados através de PCR específica em termociclador programável²¹ nas seguintes condições: etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida de 31 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 2,5 min, finalizando com uma extensão adicional de 7 min a 72°C. Para a realização da PCR de colônia foram utilizados os seguintes reagentes em suas concentrações finais: 1X Green GoTaq[®] Buffer²², 1,5mM MgCl₂²¹, 0,2mM de cada dNTP²¹, 0,4mM de cada seqüência iniciadora²³ (T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'; SP6 5'-TACGATTTAGGTGACACTATAG-3'), 0,25U GoTaq[®] DNA Polimerase²¹, e água estéril q.s.p. 25 µl. Plasmídios contendo insertos de tamanho apropriado foram preparados e purificados através do QIAprep miniprep kit²⁴. Exceto pela programação e reagentes utilizados na PCR de colônia, os passos previamente descritos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Todos os clones foram seqüenciados em ambas as direções ‘sense’ e ‘anti-sense’ através do método dideoxi de terminação (SLATKO et al., 1999), usando o ‘Applied Biosystems Automated 3730 DNA analyser²⁵’ na Cornell University, Ithaca, NY, EUA. Os dados obtidos no seqüenciamento foram analisados no programa Blast 2.0.10²⁶

3.10 Análise Estatística

Estimativas de prevalência e intervalos de confiança (IC) a 95% exatos obtidos através de teste de probabilidade binomial foram calculados para cada desfecho nos animais testados para a presença de FIV e FeLV. Comparações entre as variáveis aferidas nos grupos de estudo foram confrontadas com as mesmas no grupo de referência através dos testes não-

¹⁶ Konica SRX-101A Medical film processor, Wayne, NJ, EUA.

¹⁷ Promega, Madison, WI, EUA.

¹⁸ DIG-Systems for non-reactive nucleic acid labeling and detection (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, EUA).

¹⁹ Zymo Research Corp, Orange, CA, EUA

²⁰ Promega, Madison, WI, EUA.

²¹ PTC-100, MJ Research Inc, Waltham, MA, EUA.

²² Promega, Madison, WI, EUA.

²³ Integrated DNA Technologies – IDT – Coralville, IA, EUA.

²⁴ Qiagen, Valencia, CA, EUA.

²⁵ Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA.

²⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

paramétricos de qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher (variáveis com respostas categóricas) quando aplicável ou Mann-Whitney (variáveis contínuas).

A comparação dos resultados entre a PCR e o SB/hibridização, bem como a comparação entre as técnicas de avaliação do esfregaço sangüíneo e moleculares para a identificação de infecções por hemoplasmas felinos foram realizadas através do teste Exato de Fisher. Estimativas de prevalência e IC a 95% exatos obtidos através de teste de probabilidade binomial também foram calculados para hemoplasmas em cada grupo e indicados como porcentagens de gatos com um resultado de teste positivo (número de gatos testados positivos dividido pelo número total de gatos testados x 100). Com o intuito de se verificar a presença de associação entre as variáveis aferidas quanto a positividade para hemoplasma, foram realizados os mesmos testes descritos anteriormente.

Um modelo de regressão logística foi executado para cada um dos três possíveis resultados (hemoplasma, '*Candidatus M. haemominutum*' e *M. haemofelis*) incluindo apenas o grupo (FIV-positivos, FeLV-positivos, FIV/FeLV-positivos e gatos negativos para ambos os retrovírus) como preditor. O 'odds ratio' (OR) ou razão de chances, IC a 95% para o perfil de verossimilhança e os valores p através de teste da razão de verossimilhança (χ^2) estão indicados. Ademais, um modelo de regressão logística foi executado a fim de avaliar a relação entre fatores de risco e retrovírus na presença de DNA de hemoplasmas. Assim, para cada possível fator de risco, o modelo de regressão logística foi executado, usando a presença do fator de risco levantado, condição retroviral e o fator de interação para predizer a presença de DNA de hemoplasmas. Os fatores associados puderam apenas ser avaliados individualmente devido ao pequeno número de animais hemoplasma-positivos. No caso da interação ter sido considerada significativa, o modelo foi quebrado por fator de risco para se calcular o OR e o IC de 95%. Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todos os testes neste estudo. No caso de haver relevância clínica, p-valores iguais a 0,05 também foram considerados significativos.

A análise estatística foi realizada por meio dos programas SAS 9.1²⁷, SPSS 13.0²⁸ e STATA 9.0²⁹.

²⁷ SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA.

²⁸ SPSS Inc, Chicago, IL, EUA.

²⁹ StataCorp LP, College Station, TX, EUA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise Descritiva dos Dados Obtidos

Um total de 149 animais foi testado para a presença de infecção por FIV e/ou FeLV no presente trabalho, e portanto incluídos no estudo. Entretanto, dados referentes às entrevistas e exames clínicos e laboratoriais não foram obtidos em todas as situações. Na Tabela 1 estão o total de observações absolutas válidas para cada parâmetro, alteração clínica e/ou laboratorial analisados neste estudo, de acordo com o estado retroviral do animal.

Tabela 1. Total de observações absolutas válidas para cada variável analisada entre todos os 149 animais testados para a presença do(s) Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

	Condição Retroviral				
	FIV (n=25)	FeLV (n=39)	FIV e FeLV (n=8)	Total positivos (n=72)	Negativos (n=77)
Idade	22	36	8	66	75
Sexo	24	39	8	71	77
Condição reprodutiva	23	37	8	68	68
Raça	24	35	8	67	74
Histórico de brigas/mordidas	22	28	8	56	63
Transfusão de sangue	22	31	8	61	68
Presença de pulgas	25	32	7	64	72
Acesso ao ambiente externo	24	33	8	65	68
Viver com outros gatos	22	31	8	61	65
Histórico de vacinação	21	28	7	56	63
Anorexia	25	36	7	68	72
Letargia/Depressão	24	37	7	68	73
Mucosas pálidas	24	34	7	65	76
Icterícia	25	36	6	67	76
Taquicardia	25	35	6	66	76
Taquipnéia	25	35	7	67	76
Febre	24	35	6	65	72
Dados hematológicos*	24	38	8	70	77
Plaquetometria	19	31	5	55	55
Proteínas plasmáticas totais	23	37	8	68	76

*Incluem Volume Globular, Hematimetria, Hemoglobinometria, Volume Globular Médio, Concentração de Hemoglobina Globular Média e Leucometria Global.

4.2 Prevalência dos Vírus da Imunodeficiência e Leucemia Felina nos Gatos Testados

Dos 149 animais testados 72 apresentaram um resultado positivo para a presença de pelo menos um dos retrovírus pesquisados. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados descritivos completos acerca da prevalência de infecções pelos retrovírus testados e intervalos de confiança a 95% nos animais utilizados neste estudo.

Tabela 2. Soroprevalência por ELISA e intervalos de confiança (IC) a 95% para todos os animais testados (n=149) para a presença de anticorpos contra o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou antígenos do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) em uma clínica exclusiva no atendimento de gatos domésticos na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil, de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

Condição retroviral (ELISA)	n/149 (%)	IC 95%*
Retrovírus-positivo	72/149 (48,3)	[40,0 - 56,7]
FIV e FeLV-negativos	77/149 (51,7)	[43,4 - 59,9]
FIV-positivo	25/149 (16,8)	[11,2 - 23,8]
FeLV positivo	39/149 (26,2)	[19,3 - 34,0]
FIV e FeLV-positivos	8/149 (5,4)	[2,3 - 10,3]

*Intervalos de confiança a 95% exatos para Proporção Binomial

As prevalências encontradas neste estudo são bem mais elevadas do que as descritas na literatura, principalmente em relação aos retrovírus como um todo e ao FeLV. Ao se interpretar resultados de estudos de prevalência, é imperativo que se tenha em mente a população selecionada. Em estudos analisando populações de uma forma geral (incluindo animais saudáveis e doentes), as taxas de prevalência são reduzidas (COURCHAMP; PONTIER, 1994; LEVY et al., 2006). Estes números caem ainda mais quando se analisam apenas animais assintomáticos, conforme estudo realizado nos EUA, onde a prevalência das infecções por FIV, FeLV e mistas (FIV e FeLV) foi de, respectivamente, 6,8%, 4,0% e 0,5% ao se observarem apenas animais assintomáticos (O'CONNOR et al., 1991). Quando analisados apenas os animais em risco ou com sintomas, as prevalências de infecção para FeLV, FIV ou infecções mistas aumentaram para 21,1%, 11,6% e 2,6%, sendo de 37,7% a prevalência de infecção para ao menos um retrovírus (Ibid). Prevalências de FIV reduzidas em grupos de animais saudáveis também foram observadas por Yamamoto et al. (1989) e Shelton et al., (1989). Tais fatos corroboram os resultados obtidos por Shelton et al. (1989), Yamamoto et al. (1989) e Courchamp e Pontier, (1994), os quais identificaram uma prevalência mais elevada de FIV em populações levadas a clínicas e hospitais veterinários. Diversos trabalhos, incluindo outras doenças infecciosas, indicam que a prevalência de uma infecção estaria diretamente relacionada ao risco da população selecionada apresentar o agente em questão (O'CONNOR et al., 1991; COURCHAMP; PONTIER, 1994; KEWISH et al., 2004). Souza et al. (2002) identificaram uma ocorrência de positividade para FIV de aproximadamente 20% dentre animais doentes (20/99), enquanto apenas um animal dentre os 27 saudáveis (3,7%) teve o mesmo resultado. Tais achados justificam o fato de que a prevalência de infecção por FIV e/ou FeLV entre gatos no presente estudo ser consideravelmente maior do que a população geral, visto que, salvo razões profiláticas em uma minoria, os animais aqui utilizados foram testados com base em indicações clínicas. Ademais, podemos sugerir que a prevalência de infecções por retrovírus vem crescendo, principalmente se analisados os animais atendidos na Clínica Veterinária que forneceu as amostras para o presente trabalho. Souza et al. (2002) sugeriram com seus achados um aumento na prevalência da infecção por retrovírus no Brasil. Uma maior eficiência dos métodos de diagnóstico poderia explicar esse aumento, entretanto, devido à elevação da população de gatos domésticos, bem como da densidade populacional dos mesmos, é realmente provável que esses achados reflitam uma nova distribuição dos agentes patogênicos na população de estudo. Levando-se em conta que o presente trabalho utilizou amostras provenientes da mesma Clínica e uma coorte semelhante de animais, encontrando prevalências maiores, principalmente para a presença de FeLV, esta hipótese encontra sustentação. O contrário ocorre nos EUA, onde a prevalência geral de infecções por FeLV vem caindo gradativamente ao longo dos anos, uma vez que a

disponibilidade de testes de diagnóstico permite que medidas profiláticas seja tomadas, como, por exemplo, eliminar animais positivos de uma determinada população ou mesmo impedir que estes sejam introduzidos entre gatos sadios (HARTMANN, 2006). A vacinação contra o FeLV também contribuiu para esta queda, entretanto, estudos epidemiológicos sugerem que as estratégias profiláticas previamente citadas teriam um efeito maior na redução das infecções (ROMATOWSKI; LUBKIN, 1997).

De acordo com o fabricante, o teste de ELISA utilizado para a detecção de anticorpos para FIV e antígeno para FeLV apresenta uma sensibilidade de 97,6% e 100% e uma especificidade de 99,1% e 99,5% para o diagnóstico de FIV e FeLV respectivamente. Entretanto, a confiabilidade dos resultados de um teste de diagnóstico também depende diretamente da prevalência da infecção na população testada (HARTMANN et al., 2001). Uma baixa prevalência do agente em questão pode levar a um valor preditivo positivo (VPP) baixo dos resultados do teste, assim, a probabilidade de que retrovírus estejam realmente infectando os animais quando o resultado do teste fosse positivo seria baixa (HARDY, 1991; JACOBSON, 1991). Em um estudo prévio, o qual havia testado soros de gatos atendidos em uma clínica veterinária exclusiva para o atendimento de felinos na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil, observou prevalências de 17,46% e 16,66% para FeLV e FIV em animais com indicação para o teste, respectivamente (SOUZA et al., 2002). Baseado nesses resultados de prevalência, assumindo a sensibilidade e especificidade do teste ELISA conforme previamente determinadas, e utilizando os cálculos sugeridos por Jacobson (1991), uma confiabilidade de um teste positivo foi prevista em 95%. Os fatores que poderiam levar a um resultado falso positivo na técnica de ELISA para anticorpos contra FIV foram provavelmente eliminados nesse trabalho. Anticorpos maternos para FIV em filhotes de até seis meses de idade já foram encontrados e responsabilizados como variáveis de confundimento na interpretação de um teste positivo (RICHARDS, 2003; LEVY et al. 2003). Ainda, a vacinação contra FIV resulta em uma rápida produção de anticorpos em animais vacinados persistindo por pelo menos um ano, induzindo a um resultado falso-positivo no ELISA (LEVY et al., 2004). Entretanto, não havia até o momento da realização do presente trabalho uma vacina para FIV comercializada no Brasil e, além disto, todos os gatos testados FIV-positivos eram adultos, o que eliminaria uma transferência materna de anticorpos. Em relação ao FeLV, pode-se dizer que diversos animais utilizados neste estudo possuíam um histórico de vacinação contra a infecção pelo referido agente patogênico. Entretanto, uma vez que o teste realizado para o diagnóstico de FeLV detecta a presença de um antígeno específico do vírus livre na circulação, não há interferência da vacinação nos resultados do teste ELISA (LEVY et al. 2003).

Apesar de resultados falso-positivos terem sido documentados no teste de ELISA para ambos os retrovírus, a frequência dessas reações é reduzida quando os testes são realizados de acordo com as instruções do fabricante e boas práticas de laboratório (BARR et al., 1991; LOPEZ; JACOBSON, 1989). Outra causa possível para um teste falso-positivo ocorre pelo uso de sangue total, ao invés de soro ou plasma, conforme já sugerido por Hawks et al. (1991) e Barr, (1996). Todos os testes do presente estudo foram realizados por profissionais capacitados, utilizando-se soro ou plasma como amostra, sendo, portanto pouco provável a ocorrência de resultados falso-positivos.

4.3 Fatores Associados às Infecções por FIV e/ou FeLV

Quando as infecções por retrovírus foram analisadas de uma maneira global, sem discriminação do agente, alguns fatores mostraram associação com a presença dos vírus, ao serem comparados ao grupo de referência.

Animais com idade mais avançada se mostraram mais propícios a estarem infectados pelo menos por um dos retrovírus testados. Esta diferença pode ser atribuída aos animais FIV-positivos, uma vez que os mesmos apresentaram-se mais velhos que o grupo de referência. A ocorrência de FIV é sabidamente maior em animais adultos, conforme demonstrado por vários autores (SHELTON et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989; O'CONNOR et al., 1991; SOUZA, 2002; HARTMANN, 2006; LEVY et al., 2006). O fato do FIV poder permanecer latente por vários anos (SHELTON et al., 1989; YAMAMOTO et al. 1989; ISHIDA et al., 1992; ADDIE et al., 2000), aparecendo apenas quando o animal tiver uma idade mais avançada (Souza, 2002), poderia explicar essa diferença. No entanto, não houve diferença significativa entre a idade dos animais FeLV e FIV/FeLV positivos quando comparados aos animais de referência. Os resultados das análises estatísticas da idade dos animais usados neste estudo, separados por grupos, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Idade dos animais testados para a presença do(s) Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV), comparada com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

Condição retroviral (ELISA)	Idade (anos)				
	Média	DP*	Mínima	Máxima	p-valor**
Retrovírus-positivos	5,2	3,5	0,5	14,0	0,024
FIV-positivos	8,1	3,3	2,0	14,0	<0,001
FeLV-positivos	3,4	2,5	0,5	11,0	0,832
FIV/FeLV-positivos	5,3	2,2	2,0	9,0	0,181
Grupo de Referência (FIV/FeLV-negativos)	4,2	3,6	0,2	14,0	GR

*Desvio Padrão

**P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Os possíveis fatores associados às infecções por retrovírus felinos foram analisados sob diferentes condições. Primeiramente se analisou a população de animais positivos para pelo menos um retrovírus (n=72), em comparação em grupo de referência (n=77). O grupo de animais positivos foi dividido de acordo com o retrovírus em questão, sendo os resultados também confrontados com os animais identificados como livres de infecção por FIV e FeLV.

Animais com histórico de brigas/mordidas (OR=4,18; p=0,001), com pulgas (OR=2,13; p=0,05) e acesso ao ambiente externo (OR=2,43; p=0,016) teriam uma maior chance de apresentarem um resultado positivo para alguma das retrovirose testadas (Tabela 4). Entretanto, acredita-se que estes achados se devem aos fatores analisados dentro de cada grupo de forma específica. Desta forma, essas associações serão discutidas adiante, juntamente com os resultados encontrados dentro de cada grupo de animais utilizados neste estudo.

Tabela 4. Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença de pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

FATORES	Condição retroviral n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Sexo						
Macho	44 (62)	44 (57,1)	148	1,22	[0,63 – 1,22]	0,550
Fêmea	27 (38)	33 (42,9)				
Condição reprodutiva						
Castrado	54 (79,4)	44 (66,7)	136	2,10	[0,97 – 4,54]	0,055
Não-castrado	14 (20,6)	24 (35,3)				
Raça						
Definida	13 (19,4)	19 (25,7)	141	0,70	[0,31 – 1,55]	0,373
Não definida	54 (80,6)	55 (74,3)				
Histórico de brigas/mordidas						
Sim	23 (41,1)	9 (14,3)	119	4,18	[1,73 – 10,12]	0,001
Não	33 (58,9)	54 (85,7)				
Transfusão de sangue						
Sim	5 (8,2)	1 (1,5)	129	5,98	[0,68 – 52,72]	0,1*
Não	56 (91,8)	67 (98,5)				
Presença de pulgas						
Sim	23 (60,5)	15 (20,8)	136	2,13	[0,99 – 4,58]	0,05
Não	41 (41,6)	57 (79,2)				
Acesso ao ambiente externo						
Sim	28 (43,1)	16 (23,5)	133	2,43	[1,17 – 5,18]	0,016
Não	37 (56,9)	52 (76,5)				
Viver com outros gatos						
Sim	54 (88,5)	55 (84,6)	126	1,40	[0,50 – 3,95]	0,52
Não	7 (11,5)	10 (15,4)				
Histórico de vacinação						
Sim	33 (58,9)	46 (73,0)	119	0,53	[0,25 – 1,15]	0,104
Não	23 (41,1)	17 (27,0)				

[†] 'Odds ratio'

[‡] Intervalos de confiança a 95%

*Teste exato de Fisher

Ao se observar os animais FIV-positivos, apenas gatos castrados (OR=3,64; p=0,033) e com histórico de brigas/mordidas (OR=7,2; p<0,001) estariam mais propícios a uma infecção com este vírus, quando comparados aos animais sem retrovírus. Dentre os mecanismos horizontais de transmissão do FIV, se destaca a via através de brigas e mordidas em animais machos, que podem inocular saliva contaminada com o vírus diretamente na corrente sanguínea, fato que explica uma maior ocorrência de animais infectados com histórico de brigas (SHELTON et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1989). Era esperada uma maior ocorrência de FIV em animais machos, levando a uma diferença significativa em comparação ao grupo de referência. Essa expectativa se justifica, uma vez que muitos estudos colocam gatos machos como principal grupo de risco para a infecção pelo retrovírus (SHELTON et al., 1989; SHELTON et al., 1990a; YAMAMOTO et al., 1989; COURCHAMP; PONTIERS, 1994). Entretanto, o número de gatos machos testados no presente trabalho foi consideravelmente mais elevado do que o de fêmeas (em todos os grupos), fato que pode ter levado a uma não associação da variável sexo com a presença de FIV. Animais castrados também apresentaram uma maior chance de um resultado positivo para FIV. Essa associação não é relatada com frequência, e provavelmente ocorreu por um viés de seleção, uma vez que o FIV acomete animais sabidamente com maior idade, e com isso prováveis de terem sido submetidos ao procedimento cirúrgico de castração, conforme sugerido por O'Connor et al. (1991). No presente trabalho, animais testados FIV-positivos foram significativamente mais velhos do que os gatos do grupo de referência (p<0,001)

conforme previamente colocado, o que explicaria este achado. Ademais, a população aqui selecionada é proveniente de uma clínica veterinária, logo de animais que recebem cuidados, diferentemente da população geral. Desta forma, os proprietários têm mais acesso a informações acerca de programas de esterilização, bem como recursos para este tipo de cirurgia. Contrariando diversos estudos epidemiológicos (SHELTON et al., 1989; O'CONNOR et al., 1991; COURCHAMP; PONTIERS, 1994; LEVY et al., 2006), o presente estudo não encontrou uma associação significativa entre o acesso ao ambiente externo e a infecção por FIV. Tal fato poderia ser explicado, uma vez que o número de animais com acesso ao ambiente externo testados para retrovírus também foi alto, embora menor em termos percentuais do que o do grupo infectado. A presença de pulgas (*in situ* ou no histórico) também não foi relacionada à infecção por FIV, entretanto este fator não é descrito como associado à infecção por este retrovírus, sendo incluído no presente questionário em virtude de uma possível associação com infecções por hemoplasmas felinos e mesmo FeLV. A transmissão iatrogênica do FIV através de transfusões de sangue é possível, entretanto não houve associação ao se comparar tal provável fator associado entre os grupos FIV-positivo e de referência. Um pequeno número de animais que apresentaram um histórico de transfusão sanguínea seria uma justificativa plausível para tais achados. Animais confinados tendem a um comportamento social mais companheiro, de menor agressividade, desta forma não nos surpreendeu o fato de viver com outros gatos não estar associado à infecção. O histórico de vacinação (para a prevenção de qualquer doença) foi aferido de forma a se pesquisar o cuidado que cada animal recebe, ou seja, se o mesmo faria visitas profiláticas à Clínica, lembrando, inclusive, que não havia vacina contra FIV comercializada no Brasil até o momento da realização deste estudo. A relação completa dos fatores analisados cujas respostas são dicotômicas, comparados ao grupo de referência, bem como o 'odds ratio' (OR) e IC a 95% envolvendo animais testados positivamente para o FIV está descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

FATORES	Condição retroviral (FIV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Sexo						
Macho	15 (62,5)	44 (57,1)	101	1,25	[0,49 – 3,21]	0,641
Fêmea	9 (37,5)	33 (42,9)				
Condição reprodutiva						
Castrado	20 (87,0)	44 (66,7)	91	3,64	[0,98 – 13,50]	0,033
Não-castrado	3 (13,0)	24 (35,3)				
Raça						
Definida	7 (29,2)	19 (25,7)	98	1,19	[0,43 – 3,32]	0,738
Não definida	17 (70,8)	55 (74,3)				
Histórico de brigas/mordidas						
Sim	12 (54,5)	9 (14,3)	85	7,2	[2,41 – 21,55]	<0,001
Não	10 (45,5)	54 (85,7)				
Transfusão de sangue						
Sim	1 (4,5)	1 (1,5)	90	3,19	[0,19 – 53,25]	0,431*
Não	21 (95,5)	67 (98,5)				
Presença de pulgas						
Sim	7 (28,0)	15 (20,8)	97	1,48	[0,52 – 4,19]	0,468
Não	18 (72,0)	57 (79,2)				
Acesso ao ambiente externo						
Sim	10 (41,7)	16 (23,5)	92	2,32	[0,87 – 6,22]	0,097
Não	14 (58,3)	52 (76,5)				
Viver com outros gatos						
Sim	21 (95,5)	55 (84,6)	87	3,82	[0,46 – 31,69]	0,277*
Não	1 (4,5)	10 (15,4)				
Histórico de vacinação						
Sim	12 (57,1)	46 (73,0)	84	0,49	[0,18 – 1,38]	0,181
Não	9 (42,9)	17 (27,0)				

[†] 'Odds ratio'

[‡] Intervalos de confiança a 95%

*Teste exato de Fisher

Apenas a presença de pulgas foi considerada um fator associado à infecção pelo FeLV (OR=2,96; p=0,018). Apesar da ocorrência do artrópode não ser considerada importante como meio de transmissão horizontal do agente, tal hipótese já foi sugerida por alguns estudos (VOBIS et al., 2003a; 2003b; 2003c). Dentre os demais fatores, o único descrito na literatura como associado à presença do FeLV é a coabitação no mesmo recinto com mais de um animal. Isto acontece pelo fato do FeLV ser uma infecção 'social', cujo principal meio de transmissão ocorre por meio de contato íntimo entre os animais, ao se lambem mutuamente e dividirem vasilhames de comida, água e caixa de dejetos (LEVY, 2000; HARTMANN, 2006). Uma vez que no presente estudo, a maioria dos animais amostrados, em todos os grupos, viviam com outros gatos, a não associação deste fator à presença do FeLV já era previsível. Apesar da transmissão iatrogênica ser possível, através de agulhas contaminadas, instrumentos, fômites ou transfusão de sangue, este último fator também não esteve associado à infecção pelo retrovírus em questão, provavelmente pelo baixo número de vezes que esse procedimento foi realizado e também pelos cuidados tomados para tal. A relação completa dos fatores analisados cujas respostas são dicotômicas, comparados ao grupo de referência, bem como o 'odds ratio' (OR) e IC a 95% envolvendo animais testados positivamente para o FeLV está descrita na Tabela 6.

Tabela 6. Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da leucemia felina (FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

FATORES	Condição retroviral (FeLV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Sexo						
Macho	24 (61,5)	44 (57,1)	116	1,2	[0,55 – 2,64]	0,649
Fêmea	15 (38,5)	33 (42,9)				
Condição reprodutiva						
Castrado	29 (78,4)	44 (66,7)	105	1,98	[0,78 – 5,00]	0,139
Não-castrado	8 (21,6)	24 (35,3)				
Raça						
Definida	5 (14,3)	19 (25,7)	105	0,48	[0,164 – 1,422]	0,168
Não definida	30 (85,7)	55 (74,3)				
Histórico de brigas/mordidas						
Sim	8 (28,6)	9 (14,3)	91	2,4	[0,81 – 7,08]	0,116
Não	20 (71,4)	54 (85,7)				
Transfusão de sangue						
Sim	2 (6,5)	1 (1,5)	99	4,62	[0,40 – 53,0]	0,230*
Não	29 (93,5)	67 (98,5)				
Presença de pulgas						
Sim	14 (43,8)	15 (20,8)	104	2,96	[1,20 – 7,28]	0,018
Não	18 (56,3)	57 (79,2)				
Acesso ao ambiente externo						
Sim	13 (39,4)	16 (23,5)	101	2,11	[0,86 – 5,17]	0,103
Não	20 (60,6)	52 (76,5)				
Viver com outros gatos						
Sim	26 (83,9)	55 (84,6)	96	0,95	[0,29 – 3,05]	>0,999
Não	5 (16,1)	10 (15,4)				
Histórico de vacinação						
Sim	18 (64,3)	46 (73,0)	91	0,67	[0,26 – 1,72]	0,404
Não	10 (35,7)	17 (27,0)				

[†] 'Odds ratio'

[‡] Intervalos de confiança a 95%

*Teste exato de Fisher

Apenas oito animais de todos os 149 testados apresentaram um resultado duplamente positivo para FIV e FeLV. Ao se analisar este grupo em separado, comparando-o com os animais negativos, apenas o histórico de transfusão de sangue (OR=22,33; p=0,028) e acesso ao ambiente externo (OR=5,42; p=0,033) se mostraram associados à dupla infecção por retrovírus. Esses resultados são inconclusivos, visto o número reduzido de animais presentes neste grupo em separado. Entretanto, se pode especular que a associação da infecção mista com um acesso ao ambiente externo se dê em virtude da presença do FIV. Ademais, animais infectados com um retrovírus, poderiam apresentar uma infecção por um segundo agente (PEDERSEN et al., 1990; SHELTON et al., 1990a; ADDIE et al., 2000). A relação completa dos fatores analisados cujas respostas são dicotômicas, comparados ao grupo de referência, bem como o 'odds ratio' (OR) e IC a 95% envolvendo animais testados positivamente para ambos FIV e FeLV está descrita na Tabela 7.

Tabela 7. Fatores dicotômicos referentes ao histórico clínico dos animais cuja associação com a presença de ambos os vírus das imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

FATORES	Condição retroviral (FIV e FeLV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor*
	Positivos	Negativos				
Sexo						
Macho	5 (62,5)	44 (57,1)	85	1,25	[0,28 – 5,61]	>0,999
Fêmea	3 (37,5)	33 (42,9)				
Condição reprodutiva						
Castrado	5 (62,5)	44 (66,7)	76	0,91	[0,2 – 4,14]	>0,999
Não-castrado	3 (37,5)	24 (35,3)				
Raça						
Definida	1 (12,5)	19 (25,7)	82	0,41	[0,05 – 3,59]	0,672
Não definida	7 (87,5)	55 (74,3)				
Histórico de brigas/mordidas						
Sim	3 (50,0)	9 (14,3)	69	6,0	[1,04 – 34,49]	0,061
Não	3 (50,0)	54 (85,7)				
Transfusão de sangue						
Sim	2 (25,0)	1 (1,5)	76	22,33	[1,80 – 283,64]	0,028
Não	6 (75,0)	67 (98,5)				
Presença de pulgas						
Sim	2 (28,6)	15 (20,8)	79	1,52	[0,27 – 8,62]	0,639
Não	5 (71,4)	57 (79,2)				
Acesso ao ambiente externo						
Sim	5 (62,5)	16 (23,5)	76	5,42	[1,17 – 25,2]	0,033
Não	3 (37,5)	52 (76,5)				
Viver com outros gatos						
Sim	7 (89,5)	55 (84,6)	73	1,27	[0,14 – 11,50]	>0,999
Não	1 (12,5)	10 (15,4)				
Histórico de vacinação						
Sim	3 (42,9)	46 (73,0)	70	0,28	[0,06 – 1,37]	0,186
Não	4 (57,1)	17 (27,0)				

[†] 'Odds ratio'

[‡] Intervalos de confiança a 95%

*Teste exato de Fisher

4.4 Achados Clínicos Relacionados às Infecções por FIV e/ou FeLV

Os achados clínicos associados às infecções por retrovírus felinos foram analisados sob diferentes condições. Da mesma forma que no item anterior, primeiramente se analisou a população de animais positivos para pelo menos um retrovírus (n=72), em comparação com o grupo de referência (n=77). O grupo de animais positivos foi dividido de acordo com o retrovírus em questão, sendo os resultados também confrontados com os animais identificados como livres de infecção de FIV e FeLV.

Várias foram as variáveis clínicas analisadas que apresentaram significância estatística quando comparadas ao grupo de referência. No universo de animais positivos para qualquer retrovírus, anorexia (OR=2,38; p=0,012), presença de letargia/depressão (OR= 2,17; p=0,025), mucosas pálidas (OR=2,73; p=0,018), icterícia (OR= 3,16; p=0,05) e taquicardia (p=0,009) estavam associadas à presença do(s) vírus. A relação completa dos achados clínicos analisados cujas respostas são dicotômicas, comparados ao grupo de referência, bem como o OR e IC a 95% envolvendo animais testados positivos para pelo menos um dos retrovírus pesquisados, está descrita na Tabela 8.

Tabela 8. Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença de pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

SINAIS/SINTOMAS	Condição retroviral n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Anorexia						
Sim	38 (55,9)	25 (34,7)	140	2,38	[1,21 – 4,71]	0,012
Não	30 (44,1)	47 (65,3)				
Letargia/Depressão						
Sim	35 (51,5)	24 (32,9)	141	2,17	[1,10 – 4,28]	0,025
Não	33 (48,5)	49 (67,1)				
Mucosas pálidas						
Sim	19 (29,2)	10 (13,2)	141	2,73	[1,16 – 6,40]	0,018
Não	46 (70,8)	66 (86,8)				
Icterícia						
Sim	10 (14,9)	4 (5,3)	143	3,16	[0,94 – 10,60]	0,05
Não	57 (85,1)	72 (94,7)				
Taquicardia (>220 batimentos por minuto)						
Sim	6 (9,1)	0 (0)	142	NA**	NA**	0,009*
Não	60 (90,9)	76 (100,0)				
Taquipnéia (>60 respirações por minuto)						
Sim	8 (11,9)	7 (9,2)	143	1,34	[0,48 – 3,91]	0,595
Não	59 (88,1)	69 (90,8)				
Febre (T ≥ 39,2°C)						
Sim	9 (13,8)	14 (19,4)	137	0,67	[0,27 – 1,67]	0,379
Não	56 (86,2)	58 (80,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

**Não aplicável.

Conforme previamente colocado, os sinais clínicos associados às retrovirose causadas pelos FIV e FeLV são inespecíficos, fato inclusive que dificulta o diagnóstico na falta de testes específicos para tal (HARTMANN et al., 2007). Os sinais clínicos considerados significativos no presente estudo podem ocorrer em diversas afecções e apenas alertam para a necessidade de uma investigação mais profunda acerca do problema (MONROE, 2000; TURNWALD, 2000; ROGERS, 2000; ROTHUIZEN, 2000).

Ao comparar o grupo de animais positivos para FIV com os de referência, apenas anorexia (OR=4,0; p=0,004) e presença de mucosas pálidas (OR= 3,3; p=0,034) mostraram-se alterações clínicas presentes estatisticamente significativas nessa coorte de animais. Apesar de serem manifestações clínicas inespecíficas, essas alterações estão constantemente presentes em animais com o FIV (COTTER, 1979; BARR; PHILIPS, 2000; HARTMANN, 2006). A ausência de manifestações clínicas mais acentuadas pode ser devido à latência do vírus, onde apesar de detectável nos testes não se manifesta clinicamente (SHELTON et al., 1989; YAMAMOTO et al. 1989; ISHIDA et al., 1992; ADDIE et al., 2000), bem como pelo fato de animais com FIV apresentarem um histórico de doença recorrente, com períodos saudáveis entre os episódios, fato que já foi descrito em animais naturalmente infectados (ISHIDA et al., 1992). A relação completa dos achados clínicos analisados cujas respostas são dicotômicas, comparados ao grupo de referência, bem como o OR e IC a 95% envolvendo animais testados positivos para o FIV, está descrita na Tabela 9.

Tabela 9. Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da imunodeficiência (FIV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

SINAIS/SINTOMAS	Condição retroviral (FIV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Anorexia						
Sim	17 (68,0)	25 (34,7)	97	4,0	[1,51 – 10,54]	0,004
Não	8 (32,0)	47 (65,3)				
Letargia/Depressão						
Sim	12 (50,0)	24 (32,9)	97	2,04	[0,8 – 5,21]	0,136
Não	12 (50,0)	49 (67,1)				
Mucosas pálidas						
Sim	8 (33,3)	10 (13,2)	100	3,3	[1,12 – 9,70]	0,034*
Não	16 (66,7)	66 (86,8)				
Icterícia						
Sim	2 (8,0)	4 (5,3)	101	1,57	[0,27 – 9,11]	0,636
Não	23 (92,0)	72 (94,7)				
Taquicardia (>220 batimentos por minuto)						
Sim	0 (0)	0 (0)	101	NA	NA	***
Não	25 (100,0)	76 (100,0)				
Taquipnéia (>60 respirações por minuto)						
Sim	1 (4,0)	7 (9,2)	101	0,41	[0,05 – 3,51]	0,675
Não	24 (96,0)	69 (90,8)				
Febre (T ≥ 39,2°C)						
Sim	4 (16,7)	14 (19,4)	96	0,83	[0,24 – 2,81]	>0,999
Não	20 (83,3)	58 (80,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

**Não aplicável.

***Valor constante

Animais FeLV-positivos também apresentaram alterações clínicas significativas quando comparados aos gatos negativos para retrovírus, sendo que 54,1%, (OR=2,4; p=0,033) dos animais estavam letárgicos/deprimidos durante o exame. Ademais, icterícia (OR=4,34; p=0,036) e taquicardia (p=0,003) também foram alterações identificadas no exame físico presentes em maior escala em animais testados positivos para o FeLV do que nos gatos de referência. Um estado de letargia e depressão pode ser atribuído à presença da doença exteriorizada. A icterícia foi primeiramente associada à infecção por FeLV em estudo de Reinacher et al. (1989), juntamente com outras alterações hepáticas, que incluíram dissociação de células, fígado gorduroso, cirrose e necrose focal. A lipidose hepática explicaria alguns desses casos, entretanto, a patogênese da necrose focal ainda necessita elucidação (HARTMANN, 2006). A taquicardia pode ser explicada pelo estresse do animal, em virtude da própria doença e dos procedimentos realizados na clínica. A relação completa dos achados clínicos analisados cujas respostas são dicotômicas, comparados ao grupo de referência, bem como o OR e IC a 95% envolvendo animais testados positivos para o FeLV, está descrita na Tabela 10.

Tabela 10. Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença do vírus da leucemia felina (FeLV) foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

SINAIS/SINTOMAS	Condição retroviral (FeLV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Anorexia						
Sim	18 (50,0)	25 (34,7)	108	1,88	[0,83 – 4,24]	0,128
Não	18 (50,0)	47 (65,3)				
Letargia/Depressão						
Sim	20 (54,1)	24 (32,9)	110	2,40	[1,07 – 5,40]	0,033
Não	17 (45,9)	49 (67,1)				
Mucosas pálidas						
Sim	9 (26,5)	10 (13,2)	110	2,38	[0,86 – 6,53]	0,097
Não	25 (73,5)	66 (86,8)				
Icterícia						
Sim	7 (19,4)	4 (5,3)	112	4,34	[1,18 – 15,97]	0,036*
Não	29 (80,6)	72 (94,7)				
Taquicardia (>220 batimentos por minuto)						
Sim	5 (14,3)	0 (0)	111	ND**	ND**	0,003*
Não	30 (85,7)	76 (100,0)				
Taquipnéia (>60 respirações por minuto)						
Sim	5 (14,3)	7 (9,2)	111	1,64	[0,48 – 5,59]	0,513
Não	30 (85,7)	69 (90,8)				
Febre (T ≥ 39,2°C)						
Sim	5 (14,3)	14 (19,4)	107	0,69	[0,23 – 2,1]	0,506
Não	30 (85,7)	58 (80,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

**Não aplicável.

Animais duplamente positivos para FIV e FeLV não apresentaram diferenças de sinais clínicos significativas com o grupo de referência. Tal fato não era esperado, uma vez que, em teoria, uma infecção poderia potencializar a outra gerando efeitos mais nocivos para o animal (PEDERSEN et al., 1990). Entretanto, Addie et al. (2000) não encontraram redução na expectativa de vida de animais coinfectados. Desta forma se torna difícil concluir algo a partir deste grupo em relação a qualquer um dos fatores no presente trabalho, uma vez que o mesmo é bastante reduzido e, em sua maioria, não apresentou alterações significativas. A relação completa dos achados clínicos analisados cujas respostas são dicotômicas, comparados ao grupo de referência, bem como o OR e IC a 95% envolvendo animais testados positivos para ambos FIV e FeLV, está descrita na Tabela 11.

Tabela 11. Fatores dicotômicos referentes a dados do exame clínico dos animais cuja associação com a presença de ambos os vírus das imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas foi testada estatisticamente, comparados com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

SINAIS/SINTOMAS	Condição retroviral (FIV e FeLV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor [*]
	Positivos	Negativos				
Anorexia						
Sim	3 (42,9)	25 (34,7)	79	1,41	[0,29 – 6,80]	0,694
Não	4 (57,1)	47 (65,3)				
Letargia/Depressão						
Sim	3 (42,9)	24 (32,9)	80	1,53	[0,32 – 7,4]	0,683
Não	4 (47,1)	49 (67,1)				
Mucosas pálidas						
Sim	2 (28,6)	10 (13,2)	83	2,64	[0,45 – 15,5]	0,266
Não	5 (71,4)	66 (86,8)				
Icterícia						
Sim	1 (16,7)	4 (5,3)	82	3,6	[0,34 – 38,57]	0,323
Não	5 (83,3)	72 (94,7)				
Taquicardia (>220 batimentos por minuto)						
Sim	1 (16,7)	0 (0)	82	NA**	NA**	0,073
Não	5 (83,3)	76 (100,0)				
Taquipnéia (>60 respirações por minuto)						
Sim	2 (88,6)	7 (9,2)	73	3,94	[0,64 – 24,21]	0,165
Não	5 (71,4)	69 (90,8)				
Febre (T ≥ 39,2°C)						
Sim	0 (0)	14 (19,4)	78	NA**	NA**	0,584
Não	6 (100,0)	58 (80,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

**Não aplicável.

4.5 Achados Laboratoriais Relacionados às Infecções por FIV e/ou FeLV

No presente trabalho, os animais tiveram alguns parâmetros laboratoriais avaliados e comparados com o grupo referencial, sendo que a maioria dos índices analisados mostrou significância estatística. Animais positivos para pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV) apresentaram o eritrograma e a plaquetometria alterados em comparação ao grupo de referência. Entretanto, a maioria dos parâmetros avaliados estava dentro dos valores considerados normais para a espécie, embora significativamente inferiores ao grupo referencial.

Nenhum dos grupos de estudo apresentou VG médio abaixo dos valores referenciais neste estudo, entretanto, em todos os grupos, o hematócrito estava significativamente reduzido em comparação ao grupo de referência, sendo esta variação mais evidente entre os animais infectados por FIV e FeLV de forma isolada. O fato da redução ser mais acentuada entre os animais duplamente infectados poderia ser explicada em função dos animais com ambos os retrovírus apresentarem alterações mais significativas (SHELTON et al., 1990b).

A macrocitose, traduzida pelo aumento no VGM, nos animais com FIV não é um achado regular (SHELTON; LINENBERGER, 1995). Uma hipótese para um VGM elevado nesses casos seria a possibilidade de infecções oportunistas ou concomitantes, visto que este grupo apresentou alto índice de infecções por hemoplasmas, conforme descrito mais adiante. Porém, animais duplamente infectados também apresentaram macrocitose. Este fato poderia ser justificado da mesma forma ou ainda pela possibilidade desta alteração ser causada pelo FeLV, visto que animais infectados com esse vírus apresentam macrocitose com certa

freqüência, mesmo sem anemia (WEISER; KOCIBA, 1983). A macrocitose presente nos animais FIV positivos, bem como nos duplamente infectados por FIV e FeLV sugere uma resposta medular ou regenerativa, embora neste segundo caso, não tenha havido diferença significativa entre o grupo estudado e o referencial. A presença de um VGM elevado nesses grupos, quando comparada aos animais negativos, pode ser explicada pela presença de infecções oportunistas ou secundárias, que levem à resposta regenerativa da medula óssea.

As alterações quantitativas (VG) e qualitativas (VGM) nas hemácias levaram às mudanças encontradas na concentração de hemoglobina no sangue, bem como no CHGM. Entretanto, os valores aqui encontrados apontam para uma normocromia, visto que se encontram dentro do intervalo de referência.

Apesar dos valores de plaquetometria encontrados nos grupos de estudo estarem bem próximos aos referenciais, a redução significativa deste parâmetro em relação aos animais negativos sugere a ação dos vírus sobre esse componente sanguíneo, o que já foi relatado por Levy (2000), Barr e Philips (2000). Embora infreqüente, o FIV pode, de forma direta, levar a uma redução no número de plaquetas, resultando até em trombocitopenia (YAMAMOTO et al., 1989; SHELTON; LINENBERGER, 1995). Entretanto, reduções acentuadas são mais comumente observadas em casos de neoplasias associadas ao FIV (SHELTON et al., 1990b). Anormalidades na população de plaquetas de animais FeLV-positivos podem envolver mudanças quantitativas e qualitativas, o que explicaria essa diferença na média entre os grupos no limiar da significância estatística (BOYCE et al., 1986; SHELTON; LINENBERGER, 1995; HARTMANN et al., 2006). Em gatos naturalmente infectados, um número reduzido de plaquetas pode ser resultado de efeitos citopáticos diretos do FeLV em megacariócitos, mielopatias e/ou mecanismos imunomediados (SHELTON; LINENBERGER, 1995). Animais duplamente infectados apresentaram uma plaquetometria reduzida, quando comparado com os outros grupos de estudo. Segundo Shelton et al. (1990b), coinfeções com FIV e FeLV produzem citopenias similares àquelas produzidas em infecções isoladas, entretanto com freqüência e gravidade maiores.

As contagens globais de leucócitos também apresentaram alterações quando comparados os grupos positivos para ambos FIV e FeLV e o referencial. Esses animais mostraram uma leucometria global significativamente reduzida, entretanto dentro dos valores considerados normais para a espécie.

Apesar de reduzida em relação ao grupo referencial, alterações na concentração plasmática de proteínas totais não são achados característicos da infecção por FeLV, não apresentando importância no presente estudo.

A relação completa dos parâmetros laboratoriais avaliados, discriminados por condição retroviral dos animais e p-valores obtidos através de comparação com o grupo de referência está descrita na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros laboratoriais mensurados de acordo com a condição retroviral dos animais (positivos para pelo menos um retrovírus) e a comparação destes com o grupo de referência, no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

Condição retroviral	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Retrovírus-positivos	VG (%)	28,1	10,7	4,0	44	<0,001
	Hematimetria (x10 ⁶ /mm ³)	5,3	2,4	0,8	9,2	<0,001
	Hb (g/dl)	8,9	3,5	1,2	14,5	<0,001
	VGM (fl.)	57,8	15,7	39,2	131,0	0,012
	CHGM (%)	31,6	2,7	22,7	37,1	0,032
	LG (/mm ³)	9916	7615	1200	37300	0,083
	Plaquetometria (/mm ³)	186982	120795	8000	620000	0,002
	PPT [†] (g/dl)	7,4	1,4	4,8	12,4	0,202
FIV-positivos	VG (%)	28,8	9,3	10,0	44,0	0,04
	Hematimetria (x10 ⁶ /mm ³)	5,3	2,2	0,84	9,0	<0,001
	Hb (g/dl)	9,1	3,03	2,5	14,5	0,01
	VGM (fl.)	61,1	20,05	40,0	131,0	0,015
	CHGM (%)	31,3	3,1	22,7	37,1	0,03
	LG (/mm ³)	11400	10217	1900	37300	0,249
	Plaquetometria (/mm ³)	182421	110787	20000	519000	0,01
	PPT [†] (g/dl)	8,0	1,5	5,2	11,2	0,189
FeLV-positivos	VG (%)	28,3	12,0	4,0	44,0	0,004
	Hematimetria (x10 ⁶ /mm ³)	5,4	2,6	0,8	9,2	0,002
	Hb (g/dl)	9,0	3,9	1,2	14,0	0,002
	VGM (fl.)	51,5	12,5	39,2	87,5	0,075
	CHGM (%)	31,8	2,1	26,3	34,9	0,042
	LG (/mm ³)	9768	6053	1200	31700	0,429
	Plaquetometria (/mm ³)	199548	130073	8000	620000	0,05
	PPT [†] (g/dl)	7,2	1,3	5,2	12,4	0,017
FIV/FeLV-positivos	VG (%)	25,5	8,5	12,0	34,0	0,05
	Hematimetria (x10 ⁶ /mm ³)	4,6	1,5	2,8	6,8	0,001
	Hb (g/dl)	8,2	3,2	3,0	11,5	0,01
	VGM (fl.)	55,3	15,1	42,9	90,0	0,498
	CHGM (%)	31,7	4,3	24,8	36,5	0,347
	LG (/mm ³)	6150	3311	3500	12300	0,011
	Plaquetometria (/mm ³)	126400	94611	19000	240000	0,025
	PPT [†] (g/dl)	6,9	1,3	4,8	8,5	0,180
Grupo de Referência (FIV/FeLV-negativos)	VG (%)	35,4	8,5	10,0	53,0	
	Hematimetria (x10 ⁶ /mm ³)	7,1	2,0	1,5	11,0	
	Hb (g/dl)	11,6	3,0	3,3	18,0	
	VGM (fl.)	50,1	6,2	40,0	74,3	
	CHGM (%)	32,7	2,2	24,1	40,0	
	LG (/mm ³)	11479	9119	3200	65000	
	Plaquetometria (/mm ³)	249236	114886	26000	508000	
	PPT [†] (g/dl)	7,6	1,1	4,6	11,6	

*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

[†]Proteínas plasmáticas totais

Os retrovírus aqui estudados são notoriamente causadores de diversas alterações clínico-patológicas (SHELTON; LINENBERGER, 1995; JORDAN, 2000), que podem variar de forma acentuada, ou mesmo se manterem dentro dos intervalos de referência considerados normais (SHELTON; LINENBERGER, 1995; LEVY, 2000; BARR; PHILIPS, 2000). Apesar de diversos valores laboratoriais no presente trabalho terem apresentado diferença estatística significativa, a média dos mesmos permaneceu dentro dos intervalos de referência utilizados. Desta forma, uma análise categórica das alterações hematológicas encontradas foi realizada dentro de cada grupo de animais, também em comparação ao grupo de gatos negativos para ambas as retrovíroses.

Apesar do VG não ter se apresentado abaixo dos valores referenciais em nenhum dos grupos estudados, a anemia é, talvez, a alteração hematológica mais freqüente em animais com FIV e/ou FeLV (COTTER, 1979; REINACHER, 1989; TASKER, 2005a; 2005b). Este

fato pode ser comprovado através da categorização dos dados, que mostrou uma diferença significativa relativa à presença de anemia nos animais positivos para pelo menos um dos retrovírus testados (OR=5,8; $p<0,001$), FIV-positivos (OR=4,9; $p=0,012$) e FeLV-positivos (OR=3,94; $p<0,001$). Esperava-se encontrar uma diferença significativa ao se categorizar os dados dos animais duplamente infectados por FIV e FeLV após compará-los com o grupo de referência. Entretanto, essa diferença não foi comprovada ($p=0,163$). Sugere-se que uma amostragem maior de animais duplamente infectados por FIV e FeLV torna-se necessária para uma análise mais profunda.

Por meio da categorização dos resultados observou-se que animais infectados com pelo menos um retrovírus ou FIV estariam mais propensos a desenvolver trombocitopenia (OR=2,83; $p=0,007$ e OR=3,8; $p=0,015$ respectivamente) por causas diversas, conforme previamente colocadas. Apesar da plaquetometria dos animais FeLV-positivos ter se apresentado significativamente mais reduzida que a dos animais de referência, não foi encontrada diferença estatística significativa entre o grupo testado e o referencial ao se proceder a análise categórica dos dados ($p=0,097$). Embora animais duplamente infectados tenham apresentado uma contagem de plaquetas reduzida em comparação ao grupo referencial, não foi encontrada significância estatística após categorização dos dados. O grupo de animais duplamente positivos para FIV e FeLV contou apenas com oito animais, fato que pode ter sido responsável pela não observância de significância estatística neste caso. Mais animais duplamente infectados seriam necessários para afirmar, de forma conclusiva, que essa falta de associação entre a dupla infecção e trombocitopenia seria um achado relevante.

Ao se categorizarem os dados relativos às contagens globais de células brancas, animais positivos para pelo menos um dos retrovírus testados (OR=3,7; $p=0,003$), FIV (OR=4,31; $p=0,021$) e duplamente infectados por FIV e FeLV (OR=8,63; $p=0,012$) mostraram-se mais propensos a desenvolverem um quadro de leucopenia. Tal alteração já foi descrita em animais FIV-positivos (SHELTON et al., 1991; SELLON; HARTMANN, 2006). Metade dos animais duplamente infectados (FIV e FeLV) estava leucopênica, fato que não surpreende, pois conforme colocado anteriormente, infecções múltiplas podem levar a uma exacerbação das alterações clínico-patológicas (SHELTON et al., 1990b). Este fato também explicaria a leucometria global reduzida (embora dentro dos valores de referência) no grupo de animais duplamente infectados.

As relações completas das alterações hematológicas categorizadas, cujas respostas são dicotômicas, comparadas ao grupo de referência, bem como o OR e IC a 95% envolvendo animais testados positivos para pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV), FIV, FeLV e ambos FIV e FeLV, estão descritas nas Tabelas 13 a 16.

Tabela 13: Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença de pelo menos um retrovírus (FIV e/ou FeLV) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

ALTERAÇÃO HEMATOLÓGICA	Condição retroviral n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Anemia						
Sim	23 (32,9)	6 (7,8)	147	5,8	[2,2 – 15,3]	<0,001
Não	47 (67,1)	71 (92,2)				
Trombocitopenia						
Sim	34 (61,8)	20 (36,4)	110	2,83	[1,31 – 6,14]	0,007
Não	21 (38,2)	35 (63,3)				
Leucopenia						
Sim	21 (30,0)	8 (10,4)	147	3,7	[1,5 – 9,03]	0,003
Não	49 (70,0)	69 (89,6)				
Leucocitose						
Sim	7 (10,0)	8 (10,4)	147	0,96	[0,33 – 2,8]	0,938
Não	63 (90,0)	69 (89,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

Tabela 14: Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença do vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

ALTERAÇÃO HEMATOLÓGICA	Condição retroviral (FIV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Anemia						
Sim	7 (29,2)	6 (7,8)	101	4,9	[1,45 – 16,4]	0,012*
Não	17 (70,8)	71 (92,2)				
Trombocitopenia						
Sim	13 (68,4)	20 (36,4)	74	3,8	[1,25 – 11,53]	0,015
Não	6 (31,6)	35 (63,3)				
Leucopenia						
Sim	8 (33,3)	8 (10,4)	101	4,31	[1,41 – 13,23]	0,021*
Não	16 (66,7)	69 (89,6)				
Leucocitose						
Sim	4 (16,7)	8 (10,4)	101	1,73	[0,47 – 6,33]	0,472*
Não	20 (83,3)	69 (89,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

Tabela 15: Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença do vírus da leucemia felina (FeLV) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

ALTERAÇÃO HEMATOLÓGICA	Condição retroviral (FeLV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Anemia						
Sim	14 (36,8)	6 (7,8)	115	6,9	[2,39 – 19,97]	<0,001
Não	24 (63,2)	71 (92,2)				
Trombocitopenia						
Sim	17 (54,8)	20 (36,4)	86	2,13	[0,87 – 5,20]	0,097
Não	14 (45,2)	35 (63,3)				
Leucopenia						
Sim	9 (23,7)	8 (10,4)	115	2,68	[0,94 – 7,62]	0,066
Não	29 (76,3)	69 (89,6)				
Leucocitose						
Sim	3 (7,9)	8 (10,4)	115	0,74	[0,19 – 2,96]	>0,999
Não	35 (92,1)	69 (89,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

Tabela 16: Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença de dupla infecção pelos vírus da imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os vírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

ALTERAÇÃO HEMATOLÓGICA	Condição retroviral (FIV e FeLV) n (%)		n	'OR' [†]	IC (95%) [‡]	p-valor*
	Positivos	Negativos				
Anemia						
Sim	2 (25,0)	6 (7,8)	85	3,94	[0,65 – 23,96]	0,163
Não	6 (75,0)	71 (92,2)				
Trombocitopenia						
Sim	4 (80,0)	20 (36,4)	60	7,0	[0,73 – 67,02]	0,147
Não	1 (20,0)	35 (63,3)				
Leucopenia						
Sim	4 (50,0)	8 (10,4)	85	8,63	[1,8 – 41,35]	0,012
Não	4 (50,0)	69 (89,6)				
Leucocitose						
Sim	0 (0)	8 (10,4)	85	0,87	[0,83 – 0,98]	>0,999
Não	8 (100,0)	69 (89,6)				

[†] 'Odds ratio';

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

4.6 PCR, Southern Blot e Prevalência dos Hemoplasmas

Foram realizadas PCRs em todas as 149 amostras, seguidas de análise por Southern blot/hibridização (SB). Dezoito (12,1%) das 149 amostras testadas apresentaram resultado positivo por PCR para pelo menos um hemoplasma. Baseado no critério previamente descrito na metodologia do presente estudo, oito amostras (44,4% das amostras PCR-positivas) foram selecionadas para clonagem e posterior sequenciamento. A análise das seqüências obtidas confirmou mais de 99% de identidade tanto para *M. haemofelis* quanto para 'Candidatus *M. haemominutum*' quando comparadas às seqüências previamente publicadas no banco de dados no genbank³⁰. Tais achados corroboram aqueles obtidos por Tasker et al. (2003c), que

³⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Nucleotide&itool=toolbar>

em um estudo filogenético envolvendo diferentes isolados de hemoplasmas provenientes de continentes distintos identificou quase 100% de identidade entre eles.

Houve uma forte associação entre os resultados da PCR e SB. A técnica de SB mostrou que 24/149 amostras apresentaram resultado positivo, confirmando os 18 resultados PCR-positivos e revelando ainda mais seis animais positivos para hemoplasmas ($p < 0,001$) (Tabela 17). Houve aumento de sensibilidade na detecção do agente, quando combinadas as técnicas de PCR e SB, o que havia sido descrito por Guimarães et al. (2007) em estudo envolvendo a ocorrência de hemoplasmas de suínos em granjas do Sul do Brasil.

Tabela 17. Comparação dos resultados obtidos através dos métodos de Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Southern Blot/Hibridização (SB) para a detecção de hemoplasmas ($n=149$) em gatos domésticos em amostras obtidas em uma clínica exclusiva para o atendimento de gatos domésticos na Cidade do Rio de Janeiro, RJ, de fevereiro de 2005 a fevereiro de 2006.

	PCR n (%)		Total n (%)
	Positivos	Negativos	
SB-Positivos n (%)	18 (12,1)	6 (4,0)	24 (16,1)
SB-Negativos n (%)	0 (0)	125 (83,9)	125 (83,9)
Total n (%)	18 (12,1%)	131 (87,9)	149 (100)

$P < 0,001$

Os resultados de PCR (em gel de agarose corado com brometo de etídeo) estão confrontados com os de SB nas Figuras 1 e 2.

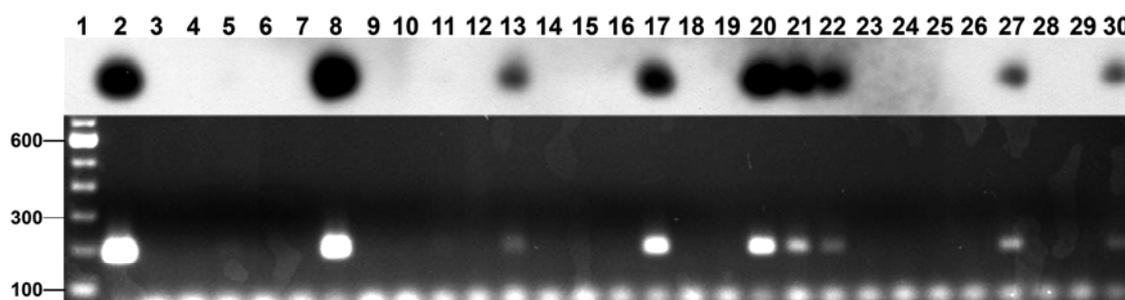


Figura 1. Resultados da PCR (abaixo) e Southern Blot (acima) para a detecção de uma porção do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (191 pb) entre gatos domésticos com um resultado positivo para FIV. (1): Marcador de peso molecular 100pb; (2): Controle positivo de DNA; (3): Controle negativo - água; (4): Controle Negativo – DNA; (5 a 30): Amostras clínicas testadas para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ DNA entre gatos com FIV. A figura mostra que todos os animais testados positivos na PCR, tiveram o resultado confirmado na técnica de SB.

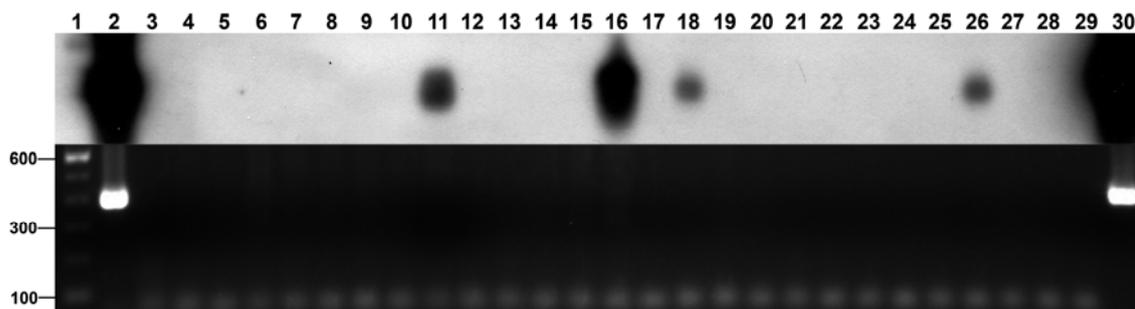


Figura 2. Resultados da PCR (abaixo) e Southern Blot (acima) para a detecção de uma porção do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemofelis* (393 pb) entre gatos domésticos negativos para ambos FIV/FeLV. (1): Marcados de peso molecular 100pb; (2): Controle positivo de DNA; (3): Controle negativo - água; (4): Controle Negativo – DNA; (5 a 29): Amostras clínicas testadas para *M. haemofelis* nos gatos negativos para FIV/FeLV; (30): Amostra clinica com resultado positivo previamente conhecido. A figura mostra uma maior sensibilidade da técnica de SB, pela qual foram detectados resultados positivos adicionais.

Uma vez que o SB foi utilizado para aumentar a detecção de qualquer produto de hemoplasma produzido durante a PCR, e é notório ser uma técnica de maior sensibilidade, toda a análise estatística do presente trabalho foi baseada nos resultados de SB.

Conforme determinado pela amplificação do gene GAPDH, a presença de DNA extraído foi confirmada para todas as 149 amostras (Figura 3). O uso de pares de oligonucleotídeos ou sondas direcionadas a uma seqüência de DNA sabidamente presente em todas as amostras testadas vem se tornando padrão em diversos estudos (AL-SOULD; RADSTRÖM, 2001; BIRKENHEUER et al., 2003; PETERS et al., 2008). Tal procedimento confirma a presença de DNA amplificável na amostra eliminando assim um ponto crítico da identificação molecular de microrganismos, que seria traduzido por problemas durante o processo de extração/purificação do DNA a partir da amostra bruta, no caso do presente trabalho, sangue total.

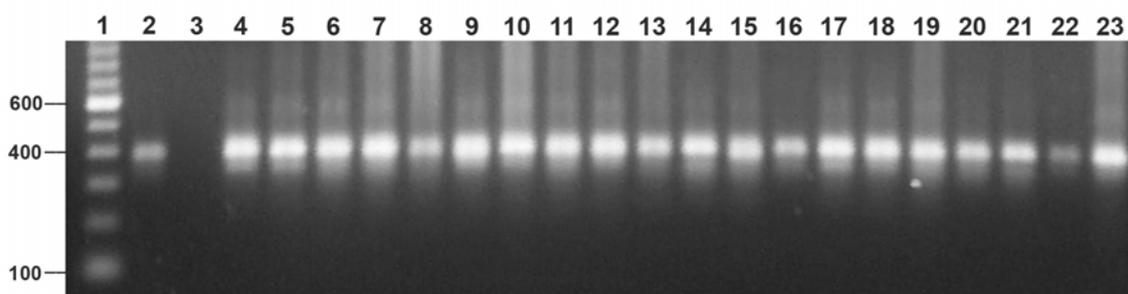


Figura 3. Resultado ilustrativo da PCR direcionada para a detecção de uma porção do gene GAPDH cujo produto possui 399 pb, nas 149 amostras coletadas de gatos domésticos. A análise do gel de agarose corado com brometo de etídeo comprova a presença de DNA amplificável nas amostras utilizadas (1): Marcador de peso molecular 100pb; (2): Controle positivo de DNA; (3): Controle negativo - água; (4 a 23): amostras em estudo, todas positivas para a presença do gene em questão.

A prevalência de DNA de hemoplasmas em gatos FIV-positivos foi de 36% (9/25), principalmente devido a presença do DNA de ‘*Candidatus M haemominutum*’ (8/25; 32%). Outro estudo realizado no Brasil com o mesmo protocolo de PCR utilizado no presente

trabalho encontrou infecções por hemoplasmas em 56,7% dos gatos domésticos com anemia (BAUMANN et al., 2006). Os autores encontraram uma maior ocorrência de *M. haemofelis* quando comparada com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (37,8% e 10,8% respectivamente). Uma vez que a população de estudo do presente trabalho não foi definida pela presença de anemia, e também pelo fato de termos utilizado a detecção de DNA de hemoplasmas por SB em complemento à PCR, uma comparação direta se tornou inviável.

Uma baixa prevalência de DNA de hemoplasma foi observada dentre os animais com FeLV (2/39; 5,1%), enquanto que a maior proporção de infecção por hemoplasmas foi encontrada entre gatos duplamente positivos para FIV e FeLV (50%; 4/8). Entre os gatos do grupo de referência, 11,7% foram hemoplasma-positivos. Devido ao baixo número de animais duplamente positivos para os hemoplasmas testados (3/149; 2,0%) e por razões estatísticas, esses animais foram incluídos entre os animais positivos apenas para *M. haemofelis* ou ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Os resultados descritivos completos para estimativas de prevalência e intervalos de confiança a 95% para todos os hemoplasmas testados, *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ entre gatos testados para FIV e FeLV se encontram detalhados na Tabela 18.

Tabela 18. Prevalência e intervalos de confiança (IC) a 95% para infecções por pelo menos um hemoplasma, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *M. haemofelis* por Southern Blot/hibridização (SB+) entre todos os animais testados para os vírus da imunodeficiência (FIV) e leucemia (FeLV) felinas em uma clínica exclusiva no atendimento de gatos domésticos na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil, de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

Hemoplasmas felinos		
Estado retroviral	SB+ (%)	IC 95%*
FIV-positivos (n=25)		
Hemoplasma [†]	9/25 (36,0)	[18,0 - 57,5]
<i>Mhm</i> [†]	8/25 (32,0)	[15,0 - 53,5]
<i>Mhf</i> [‡]	1/25 (4,0)	[0,1 - 20,4]
FIV e FeLV-positivos (n=8)		
Hemoplasma [†]	4/8 (50,0)	[15,7 - 84,3]
<i>Mhm</i> [†]	4/8 (50,0)	[15,7 - 84,3]
<i>Mhf</i> [‡]	1/8 (12,5)	[0,3 - 52,7]
FeLV-positivos (n=39)		
Hemoplasma [†]	2/39 (5,1)	[0,6 - 17,3]
<i>Mhm</i> [†]	2/39 (5,1)	[0,6 - 17,3]
<i>Mhf</i> [‡]	1/39 (2,6)	[0,1 - 13,5]
FIV e FeLV-negativos (n=77)		
Hemoplasma [†]	9/77 (11,7)	[5,5 - 21,0]
<i>Mhm</i> [†]	4/77 (5,2)	[1,4 - 12,8]
<i>Mhf</i> [‡]	6/77 (7,8)	[2,9 - 16,2]

*Intervalos de confiança a 95% exatos para Proporção Binomial

[†] Positivo para o DNA de pelo menos um hemoplasma, animais duplamente hemoplasma-positivos contados apenas uma vez;

[†] ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’;

[‡] *Mycoplasma haemofelis*.

No presente trabalho, a análise do esfregaço sanguíneo se mostrou uma técnica pouco sensível e específica, quando comparada às moleculares. Apenas um dentre todos os animais positivos para PCR (1/18, 5,5%) e SB (1/24; 4,2%) apresentou resultado certamente positivo

(Figura 4) para *M. haemofelis* através desta técnica ($p < 0,001$; Teste exato de Fisher), posteriormente confirmado por PCR e SB. Outros animais foram classificados como suspeitos após a avaliação do esfregaço, entretanto o resultado não se confirmou quando utilizadas técnicas moleculares de diagnóstico.

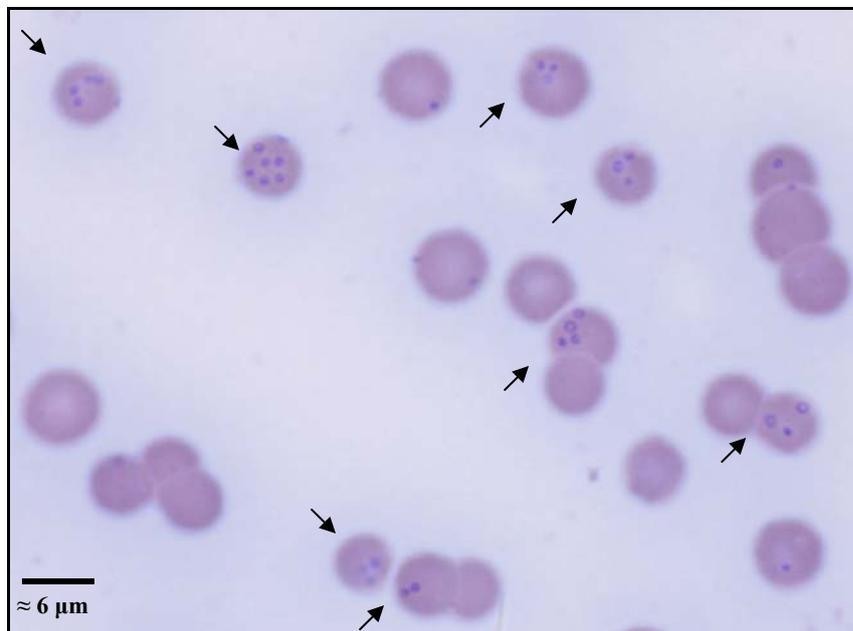


Figura 4. Esfregaço sangüíneo considerado positivo para *Hemoplasma* mediante a avaliação. Este resultado foi confirmado por técnicas moleculares, que detectaram o DNA de *M. haemofelis* na amostra. Coloração: Wright. 1200X.

As desvantagens do uso da avaliação do esfregaço sangüíneo para se estabelecer o diagnóstico de infecções por hemoplasmas são bem documentadas. Resultados falso-positivos podem ocorrer devido à precipitação de corante na lâmina, artefatos relacionados com o processo de secagem, ponteados basofílicos, inclusões siderocíticas e infecção por *Cytauxzoon felis*. Resultados falso-negativos podem ocorrer devido à parasitemia transitória, falha na observação do parasito durante a avaliação do esfregaço sangüíneo e ainda um excesso de exposição ao EDTA após a coleta (HARVEY; GASKIN, 1977; ALLEMAN et al., 1999; MESSICK, 2003; HARVEY, 2006). Estes fatores provavelmente levaram ao pequeno número de resultados positivos (apenas um) para hemoplasmas no presente estudo quando avaliados apenas esfregaços sangüíneos. Tal fato mostra que o uso de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas, como utilizado neste trabalho, é imperativo.

4.6.1 Fatores associados à infecção por hemoplasmas

No presente estudo, não foi encontrada diferença significativa na idade dos animais positivos e negativos para hemoplasmas, corroborando os resultados obtidos por Harvey (2006), os quais apontaram que essas infecções ocorrem comumente em gatos de todas as idades. A quase observância de significância estatística provavelmente se deveu a um maior número de animais positivos para hemoplasmas dentre os gatos testados FIV-positivos, grupo este com a idade mais avançada. Os resultados das análises estatísticas da idade dos animais em relação à presença de infecções por hemoplasmas estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19. Idade dos animais testados para a presença do DNA de hemoplasmas (*Mycoplasma haemofelis* e/ou ‘*Candidatus* M. haemominutum’), comparada com gatos testados negativos para ambos os parasitos, no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

Hemoplasma	Idade (anos)				p-valor*
	Média	Desvio Padrão	Mínima	Máxima	
Positivo	5,90	3,50	0,2	12,0	0,051
Negativo	4,34	3,55	0,2	14,0	GR**

*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

**Grupo referencial.

Os possíveis fatores e achados clínicos associados às infecções por *M. haemofelis* e/ou ‘*Candidatus* M. haemominutum’ foram analisados estatisticamente ao se compararem os animais positivos para pelo menos um dos hemoplasmas citados (n=24) com aqueles negativos para ambos os parasitos (n=125). A relação completa dos fatores e achados clínicos analisados cujas respostas são categóricas, bem como o OR e IC a 95% envolvendo animais testados positivos e negativos para a presença de DNA de hemoplasmas felinos está descrita na Tabela 20.

Tabela 20. Fatores/achados clínicos relacionados aos animais testados positivos para a presença de DNA de pelo menos um hemoplasma, ‘odds ratio’ (OR), intervalo de confiança (IC) a 95% e p-valores, comparados aos animais cuja presença do referido DNA não foi observada.

FATORES/ACHADOS CLÍNICOS	Hemoplasmas - n (%)		n	OR [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos (n=24)	Negativos (n=125)				
Condição retroviral (ELISA)						
FIV – Positivo	9 (37,5)	16 (12,8)	149	NA [†]	NA [†]	< 0,001
FeLV – Positivo	2 (8,3)	37 (29,6)		NA [†]	NA [†]	
FIV/FeLV – Positivo	4 (16,7)	4 (3,2)		NA [†]	NA [†]	
FIV/FeLV – Negativo	9 (37,5)	68 (54,4)		NA [†]	NA [†]	
Sexo						
Macho	16 (66,7)	72 (58,1)	148	1,44	[0,58 – 3,68]	0,428
Fêmea	8 (33,3)	52 (41,9)				
Condição reprodutiva						
Castrado	16 (76,92)	82 (71,3)	136	1,30	[0,44 – 3,80]	0,642
Não-castrado	5 (23,8)	33 (28,7)				
Raça						
Definida	6 (27,3)	26 (21,8)	141	1,34	[0,47 – 3,80]	0,585
Indefinida	16 (72,7)	93 (78,2)				
Histórico de brigas/mordidas						
Sim	11 (55,0)	21 (21,2)	119	4,54	[1,70 – 12,40]	0,003
Não	9 (45,0)	78 (78,8)				
Transusão de sangue						
Sim	2 (9,1)	4 (3,7)	129	2,58	[0,44 – 15,02]	0,271*
Não	20 (90,9)	103 (96,3)				
Presença de pulgas						
Sim	6 (25,0)	32 (28,6)	136	0,83	[0,30 – 2,30]	0,721
Não	18 (75,0)	80 (71,4)				
Acesso ao ambiente externo						
Sim	14 (63,6)	30 (27,0)	133	4,73	[1,80 – 12,40]	0,001
Não	8 (36,4)	81 (73,0)				
Viver com outros gatos						
Sim	22 (100,0)	87 (83,7)	126	NA [†]	NA [†]	0,008
Não	0 (0)	17 (16,3)				
Histórico de vacinação						
Sim	12 (57,1)	67 (68,4)	119	0,62	[0,24 – 1,62]	0,330
Não	9 (42,9)	31 (31,6)				
Anorexia						
Sim	12 (50,0)	51 (44,0)	140	1,28	[0,53 – 3,07]	0,589
Não	12 (50,0)	65 (56,0)				
Letargia/Depressão						
Sim	9 (37,5)	50 (42,7)	141	0,80	[0,33 – 1,99]	0,634
Não	15 (62,5)	67 (57,3)				
Mucosas pálidas						
Sim	9 (37,5)	20 (17,1)	141	2,91	[1,12 – 7,57]	0,033
Não	15 (62,5)	97 (82,9)				
Icterícia						
Sim	3 (13,0)	11 (9,2)	143	1,49	[0,38 – 5,81]	0,700
Não	20 (87,0)	109 (90,8)				
Taquicardia						
Sim	1 (4,2)	5 (4,2)	142	0,98	[0,11 – 8,81]	0,987
Não	23 (95,8)	113 (95,8)				
Taquipnéia						
Sim	2 (8,3)	13 (91,7)	143	0,74	[0,16 – 3,52]	0,698
Não	22 (10,9)	106 (89,1)				
Febre (T ≥ 39,2°C)						
Sim	3 (12,5)	20 (17,7)	137	0,66	[0,18 – 2,44]	0,524
Não	21 (87,5)	93 (82,3)				

[†] ‘Odds ratio’;

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

[†]NA – Não aplicável

No presente estudo, poucos dos fatores analisados foram significativos, ao se compararem coortes de animais positivos e negativos para a presença de DNA de pelo menos um dos hemoplasmas testados. Entretanto, houve uma associação significativa ao se analisar a positividade para retrovírus entre os animais hemoplasma-positivos ($p < 0,001$). Esses achados corroboram os achados de diversos autores, que também encontraram tal associação (NASH; BOBADE, 1986; GRINDEM et al., 1990; HAGIWARA et al., 1997; INOKUMA et al., 2004; LURIA et al., 2004; SYKES et al., 2007a). O fato de infecções por retrovírus poderem predispor o animal a infecções por hemoplasmas já foi sugerido na literatura (GEORGE et al., 2002). Entretanto, uma vez que o presente trabalho se trata de um estudo transversal, onde as amostras foram coletadas de uma população não-controlada, é impossível atribuir uma relação de causalidade entre a presença de retrovírus e infecções por hemoplasmas, sendo apenas possível indicar a existência de uma associação.

A infecção por hemoplasmas se mostrou associada aos animais com histórico de brigas/mordidas ($OR=4,54$; $p=0,003$). DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' já foi encontrado na saliva e em glândulas salivares de gatos (DEAN et al., 2005). Ainda, Willi et al. (2007b) identificaram DNA de '*Candidatus M. turicensis*' na saliva e fezes de animais experimentalmente infectados. Esses achados justificariam um maior número de animais positivos para algum hemoplasma em decorrência de brigas. A mesma explicação poderia ser dada para uma maior ocorrência de infecções por hemoplasmas em gatos que vivem com outros de sua espécie ($p=0,005$). Isto porque uma densidade populacional elevada poderia levar ao estresse dos animais e conseqüentes brigas. Apesar de pulgas não estarem associadas às infecções por hemoplasmas no presente estudo, estas são apontadas como o principal vetor artrópode na transmissão de hemoplasmas (HARVEY, 2006), estando associadas à presença destes conforme previamente descrito por diversos autores (NASH; BOBADE; 1986; HACKETT et al., 2006). Uma maior proximidade entre os animais, provocada pela coabitação, torna favorável a transmissão de hemoplasmas através de vetores e pode explicar este achado. A presença de significância estatística nesses dois fatores poderia gerar confundimento, uma vez que gatos que coabitam com outros estariam, obviamente, mais propícios às brigas. Uma análise estratificada dos dados, comparando os fatores 'histórico de brigas/mordidas' com 'viver com outros gatos' envolvendo apenas animais hemoplasma-positivos poderia ser feita para verificar a presença ou não desse problema. Entretanto, todos os animais hemoplasma-positivos coabitavam com outros gatos, o que impediu a realização do teste estatístico para verificar associação.

Ter acesso ao ambiente externo também se constituiu em um fator associado às infecções por hemoplasmas no presente estudo ($OR=4,73$; $p=0,001$), estando este achado de acordo com diversos autores (GRINDEM et al., 1990; INOKUMA et al., 2004; WILLI et al., 2006b; HACKETT et al., 2006; SYKES et al., 2007a). Animais não confinados tendem a se envolverem em disputas territoriais e por acasalamento, o que eleva o risco de exposição ao agente patogênico, que, conforme previamente colocado, poderia ser transmitido pela saliva e vetores. Com o intuito de afastar qualquer confundimento, uma análise estratificada, envolvendo animais positivos para hemoplasmas com acesso ao ambiente externo e também com histórico de brigas/mordidas foi realizada, não sendo encontrada associação entre esses fatores ($p=0,362$; Teste exato de Fisher).

Uma abordagem estatística através de análise multivariada seria de grande valor para esclarecer a presença ou não de prováveis fatores de confundimento e deve ser pensada para estudos futuros, que envolvam análise de fatores associados a alguma infecção.

A avaliação da coloração de mucosas em gatos pode ser bastante difícil. No presente trabalho, a presença de mucosas pálidas em animais com retrovírus era facilmente justificável pela ocorrência de anemia. Entretanto, ao se utilizarem coortes de animais

infectados ou não com hemoplasmas, a anemia não mostrou associação com a presença dos parasitos, mesmo na presença de mucosas hipocoradas. Uma vez que gatos possuem valores de referência menores que outras espécies para a atribuição de anemia, e dada a subjetividade da avaliação, este achado parece não apresentar importância clínica no presente estudo.

Alguns parâmetros laboratoriais também foram avaliados ao se comparar coortes de animais positivos e negativos para a presença de infecções por hemoplasmas (independentemente da condição retroviral). Uma relação completa dos parâmetros e respectivas comparações estatísticas está descrita na Tabela 21.

Tabela 21. Parâmetros laboratoriais mensurados no presente estudo, de acordo com a presença de DNA de pelo menos um hemoplasma (*Mycoplasma haemofelis* e/ou ‘*Candidatus* M. haemominutum’) e comparação destes com um grupo de referencial, composto de animais negativos para a presença do DNA desses parasitos. Animais testados no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

Hemoplasma	Parâmetro laboratorial	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p-valor*
Positivo	VG (%)	29,4	11,04	11	46	0,203
	Hematimetria (x10 ⁶ /mm ³)	5,56	2,61	0,84	9,5	0,178
	Hb (g/dl)	9,6	3,70	2,5	15,0	0,268
	VGM (fl.)	58,65	19,75	40,0	131,0	0,293
	CHGM (%)	32,43	2,70	22,7	37,1	0,420
	LG (/mm ³)	10013	6682	2400	31600	0,990
	Plaquetometria (/mm ³)	227611	126764	40000	519000	0,843
	PPT (g/dl)	8,35	1,58	6,40	12,40	0,007
Negativo	VG (%)	32,45	10,05	4	53	
	Hematimetria (x10 ⁶ /mm ³)	6,35	2,28	0,8	11,0	
	Hb (g/dl)	10,50	3,48	1,2	18,0	
	VGM (fl.)	53,26	9,96	39,2	39,2	
	CHGM (%)	32,13	2,51	24,1	40,0	
	LG (/mm ³)	10876	8763	1200	65000	
	Plaquetometria (/mm ³)	216250	120991	8000	620000	
	PPT (g/dl)	7,35	1,14	4,60	11,60	
						Grupo de Referência

*P-valores comparados ao grupo de referência através do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

De todos os parâmetros laboratoriais analisados, apenas a concentração de PPT se apresentou elevada. Tal achado não é consistente com a infecção por hemoplasmas, e ocorreu provavelmente pelo fato da maioria dos animais hemoplasma-positivos estarem no grupo de gatos também positivos para o FIV, onde o valor médio deste parâmetro se mostrou elevado, embora sem significância estatística. Animais com FIV podem apresentar um aumento na concentração de PPT em virtude da hipergamaglobulinemia (LEVY, 2000).

Da mesma forma que foi realizado entre os animais positivos e negativos para retrovírus, uma análise categórica das alterações hematológicas encontradas foi efetuada dentro de cada coorte de animais (hemoplasmas positivos x negativos), conforme apresentado da Tabela 22.

Tabela 22. Alterações hematológicas categorizadas dos animais cuja associação com a presença de DNA de pelo menos um hemoplasma (*Mycoplasma haemofelis* e/ou ‘*Candidatus* M. haemominutum’) foi testada estatisticamente, comparadas com gatos testados negativos para ambos os parasitos, no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

PARÂMETRO HEMATOLÓGICO	Condição Hemoplasma n (%)		n	‘OR’ [†]	IC (95%) [‡]	p-valor
	Positivos	Negativos				
Anemia						
Sim	8 (33,3)	21 (17,1)	147	2,43	[0,92 – 6,4]	0,09*
Não	16 (66,7)	102 (82,9)				
Trombocitopenia						
Sim	9 (50,0)	45 (48,9)	110	1,04	[0,38 – 2,87]	0,933
Não	9 (50,0)	47 (51,1)				
Leucopenia						
Sim	6 (25,0)	23 (18,7)	147	1,45	[0,59 – 4,06]	0,575*
Não	18 (75,0)	100 (81,3)				
Leucocitose						
Sim	2 (8,3)	13 (10,6)	147	0,77	[0,16 – 3,65]	>0,999
Não	22 (91,7)	110 (89,4)				

[†] ‘Odds ratio’;

[‡] Intervalos de confiança a 95%;

*Teste exato de Fisher;

A anemia é um achado comum em animais infectados por hemoplasmas, principalmente *M. haemofelis* (HARVEY, 2006). Entretanto o presente trabalho não conseguiu demonstrar essa associação. Diversos estudos indicam que a anemia, ou VG reduzido, seriam fatores associados para infecções por hemoplasmas em gatos domésticos (GRINDEM et al., 1990; JENSEN et al., 2001; HARRUS et al., 2002; TASKER et al., 2003a; KEWISH et al., 2004). No presente trabalho, tanto analisando a presença/ausência de anemia (variável dicotômica), quanto o VG (variável contínua), não houve relação entre a presença de infecção por hemoplasmas. Esses achados foram de certa forma surpreendentes, mas corroboram um estudo realizado na Suíça, que também não encontrou tal relação (WILLI et al., 2006b). Apesar de proporcionalmente animais positivos para hemoplasmas apresentarem mais anemia do que os negativos, a falta de associação estatística pode ser explicada pela metodologia utilizada para a seleção das amostras neste trabalho. Grande parte dos animais negativos para hemoplasmas teve resultado positivo para a presença de FIV e/ou FeLV (conhecidos por causarem anemia), o que reduziu o VG médio deste grupo, além de aumentar a quantidade de animais anêmicos, aproximando os valores do VG dos grupos estudados. Apesar dos outros parâmetros hematológicos estarem expostos aos mesmos vieses previamente descritos, alterações nas contagens de plaquetas e leucócitos não são achados consistentes com infecções por hemoplasmas (SYKES, 2003; HARVEY, 2006). É importante salientar que o presente estudo avaliou a presença de anemia nos grupos tendo como resultado a presença ou ausência de infecção por hemoplasmas. Ainda no estudo de Willi et al. (2006b), a anemia foi encontrada quando animais duplamente infectados por hemoplasmas ou infectados por retrovírus e hemoplasmas concorrentemente foram avaliados. Entretanto, não houve diferença significativa no que concerne ao estado de infecções por hemoplasmas em animais com ou sem retrovírus. Os mesmos autores previamente mencionados sugeriram que o progresso da doença retroviral seria necessário para a manifestação da anemia induzida por hemoplasmas, o que é uma explicação plausível. A maioria dos animais infectados por hemoplasmas no presente estudo, apresentaram DNA apenas de ‘*Candidatus* M. haemominutum’ em seu sangue. Apesar de tal hemoplasma já ter sido apontado como causador primário de anemia (REYNOLDS; LAPPIN, 2007), o mesmo é na maioria das vezes

descrito como causador de infecções brandas e até mesmo inaparentes (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001; GEORGE et al., 2002; HARVEY, 2006). Entretanto, é possível supor que diferenças na relação parasito-hospedeiro causadas por condições geográficas/sazonais nesses estudos, bem como o estágio de infecção, poderiam ser explicações possíveis para a falha em identificar a anemia como um fator associado a infecções por hemoplasmas.

4.7 Fatores Associados à Infecção por Hemoplasmas em Gatos com FIV e/ou FeLV

Resultados significativos foram encontrados quando comparados os grupos de animais FIV-positivos e ainda FIV/FeLV-positivos com o grupo de referência, em respeito à presença de pelo menos um hemoplasma e ainda infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Gatos com resultado positivo para FIV apresentavam maior risco de estarem infectados por hemoplasmas (OR=4,25; p=0,009) e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (OR=8,59; p=0,001) do que animais negativos para ambos os retrovírus. Adicionalmente, gatos positivos para ambos FIV e FeLV também estavam em maior risco de serem infectados por hemoplasmas (OR=7,56; p=0,014) e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (OR=18,25; p=0,001) do que animais sem nenhum retrovírus. Gatos FeLV-positivos não mostraram aumento de risco para infecções por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ quando comparados ao grupo de referência (p>0,05). Não foi achada associação significativa ou aumento de risco em respeito à infecção por *M. haemofelis* em nenhum dos grupos de estudo quando comparados ao grupo de referência (p>0,05). As razões de chance ou OR para infecções por hemoplasmas associado com a presença de um resultado preexistente de ELISA para FIV e/ou FeLV e os intervalos de confiança a 95%, comparado com o grupo de referência (estado negativo para FIV e FeLV) pode ser visualizado na Tabela 23.

Tabela 23: Risco (‘odds ratio’ - OR) de infecções por hemoplasmas (resultado) e intervalos de confiança (IC) a 95% associados com a presença de um estado previamente positivo por ELISA para o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV), comparado com gatos testados negativos para ambos os retrovírus (grupo de referência), no período de fevereiro/2005 a fevereiro/2006.

Resultado	Exposição (versus gatos de referência)	‘OR’	IC a 95%*	p-valor
Hemoplasma	FIV	4,25	[1,45 - 12,66]	0,009
	FeLV	0,41	[0,06 - 1,69]	0,232
	FIV/FeLV	7,56	[1,55 - 37,56]	0,014
<i>Mhm</i> [†]	FIV	8,59	[2,42 - 35,39]	0,001
	FeLV	0,99	[0,13 - 5,30]	0,988
	FIV/FeLV	18,25	[3,32 - 110,85]	0,001
<i>Mhf</i> [‡]	FIV	0,496	[0,01 - 4,42]**	0,902**
	FeLV	0,314	[0,01 - 2,74]**	0,500**
	FIV/FeLV	1,678	[0,03 - 17,49]**	>0,999**

[†]‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’.

[‡]*Mycoplasma haemofelis*.

*Intervalos de confiança do perfil de verossimilhança reportados e p-valores obtidos a partir de testes de proporções de verossimilhança.

**p-valores e intervalos de confiança reportados a partir de teste exato devido ao tamanho reduzido da amostra.

O presente trabalho corrobora, em parte, os achados de Luria et al. (2004), que sugerem que gatos portadores de FIV estariam mais propícios a apresentarem uma infecção por '*Candidatus M. haemominutum*'. Os resultados obtidos pelos autores citados foram baseados em PCR, o que poderia explicar essa similaridade. Entretanto, a presença de anticorpos para FIV também estava associada com a presença de *M. haemofelis*. Em contraste, no presente estudo não foi encontrada nenhuma relação entre o estado para FIV e/ou FeLV e infecções por este hemoplasma, e nem associação entre um estado FeLV-positivo com a presença de DNA de '*Candidatus M. haemominutum*'. A população utilizada no presente estudo se constituiu de gatos domésticos, e não de animais errantes, o que poderia explicar essas diferenças. Um estudo prévio realizado no Brasil não foi capaz de estabelecer uma relação entre infecção por hemoplasmas e retrovírus (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2004). Entretanto, a população de animais testados e o método usado para a detecção da infecção por hemoplasmas foram diferentes. A população amostrada no estudo de Mendes-de-Almeida (2004) se constituiu de animais errantes, enquanto a do presente estudo foi selecionada a partir de atendimentos clínicos de animais com indicação para o teste de identificação de retrovírus. Apesar de nenhum desses gatos errantes ter apresentado infecção por FeLV, anticorpos para FIV foram detectados em 21%, e infecções por hemoplasmas foram apontadas em 38% dos animais testados. Esses achados foram baseados em avaliação do esfregaço sanguíneo sob microscopia óptica de imersão, corado por técnica de Romanowsky, embora esta metodologia apresente sensibilidade e especificidade bem reduzidas quando comparadas às técnicas moleculares. Diversos autores também sugeriram uma associação significativa entre infecções por FeLV e hemoplasmas por meio de avaliação do esfregaço sanguíneo como forma de diagnóstico para infecção pelo parasito (GRINDEM et al., 1990; NASH; BOBADE, 1986; BOBADE et al., 1988; HARRUS et al., 2002).

A raça foi o único dos fatores associados que pareceu contribuir com uma infecção por hemoplasmas entre gatos positivos para retrovírus, quando comparados ao grupo de referência. No modelo de regressão logística prevendo infecções por hemoplasmas de acordo com a raça (definida ou indefinida), estado retroviral (FIV-positivo, FIV/FeLV-negativos), e a interação; o termo interação foi estatisticamente significativo ($p=0,019$). Entre os gatos com raça definida, animais FIV-positivos estavam em maior risco de serem infectados com pelo menos um hemoplasma (OR=45,0; IC 95%=4,6 – 116,8; $p=0,001$). Dentre os animais SRD, um resultado FIV-positivo não estava associado a infecções por hemoplasmas ($p=0,759$). Não foi achada associação quando se avaliou a raça e o resultado (conseqüência) '*Candidatus M. haemominutum*'. Esses achados contrastam com outros estudos, os quais comunicaram que animais SRD estariam em maior risco para uma infecção por hemoplasmas (HAYES; PRIESTES, 1973; TASKER et al., 2004). Uma possibilidade para esses achados é que animais SRD, mesmo aqueles com anticorpos para FIV, seriam mais resistentes às infecções por hemoplasmas. Por outro lado, a criação intensiva de gatos de raça definida, assim como cães criados em canis comerciais, pode levar a um aumento da prevalência de infecções por hemoplasmas nesta população (KEMMING et al., 2004a).

Devido ao número reduzido de resultados/conseqüências positivos para *M. haemofelis*, a análise de fatores associados relacionados com este parasito não pôde ser realizada. Ademais, não havia resultados positivos suficientes para ambos os hemoplasmas para se executar o modelo de regressão logística para fatores associados entre os animais FeLV-positivos.

Recentemente, uma terceira espécie de hemoplasma – '*Candidatus M. turicensis*' – foi descrita por Willi et al. (2005) e encontrada no Brasil entre felinos selvagens da fauna local mantidos em cativeiro (WILLI et al., 2007). Entretanto, no momento da realização deste trabalho, o laboratório não estava equipado para realizar testes que identificassem este parasito.

O uso das técnicas de Western blotting (LUTZ et al., 1988; EGBERINK et al., 1992) e de imunofluorescência direta (HARDY Jr. et al., 1973) como os testes-padrão para se confirmar as infecções por FIV e FeLV respectivamente, é restrito apenas a alguns laboratórios de pesquisa no Brasil. Esses testes são caros e não fornecem um resultado imediato, freqüentemente necessário para a decisão de procedimentos clínicos a serem realizados. Um trabalho recente comparando resultados de ELISA e PCR para a detecção de infecção por retrovírus em gatos, confirmou a confiabilidade deste primeiro teste (ARJONA et al., 2007). Desta forma, os resultados do presente trabalho fornecem uma reflexão precisa das infecções por hemoplasmas em gatos previamente infectados por retrovírus. O constante aumento do número de gatos como animal de companhia e o grande número de doenças infecciosas diagnosticadas entre os animais domésticos no Brasil e outras áreas tropicais fornecerão uma rica fonte de material para estudos subseqüentes.

5 CONCLUSÕES

Mesmo para uma população convenientemente selecionada, a prevalência de infecções por FIV e FeLV é alta. Este fato reflete um caráter endêmico dos vírus na população testada e, provavelmente, na Cidade do Rio de Janeiro.

A presença de infecções por hemoplasmas felinos, por meio de '*Candidatus M. haemominutum*', esteve associada à infecção por FIV e à dupla infecção por FIV e FeLV. Embora não seja viável atribuir uma relação causa-efeito, uma vez que não há conhecimento da seqüência temporal das infecções, existe uma interação entre retrovírus felinos e hemoplasmas.

Um contato estreito é necessário para a transmissão dos hemoplasmas entre os gatos domésticos, assim, em virtude da associação dos mesmos com os retrovírus, um cuidado profilático adicional deve ser tomado na presença de uma das infecções.

Gatos com raça definida e infectados pelo FIV apresentam maior risco de infecção por pelo menos um hemoplasma.

O diagnóstico de hemoplasmas felinos através de técnicas moleculares permite inferir que essas infecções são prevalentes na Cidade do Rio de Janeiro.

A técnica de Southern Blotting, seguida de hibridização com sondas específicas é mais sensível do que a PCR realizada de forma isolada, sendo complementar para o diagnóstico dos hemoplasmas felinos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Antes de generalizar os resultados deste ou de qualquer outro estudo, deve-se considerar as validades externa e interna dos dados obtidos (SUKURA et al., 1992). A validade externa se apresenta de duas formas distintas nos resultados (extrapolação dos mesmos para populações semelhantes à utilizada no estudo ou ainda para outras populações), enquanto a validade interna se refere ao grau em que as conclusões de um estudo são corretas para a amostragem de indivíduos investigados (PEREIRA, 1995). Acredita-se que o presente estudo possua ambas as validades, uma vez que os resultados obtidos são provavelmente extrapoláveis para uma população semelhante (gatos atendidos em clínicas com indicação de teste para FIV/FeLV) e também pelo fato de terem sido tomados diversos cuidados durante a realização do mesmo a fim de evitar erros técnicos que influenciariam a validade interna. Ainda em relação à validade interna, foram observados detalhes inerentes ao estudo, como a comparabilidade dos grupos estudados, precisão da técnica de diagnóstico utilizada e relevância dos fatores empregados, além de um controle de variáveis que poderiam dificultar a interpretação dos dados obtidos. Procurou-se também evitar ao máximo os vieses no presente estudo, uma vez que os mesmos são praticamente inerentes a estudos cuja população é selecionada por conveniência. Assim, houve um delineamento claro para a seleção de participantes (todos os animais testados para FIV/FeLV em uma determinada Clínica durante um período fechado); evitaram-se vieses de aferição através do preparo de uma ficha de entrevistas cujas respostas eram diretas e categóricas, podendo ser aplicadas por diferentes Clínicos sem influência nos resultados; e, mesmo variáveis que poderiam gerar vieses de confundimento, na impossibilidade de serem analisadas através de um modelo multivariado, o foram de forma estratificada entre si para aferir a presença desse tipo de viés.

Os gatos estudados no presente trabalho não constituíram uma amostra representativa da população dos mesmos na Cidade do Rio de Janeiro, e nem da Clínica em questão. Assim, os resultados aqui apresentados provavelmente superestimam tanto a prevalência de infecções por retrovírus em uma população, quanto a de hemoplasmas entre animais com FIV e/ou FeLV. Entretanto, acredita-se que estes representem bem uma população de animais atendidos em clínicas e com indicação para o teste de FIV/FeLV, conforme colocado anteriormente. Desta forma, este trabalho torna-se útil quando observado apenas essa coorte. A população do presente estudo foi convenientemente selecionada entre animais encaminhados a uma clínica veterinária, o que pode consistir em um primeiro fator de confundimento, pois a maioria dos gatos no Brasil não recebe esse tipo de cuidado. Ademais, os gatos foram testados com base em algum motivo clínico, que poderia variar de ‘animal suspeito’ até profilaxia para a introdução de um novo animal no recinto. No presente estudo, a maioria dos animais retrovírus-positivos foi testada por alguma motivação clínica, portanto as chances de se achar retrovíroses, bem como doenças associadas às mesmas seriam mais elevadas.

Apesar de haver diversas razões bem conhecidas pelas quais dados obtidos de clínicas dificilmente constituem uma amostra representativa da população, não há estudos que fizeram uso de uma amostragem aleatória da população geral de gatos. Assim, sem um registro geral de animais e com recursos econômicos escassos para estudos epidemiológicos em animais de companhia, os mesmos precisam utilizar algum tipo de amostragem por conveniência (SUKURA, 1992). No trabalho previamente citado, Sukura et al. (1992) fizeram uma abordagem completa sobre este tipo de amostragem, sendo a consulta do mesmo bem interessante.

Fatores associados à infecção por retrovírus incluem um contato direto entre os animais. Assim, a melhor forma de controle das infecções é testar novos gatos admitidos no recinto e evitar que animais sabidamente positivos tenham contato com outros livres de infecções. Ademais, é provável que com mais animais e, principalmente, mais resultados

positivos para hemoplasmas, as análises encontrassem mais fatores associados às infecções. Isto porque muitos dos achados da literatura não foram corroborados no presente trabalho, como por exemplo, a presença de anemia mais acentuada em animais coinfectados com retrovírus e hemoplasmas.

A falta de parte dos dados relativos a vários animais impossibilitou uma análise multivariada para averiguação dos fatores associados à infecção por retrovírus e também por hemoplasmas na presença destes. Este tipo de análise permite verificar a participação dos prováveis fatores associados à infecção (desfecho) de forma simultânea, eliminando assim possíveis confundimentos comumente presentes em análises estatísticas convencionais. Ademais, um número reduzido de animais apresentou infecções concomitantes por FIV e FeLV, o que gerou dificuldade na interpretação dos resultados obtidos. Um estudo com mais amostras duplamente infectadas por FIV e FeLV poderia elucidar o grau das alterações clínico-laboratoriais encontradas nesses animais, em comparação com gatos infectados por apenas um retrovírus e negativos. Entretanto, o modelo de regressão logística pôde ser aplicado, mesmo que de forma limitada, fato que confere maior força aos resultados aqui apresentados, no que concerne a relação entre as retrovirose felinas e infecções por hemoplasmas.

Durante o curso deste trabalho uma nova espécie de hemoplasma foi identificada em gatos domésticos. Sendo assim, a realização de técnicas moleculares para a detecção desse novo parasito nos animais do presente estudo seria de grande valia para um melhor entendimento das relações entre os próprios hemoplasmas e infecções por FIV e/ou FeLV.

As crescentes prevalências de FIV e FeLV devem ser abordadas com atenção, visto que as medidas profiláticas tomadas se mostram insuficientes. Em conjunto, uma maior predisposição a infecções secundárias e oportunistas coloca o animal como possível vetor e/ou reservatório de zoonoses, o que constitui um problema de saúde pública. Desta forma, é papel do Médico Veterinário, como agente multiplicador de conhecimento e promotor da saúde, o zelar pelo bem-estar de seus pacientes, bem como estar ciente de sua importância como agente promotor de saúde da população como um todo.

É importante salientar que o Clínico deve estar atento aos vários fatores que podem influenciar a habilidade discriminatória geral dos testes, com o intuito de serem evitados erros de diagnóstico. Desta forma, se um teste apresentar baixa sensibilidade, os Clínicos precisam encontrar outras maneiras de descartar ou confirmar um diagnóstico diferencial particular. No caso de baixa especificidade, é crucial que o Médico Veterinário faça relações clínico-patológicas e coloquem toda a informação sobre o caso em debate para assim chegar a uma interpretação final (HILL, 2005). Outrossim, a grande maioria dos clínicos do Brasil não dispõe de acesso às técnicas moleculares de diagnóstico. Em virtude das baixas sensibilidade e especificidade da análise do esfregaço sangüíneo para este fim, é necessário um exame clínico completo do animal, bem como o conhecimento profundo dos sintomas e alterações laboratoriais causadas pelos hemoplasmas, de forma isolada ou associada com os retrovírus felinos. Uma forma de aumentar a eficácia da avaliação do esfregaço como método de diagnóstico, seria a coleta de sangue periférico em mais de um momento durante 24 horas, em virtude dos episódios parasitêmicos cíclicos. Assim, aumentariam as chances de visualização do parasito, e com isso o estabelecimento de um diagnóstico definitivo.

Por fim, é imperativo que estudos epidemiológicos acerca de doenças infecciosas dos animais domésticos do Brasil sejam publicados em periódicos indexados e, portanto, acessíveis. Os pesquisadores devem se conscientizar da importância desses resultados e não se restringir a comunicados em Encontros ou Congressos, visto que os trabalhos ali apresentados jamais serão indexados por bases de dados, tornando o acesso da comunidade científica aos mesmos limitado.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIE, D. D.; DENNIS, J. M.; TOTH, S.; CALLANAN, J. J.; REID, S.; JARRETT, O. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. *The veterinary record*, Londres: British Veterinary Association, v. 146, n. 15, p. 419-424, abr. 2000.
- ADLER, S.; ELLENBOGEN, V. A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. *Journal of comparative pathology and therapeutics*, Edimburgo: University Press, v. 47, p. 220-221, 1934.
- ALLEMAN, A. R.; PATE, M. G.; HARVEY, J. W.; GASKIN, J. M.; BARBET, A. F. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. *Journal of clinical microbiology*, American Society for Microbiology, v. 39, 37. 5, p. 1474-1479, maio 1999.
- AL-SOUD, W. A.; RADSTROM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of clinical microbiology*, American Society for Microbiology, v. 39, n. 2, p. 485-493, fev. 2001.
- ARJONA, A.; BARQUERO, N.; DOMÉNECH, A.; TEJERIZO, G.; COLLADO, V. M.; TOURAL, C.; MARTÍN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 9, n. 1, p. 14-22, fev. 2007.
- BAKER, H. J.; CASSELL, G. H.; LINDSEY, J. R. Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. *The American journal of pathology*, Hagerstown: American Association of Pathologists and Bacteriologists, v. 64, n. 3, p. 625-655, set. 1971.
- BANETH, G.; KASS, P. H.; STEINFELD, D.; BESSER, M. (1999) A seroepidemiological study of feline coronavirus, feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among cats in Israel. *Israel journal of veterinary medicine*, Tel Aviv: Israel Veterinary Medical Association, v. 54, n. 2, p. 39-43, 1999.
- BARR, M. C. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*, Philadelphia: W.B. Saunders, v. 11, n. 3, p. 144-153, ago. 1996.
- BARR, M. M.; PHILLIPS, T. R. FIV and FIV-related disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 2000, cap. 90, p. 433-438.
- BARR, M. C.; POUGH, M. B.; JACOBSON, R. H. SCOTT, F. W. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 199, n. 10, p. 1377-1381, nov. 1991.

BAUMANN, A.; GUIMARAES, A. M. S. SILVA, C. C.; YAMAGUTI, M.; KOZEMJAKIM, D. A.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; TIMENETSKY, J. *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. In: Abstracts of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 41st. Annual Meeting, 2006, Tucson. Veterinary clinical pathology. Davis: American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2006. v. 35. p. 370.

BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI L.; MALVALDI, G.; TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical microbiology reviews*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 8, n. 1, p. 87-112, Jan. 1995.

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*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 59, n. 10, p. 1215-1220, out. 1998.

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

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of clinical microbiology*, American Society for Microbiology, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, set. 2003.

BOBADE, P. A.; NASH, A. S. A comparative study of the efficiency of acridine orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. *Veterinary parasitology*. Amsterdam: Elsevier Science B.V., v. 26, n. 1-2, p. 169-172, dez. 1987.

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

BOYCE, J. T.; KOCIBA, G. J.; JACOBS, R. M.; WEISER, M. G. Feline leukemia virus-induced thrombocytopenia and macrothrombocytosis in cats. *Veterinary pathology*, Washington: American College of Veterinary Pathologists, v. 23, n. 1, p. 16-20, jan. 1986.

BRADDOCK, J. A.; TASKER, S.; MALIK, R. The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in a naturally infected cat. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 6, n. 3, p. 161-165, jun. 2004.

BÜCHELER, J.; GIGER, U. Cold agglutinins in feline haemobartonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 198, n. 5, p. 740, mar. 1991.

BUTT, M. T. Diagnosing erythrocyte parasitic diseases in cats. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, Yardley: Veterinary Learning System, v. 12, n. 5, p. 628-638, maio. 1990.

CLARK, R. *Eperythrozoon felis* (sp. nov.) in a cat. *Journal of South African Veterinary Medical Association*, Pretoria: South African Veterinary Medical Association, v. 13, n. 1, p. 15-16, 1942.

CHOMCZYNSKI, P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical biochemistry*, New York: Academic Press, v. 201, n.1, p. 134-139, 1992.

COTTER, S. M. Anemia associated with feline leukemia virus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 173, n. 11, p. 1191-1194, dez. 1979.

COTTER, S. M.; HARDY, W. D. Jr.; ESSEX, M. Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 166, n. 5, p. 449-454, mar. 1975.

COURCHAMP, F.; PONTIER, D. Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, Paris: Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier, v. 317, n. 12, p. 1123-1134, dez. 1994.

CRAWFORD, P. C.; LEVY, J. K. New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The veterinary clinics of north america. Small animal practice*, Philadelphia: W. B. Saunders, v. 37, n. 2, p. 335-350, mar. 2007.

DEAN, R. S.; HELPS, C.; GRUFFYDD-JONES, T.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasmas-infected cats. In ANNUAL BRITISH SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS, 48., 2005, Birmingham. *Proceedings of the...*, Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association, 2005. p. 554.

DUARTE, M. I.; OLIVEIRA, M. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARIANO, O. N.; TAKAKURA, C. F.; PAGLIARI, C.; CORBETT, C. E. *Haemobartonella*-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. *The Journal of infectious diseases*, Chicago: University of Chicago Press, v. 165, n. 5, p. 976-977, maio, 1992.

EGBERINK, H. F.; KELDERMANS, C. E.; KOOLEN, M. J.; HORZINEK, M. C. Humoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 53, n. 7, p. 1133-1138, jul. 1992.

FLINT, J. C.; MOSS, L. C. Infectious anemia in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 122, n. 910, p. 45-48, jan. 1953.

FLINT, J. C.; ROEPKE, M. H.; JENSEN, R. Feline infectious anemia. I. Clinical aspects. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 19, n. 70, p. 164-168, jan. 1958.

FLINT, J. C.; ROEPKE, M. H.; JENSEN, R. Feline infections anemia. II. Experimental cases. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 20, p. 33-40, jan. 1959.

FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N. C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 59, n. 12, p. 1581-1588, dez. 1998.

FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N. C. 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', a low-virulence epierythrocytic parasite of cats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Stanford: HighWire Press, v. 51, pt. 3, p. 815-817, maio 2001.

FREDRICKS, D. N.; RELMAN, D. A. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clinical infectious diseases*, Chicago: The University of Chicago Press, v. 29, n. 3, p. 475-486, set. 1999.

FUJIHARA, M.; WATANABE, M.; YAMADA, T.; HARASAWA, R. Occurrence of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' Infection in Domestic Cats in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, Tóquio: Japanese Society of Veterinary Science, v. 69, n. 10, p. 1061-1063, out. 2007.

GARDNER, M. B.; LUCIW, P. A. Animal models of AIDS. *The FASEB Journal*. Bethesda: The Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 3, n. 14, p. 2593-2606, dez. 1989.

GARY, A. T.; RICHMOND, H. L.; TASKER, S.; HACKETT, T. B.; LAPPIN, M. R. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in blood of cats used for transfusions. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 8, n. 5, p. 321-326, out. 2006.

GEORGE, J. W.; RIDEOUT, B. A.; GRIFFEY, S. M.; PEDERSEN, N. C. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 63, n. 8, p. 1172-1178, ago. 2002.

GIOVANNONI, S. J.; DeLONG, E. F.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of bacteriology*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 170, n. 2, p. 720-726, fev. 1988.

GÖBEL, U. B. Targeting ribosomal RNA sequences: a universal approach to the detection and identification of microorganisms. In: VAHERI, A.; TILTON, R. C.; BALOWS, A. (Eds.): *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991, p. 27-36.

GÖBEL, U. B.; GEISER, A.; STANBRIDGE, E. J. Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. *Journal of general microbiology*, Reading: Society For General Microbiology, v. 133, n. 7, p. 1969-1974, jul. 1987.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. rRNA probes as tools for molecular epidemiology of microbial infections. In: VAHERI, A.; TILTON, R. C.; BALOWS, A. (Eds.): *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991, p. 47-55.

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

GUIMARÃES, A. M.; BIONDO, A. W.; LARA, A. C.; MESSICK, J. B. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. *The veterinary record*, Londres: British Veterinary Association, v. 160, n. 2, p. 50-53, jan. 2007.

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

GUTELL, R. R.; WEISER, B. WOESE, C. R.; NOLLER, H. F. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, New York: Academic Press, v. 32, p. 155-216, 1985.

HACKETT, T. B.; JENSEN, W. A.; LEHMAN, T. L.; HOHENHAUS, A. E.; CRAWFORD, P. C.; GIGER, U.; LAPPIN, M. R. Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*,' *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 229, n. 5, p. 700-705, set. 2006.

HAEFNER, M.; BURKE, T. J.; KITCHELL, B. E.; LAMONT, L. A.; SCHAEFFER, D. J.; BEHR, M.; MESSICK, J. B. Identification of *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) in captive nondomestic cats. *Journal of zoo and wildlife medicine*, Lawrence: American Association of Zoo Veterinarians, v. 32, n. 2, p. 139-143, jun. 2003.

HAGIWARA, M. K.; JÚNIOR, A. R.; LUCAS, S. R. R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. *Revista brasileira de ciência veterinária*, Niterói: Universidade Federal Fluminense, v. 4, n. 1, p. 35-38, jan.-abr. 1997.

HARBUTT, P. R. A clinical appraisal of feline infectious anemia and its transmission under natural conditions. *Australian veterinary journal*, St. Leonards: Australian Veterinary Association, v. 39, p. 401-404, out. 1963.

HARDY, W. D. Jr. General principles of retrovirus immunodetection tests. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 199, n. 10, p. 1282-1287, nov. 1991.

HARDY, W. D. Jr.; ESSEX, M. FeLV-induced feline acquired immune deficiency syndrome. A model for human AIDS. *Progress in allergy*, Basileia: Karger, v. 37. p. 353-376, 1986.

HARDY, W. D. Jr.; HIRSHAUT, Y.; HESS, P. Detection of the feline leukemia virus and other mammalian oncornaviruses by immunofluorescence. *Bibliotheca haematologica*, Basel: Karger, v. 39, p. 778-799, 1973.

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

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *The veterinary journal*, Londres: Harcourt, v. 155, n. 2, p. 123-137, mar. 1998.

HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C. E. (Ed.): *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Inc, 2006, cap. 13, p. 105-131.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C. E.; VIDYASHANKAR, A. N.; JARRETT, O.; EGBERINK, H. F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 9, n. 6, p. 439-445, dez. 2007.

HARTMANN, K.; WERNER, R. M.; EGBERINK, H.; JARRETT, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *The veterinary record*, Londres: British Veterinary Association, v. 149, n. 11, p. 317-320, set. 2001.

HARVEY, J. W. Hemotropic mycoplasmosis (hemobartonellosis). In: GREENE, C. E. (Ed.): *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Inc, 2006, cap. 31, p. 252-260.

HARVEY, J. W.; GASKIN, J. M. Experimental feline haemobartonellosis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Denver: American Animal Hospital Association, v. 13, n. 1 p. 28-38, jan.-fev., 1977.

HARVEY, J. W.; GASKIN, J. M. Feline Haemobartonellosis: Attempts to induce relapses of clinical disease in chronically infected cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Denver: American Animal Hospital Association, v. 14, p. 453-456, jul-ago. 1978.

HAWKS, D. M.; LEGENDRE, A. M.; ROHRBACH, B. W. Comparison of four test kits for feline leukemia virus antigen. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 199, n. 10, p. 1373-1377, nov. 1991.

HAYES, H. M.; PRIESTER, W. A. Feline infectious anaemia. Risk by age, sex and breed; prior disease; seasonal occurrence; mortality. *The Journal of small animal practice*, Oxford: British Small Animal Veterinary Association - Blackwell Scientific Publications, v. 14, n. 12, p. 797-804, dez. 1973.

HILL, P. Pitfalls in interpreting diagnostic tests. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2005, Orlando. *Proceedings of the..., Small Animal-Miscellaneous*, Gainesville: NAVC Institute, 2005. p. 489-490

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

ISHIDA, T.; TANIGUCHI, A.; MATSUMURA, S.; WASHIZU, T.; TOMODA, I. Long-term clinical observations on feline immunodeficiency virus infected asymptomatic carriers. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam: Elsevier, v. 35, n. 1-2, p. 15-22, dez. 1992.

JACOBSON, R. H. How well do serodiagnostic tests predict the infection or disease status of cats? *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 199, n. 10, p. 1343-1347, nov. 1991.

JARRETT, W. F.; CRAWFORD, E. M.; MARTIN, W. B.; DAVIE, F. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature*, Londres: Nature Publishing Group, v. 202, p. 567-569, maio. 1964.

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

JORDAN, H. Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p. cap. 107, p. 727-732.

KALLICK, C. A.; LEVIN, S.; REDDI, K. T.; LANDAU, W. L. Systemic lupus erythematosus associated with *haemobartonella*-like organisms. *Nature: new biology*, Londres: Macmillan Journals Ltd., v. 236, n. 66, p. 145-146, abr. 1972.

KEMMING, G. I.; MESSICK, J. B.; ENDERS, G.; BOROS, M.; LORENZ, B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSMER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis* infection – a kennel disease? *Comparative medicine*, Memphis: American Association for Laboratory Animal Science, v. 54, n. 4, p. 404-409, ago. 2004a.

KEMMING, G.; MESSICK, 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*, Basileia: Karger AG, v. 36, n. 4, p. 198-205, jul.-ago. 2004b

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

KOCIBA, G. J.; WEISER, M. G.; OLSEN, R. G. Enhanced susceptibility to feline leukemia virus in cats with *Haemobartonella felis* infection. *Leukaemia reviews international* [S.L.]: v. 1, p. 88-89, 1983.

LAPPIN, M. R. Opportunistic infections associated with retroviral infections in cats. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*, Philadelphia: W.B. Saunders, v. 10, n. 4, p. 244-250, nov. 1995.

LAPPIN, M. R.; BRUNT, R.; RILEY, A.; HAWLEY, J. R.; BREWER, M.; JENSEN, W. *Bartonella* spp. and *Mycoplasma haemominutum* DNA in blood of cats and their fleas. 21st American College of Veterinary Medicine Forum Proceedings, Charlotte, NC, June 4-8, 2003. p. 929-930.

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

LEVY, J. K. FeLV and non-neoplastic FeLV-related disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 2000, cap. 89, p. 424-432.

LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; SLATER, M. R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 225, n. 10, p. 1558-1561, nov. 2004.

LEVY, J.; RICHARDS, J.; EDWARDS, D.; ELSTON, T.; HARTMANN, K.; RODAN, I.; THAYER, V.; TOMPKINS, M.; WOLF, A.; AMERICAN ASSOCIATION OF FELINE PRACTITIONERS; ACADEMY OF FELINE MEDICINE ADVISORY PANEL. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 5, n. 1, p. 3-10, fev. 2003.

LEVY, J. K.; SCOTT, H. M.; LACHTARA, J. L.; CRAWFORD, P. C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in north america and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 228, n. 3, p. 371-376, fev. 2006.

LOBETTI, R. G.; TASKER, S. Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *Journal of south african veterinary medical association*, Pretoria: South African Veterinary Medical Association, v. 75, n. 2, p. 94-99, jun. 2004.

LOPEZ, N. A.; JACOBSON, R. H. False-positive reactions associated with anti-mouse activity in serotests for feline leukemia virus antigen. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 195, n. 6, p. 741-746, set. 1989.

LORIMIER, L. P.; MESSICK, J. B. Anemia associated with 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a feline leukemia virus-negative cat with lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Denver: American Animal Hospital Association, v. 40, n. 5, p. 423-427, set.-out. 2004.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 6, n. 5, p. 287-296, out. 2004.

LUTZ, H.; ARNOLD, P.; HÜBSCHER, U.; EGBERINK, H.; PEDERSEN, N.; HORZINEK, M. C. Specificity assessment of feline T-lymphotropic lentivirus serology. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, Berlim: Blackwell Science, v. 35, n. 10, p. 773-778, dez. 1988.

MacWILLIAMS P. S. Erythrocytic rickettsia and protozoa of the dog and cat. *The veterinary clinics of north america. Small animal practice*, Philadelphia: W. B. Saunders, v. 17, n. 6, p. 1443-1461, nov. 1987.

MANUSU, H. P. Feline Infectious Anemia. *Australian veterinary journal*, St. Leonards: Australian Veterinary Association, v. 38, p. 232-234, 1962.

MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. V. Role of the spleen in cats infected with *Haemobartonella felis*. *Nippon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, Tóquio: Japanese Society of Veterinary Science, V. 40, n. 2, p. 141-146, abr. 1978.

MAEDE, Y. Sequestration and phagocytosis of *Haemobartonella felis* in the spleen. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 40, n. 5, p. 691-695, maio 1979.

MAEDE, Y.; HATA, R. Studies on feline haemobartonellosis. II. The mechanism of anemia produced by infection with *Haemobartonella felis*. *Nippon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, Tóquio: Japanese Society of Veterinary Science, V. 37, n. 1, p. 49-54, fev.. 1975.

MAEDE, Y.; MURATA, H. Ultrastructural observation on the removal of *Haemobartonella felis* from erythrocytes in the spleen of a cat. *Nippon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, Tóquio: Japanese Society of Veterinary Science, V. 40, n. 2, p. 203-205, abr. 1978.

MAEDE, Y.; SONODA, M. Studies on feline haemobartonellosis. III. Scanning electron microscopy of *Haemobartonella felis*. *Nippon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, Tóquio: Japanese Society of Veterinary Science, V. 37, n. 2, p. 209-211, abr. 1975.

MASSARD, C. L.; FREIRE, N. M. S.; FLAUSINO, W. Sobre o encontro de *Haemobartonella felis* Flint & Mckelvie, 1955 (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) em *Felis catus domesticus* L. no continente Sul-americano, Brasil. Anais do XC Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, p.161, 1978.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M. C.; BRANCO, A. S.; SERRÃO, M. L.; SOUZA, A. M.; ALMOSNY, N.; CHARME, M.; LABARTHE, N. Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 46, n. 5, p. 269-274, set.-out. 2004.

MESSICK, J. B. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *The veterinary clinics of north america. Small animal practice*, Philadelphia: W. B. Saunders, v. 33, n. 6, p. 1453-1465, nov. 2003.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary clinical pathology*, Davis: American Society for Veterinary Clinical Pathology, v. 33, n. 1, 2004.

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

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 mycoplasmas. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Stanford: HighWire Press, v. 52, pt. 3, p. 693-698, maio 2002.

MONROE, W. E. Anorexia. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 2000, cap. 29, p. 102-104.

MORAIS, H. A.; GUIMARAES, A. M.; VIDOTTO, O.; BAUMANN, A.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in three cats from Brazil. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 9, n.6, p. 518-520, dez. 2007.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, San Diego: Academic Press, v. 155, p. 335-350, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 51. pt. 1, p. 263-273, 1986.

MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E. Taxonomic note: implementation of the provisory status *Candidatus* for incompletely described procariotes. *International journal of systematic bacteriology*, Reading: International Union of Microbiological Societies, v. 45, n. 1, p. 186-187, jan. 1995.

NASH, A. S.; BOBADE, P. A. *Haemobartonella felis* infection in cats from the Glasgow area. *The veterinary record*, Londres: British Veterinary Association, v. 119, n. 15, p. 373-375, out. 1986.

NEITZ, W. O.; ALEXANDER, R. A.; DU TOIT, P. J. *Eperythrozoon ovis* (sp. nov.). Infection in sheep. *Onderstepoort journal of veterinary science*, Pretoria: Onderstepoort Veterinary Institute, v. 3, p. 263-274, 1934.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Stanford: HighWire Press, v. 51, pt. 3, p. 891-899, maio 2001.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Stanford: HighWire Press, v. 52, pt. 2, p. 683, mar. 2002.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Stanford: HighWire Press, v. 54, pt. 2, p. 365-371, mar. 2004.

NEIMARK, H.; PETERS, W.; ROBINSON, B. L.; STEWART, L. B. Phylogenetic analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and Request for an Opinion. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Stanford: HighWire Press, v. 55, pt. 3, p. 1385-1391, maio. 2005.

O'CONNOR Jr, T. P.; TONELLI, Q. J.; SCARLETT, J. M. Report of the National FeLV/FIV Awareness Project. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 199, n. 10, p. 1348-1353, nov. 1991.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of bacteriology*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 176, n. 1, p.1-6, jan. 1994.

PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*, New York: American Association for the Advancement of Science, v. 235, n. 4790, p. 790-793, fev. 1987.

PEDERSEN, N. C.; TORTEN, M.; RIDEOUT, B.; SPARGER, E.; TONACHINI, T.; LUCIW, P. A.; ACKLEY, C.; LEVY, N.; YAMAMOTO J. Feline leukemia virus infection as a potentiating cofactor for the primary and secondary stages of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. *Journal of virology*, Baltimore: American Society for Microbiology, v. 64, n. 2, p. 598-606, fev. 1990.

PEDERSEN, N. C.; YAMAMOTO, J. K.; ISHIDA, T.; HANSEN, H. Feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam: Elsevier, v. 21, n. 1, p. 111-129, maio. 1989.

PEREIRA, M. G. Validade de uma investigação, In: _____: *Epidemiologia teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, cap. 15, p. 326-336.

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

PRIESTER, W. A.; HAYES, H. M. Feline leukemia after feline infectious anemia. *Journal of the National Cancer Institute*, Washington DC: Oxford University Press, v. 51, n. 1, p. 289-291, jul. 1973.

REINACHER, M. Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats. *Veterinary immunology and immunopathology*, Amsterdam: Elsevier, v. 21, n. 1, p. 85-95, maio, 1989.

REYNOLDS, C. A.; LAPPIN, M. R. 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infections in 21 client-owned cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Denver: American Animal Hospital Association, v. 43, n. 5, p. 249-257, set.-out. 2007.

REUBEL, G. H.; DEAN, G. A.; GEORGE, J. W.; BARLOUGH, J. E.; PEDERSEN, N. C. Effects of incidental infections and immune activation on disease progression in experimentally feline immunodeficiency virus-infected cats. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, New York: Raven Press Books, v. 7, n. 10, p. 1003-1015, out. 1994.

RICHARDS, J. Retrovirus testing: the mainstay remains. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 5, n. 1-2, p. 1-2, fev. 2003.

- RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *Journal of clinical microbiology*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 35, n. 4, p. 823-829, abr. 1997.
- RISTIC, M.; KREIER, J. P. Section 9: Rickettsias and Chlamydias. In: Holt, J. G. (Ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology: Gram-negative Bacteria* of general, medical, or industrial importance. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 4v., v. 1, cap. Sec. 9, p. 687-729.
- ROGERS, K. S. Anemia. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 2000, cap. 55, p. 198-203.
- ROMATOWSKI, J.; LUBKIN, S. R. 1997. Use of an epidemiologic model to evaluate feline leukemia virus control measures. *Feline Practice*. Santa Barbara: Veterinary Practice Pub, v. 25, n. 4, p. 6-11, jul. - ago.1997.
- ROSSAU, R. Development and application of ribosomal nucleic acid probes for species-specific detection of microbial pathogens. In: VAHERI, A.; TILTON, R. C.; BALOWS, A. (Eds.): *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Berlim: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 77-83, 1991.
- ROTHUIZEN, J. Jaundice. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 2000, cap. 58, p. 210-212.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, New York: American Association for the Advancement of Science, v. 239, n. 4839, p. 487-491, jan. 1988.
- SEAMER, J.; DOUGLAS, S. W. A new blood parasite of British cats. *The veterinary record*, Londres: British Veterinary Association, v. 71, n. 20, p. 405-408, 1959.
- SELLON, R. K.; HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection. In: GREENE, C. E. (Ed.): *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Saint Louis: Elsevier Inc, 2006, cap. 14, p. 131-143.
- SHAW, S. E.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; BIRTLES, R. J. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Veterinary microbiology*, Londres: Elsevier, v. 102, n. 3-4, p. 183-188, set. 2004.
- SHELTON, G. H.; GRANT, C. K.; COTTER, S. M.; GARDNER, M. B.; HARDY, W. D. Jr.; DiGIACOMO, R. F. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study (1968-1988). *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, New York: Raven Press Books, v. 3, n. 6, p. 623-630, 1990a.

SHELTON, G. H.; LINENBERGER, M. L.; GRANT, C. K.; ABKOWITZ, J. L. Hematologic manifestations of feline immunodeficiency virus infection. *Blood*, New York: American Society of Hematology, v. 76, n. 6, p. 1104-1109, set. 1990b.

SHELTON, G. H.; LINENBERGER, M. L.; ABKOWITZ, J. L. Hematologic abnormalities in cats seropositive for feline immunodeficiency virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 199, n. 10, p. 1353-1357, nov. 1991.

SHELTON, G. H.; LINENBERGER, M. L. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*, Philadelphia: W.B. Saunders, v. 10, n. 4, p. 220-233, nov. 1995.

SHELTON, G. H.; WALTIER, R. M.; CONNOR, S. C. et al. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in pet cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Denver: American Animal Hospital Association, v. 5, p. 7-12, mar.-abr. 1989.

SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M.; HARVEY, J. W. Ultrastructure of erythrocytes parasitized by *Haemobartonella felis*. *The Journal of parasitology*, Saint Lawrence: American Society of Parasitologists. V. 64, n. 3, p. 504-511, jun. 1978

SLATKO, B. E.; ALBRIGHT, L. M.; TABOR, S.; JU, J. DNA sequencing by the dideoxy method. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K (Ed.): *Current protocols in molecular biology*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 1999, Supplement 47, Unit 7.4A, p. 7.4A.1-7.4A.39

LEVY, J. K. FeLV and non-neoplastic FeLV-related disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 2000, cap. 89, p. 424-432.

SMALL, E.; RISTIC, M. Morphologic features of *Haemobartonella felis*. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 28, n. 124, p. 845-851, maio 1967.

SOUZA, A. M. Avaliação do Hemograma, Plaquetometria e da Frequência de *Haemobartonella felis* (Flint & Moss, 1953) e de um provável *Theileriidae* ocorrentes em (*Felis catus* Linnaeus, 1758) na Região do Grande Rio (RJ). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Cirurgia e Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2002.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. *Clínica veterinária*, São Paulo: Editora Guará, n. 36, p. 14-21, jan.-fev. 2002.

SPARKES, A. H.; HOPPER, C. D.; MILLARD, W. G.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Feline immunodeficiency virus infection. Clinicopathologic findings in 90 naturally occurring cases. *Journal of veterinary internal medicine*, Lakewood: Allen Press - American College of Veterinary Internal Medicine, v. 7, n. 2, p. 85-90, mar.-abr. 1993.

SPLITTER, E. J. *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp., 2 new blood parasites of swine. *Science*, New York: American Association for the Advancement of Science, v. 111, n. 2889, p. 513-514, maio 1950.

SPLITTER, E. J.; CASTRO, E. R.; KANAWYER, W. L. Feline infectious anemia. *Veterinary medicine*, Kansas City: v. 51, p. 17-22, jan. 1956.

SUKURA, A.; GRÖHN, Y. T.; JUNTILA, J.; PALOLAHTI, T. Association between feline immunodeficiency virus antibodies and host characteristics in Finnish cats. *Acta veterinaria Scandinavica*, Copenhagen: Consilio Societatum Veterinariam Scandinavicarum Edita, v. 33, n. 4, p. 325-334, 1992.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). *The veterinary clinics of north america. Small animal practice*, Philadelphia: W. B. Saunders, v. 33, n. 4, p. 773-789, jul. 2003.

SYKES, J. E.; BALL, L. M.; BAILIFF, N. L.; FRY, M. M. 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. Stanford: HighWire Press, v. 55, pt. 1, p. 27-30, jan. 2005.

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

SYKES J. E.; DRAZENOVICH, N. L.; KYLES, A. E.; BALL, L. M.; LEUTENEGGER, C. M. Detection of mixed infections with 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. Columbia: American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, v. 19, n. 3, p. 250-255, maio 2007b.

TAROURA, S.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; MIYAMA, T.; HIRAOKA, H.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of DNA of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *The Journal of veterinary medical science*, Tóquio: Japanese Society of Veterinary Science, v. 67, n. 12, p. 1277-1279, dez. 2005.

TASKER, S.; LAPPIN, M. R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *Journal of feline medicine and surgery*, Londres: Elsevier, v. 4, n. 1, p. 3-11, mar. 2002.

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

TASKER, S.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' DNA. *Journal of clinical microbiology*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 41, n. 1, p. 439-441, jan. 2003b.

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

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

TASKER, S. Approach to anaemia in the cat. *Irish veterinary journal*, Dublin: Irish Veterinary Publishing Limited, v. 58, n. 2, p.102-106, fev. 2005a.

TASKER, S. Approach to anaemia in the cat. *Irish veterinary journal*, Dublin: Irish Veterinary Publishing Limited, v. 58, n. 3, p.153-162, mar. 2005b.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. *In practice*, Londres: British Veterinary Association, v. 28, p. 136-141, mar. 2006.

TASKER, S.; LAPPIN, M. R. Update on hemoplasmosis. In: AUGUST, J. R. (Ed.): *Consultations in feline internal medicine*. 5. ed. Saint Louis: Elsevier Inc, 2006, cap. 63, p. 605-610.

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

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

TYZZER, E. E.; WEINMAN, D. *Haemobartonella* N.G. (*Bartonella olim pro parte*), *H. microti*, N.SP., of the field vole, *Microtus pennsylvanicus*. *American journal of hygiene*, [S. L.]: School of Hygiene and Public Health, Johns Hopkins University, v. 30, sec. B, p. 141-157, 1939.

TURNER, C. M.; BLOXHAM, P. A.; COX, F. E.; TURNER, C. B. Unreliable diagnosis of *Haemobartonella felis*. *The veterinary record, Londres: British Veterinary Association*, v. 119, n. 21, p. 534-535, nov. 1986.

TURNWALD, G. H. Dyspnea and tachypnea. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.): *Textbook of veterinary internal medicine*. 5. ed. Filadélfia: W. B. Saunders Company, 2000, cap. 47, p. 166-169.

VANSTEENHOUSE, J. L.; MILLARD, M. T.; TABOADA, J. Feline hemobartonellosis. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*, Yardley: Veterinary Learning System, v. 15, n. 4, p. 535-545, abr. 1993.

VANSTEENHOUSE, J. L.; TABOADA, J.; DORFMAN, M. I. *Haemobartonella felis* infection with atypical hematological abnormalities. *Journal of the American Animal Hospital Association*, Denver: American Animal Hospital Association, v. 31, n. 2 p. 165-169, mar.-abr. 1995.

VOBIS, M.; D'HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. The feline leukemia virus (FeLV) and the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology research*, Berlim: Springer International, v. 90, suplemento 3, p. S132-S134, jul. 2003a.

VOBIS, M.; D'HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology research*, Berlim: Springer International, v. 91, n. 6, p. 467-470, dez. 2003b.

VOBIS, M.; D'HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. Experimental quantification of the feline leukaemia virus in the cat flea (*Ctenocephalides felis*) and its faeces. *Parasitology research*, Berlim: Springer International, v. 97, suplemento 1, p. S102-S106, out. 2005.

WARDROP, K. J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M. R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *Journal of veterinary internal medicine*, Lakewood: Allen Press - American College of Veterinary Internal Medicine, v. 19, n. 1, p. 135-142, jan.-fev. 2005.

WEISER, M. G.; KOCIBA, G. J. Erythrocyte macrocytosis in feline leukemia virus associated anemia. *Veterinary pathology*, Washington: American College of Veterinary Pathologists, v. 20, n. 6, p. 687-697, nov. 1983.

WESTFALL, D. S.; JENSEN, W. A.; REAGAN, W. J.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 62, n. 5, p. 687-691, maio 2001.

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*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 43, n. 6, p. 2581-2585, jun. 2005.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F. S.; DOHERR, M. G.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; LOBETTI, R. G.; MALIK, R.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Phylogenetic analysis of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. *Journal of clinical microbiology*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 44, n. 12, p. 4430-4435, dez. 2006a.

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*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 44, n. 3, p. 961-969, mar. 2006b.

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

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; MELI, M. L.; BERNASCONI, M. V.; CASATI, S.; HEGGLIN, D.; PUORGER, M.; NEIMARK, H.; CATTORI, V.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Applied and environmental microbiology*, Washington: American Society for Microbiology, v. 73, n. 12, p. 3798-3782, jun. 2007b.

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*, Londres: Elsevier, v. 125, n. 3-4, p. 197-209, dez. 2007c.

WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R.B.; GREENE, R. C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, Washington DC: American Society for Microbiology, v. 28, n. 9, p. 1942-1946, set. 1990.

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*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 66, n. 6, p. 1008-1012, jun. 2005.

WOODS, J.E.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M. R. Attempted transmission of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. *American journal of veterinary research*, Chicago: American Veterinary Medical Association, v. 67, n. 3, p. 494-497, mar. 2006.

YAMAGUCHI, N.; MACDONALD, D. W.; PASSANISI, W. C.; HARBOUR, D. A.; HOPPER, C. D. Parasite prevalence in free-ranging farm cats, *Felis silvestris catus*. *Epidemiology and infection*, Cambridge: Cambridge University Press, v. 116, n. 2, p. 217-223, abr. 1996.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M.; PEDERSEN, N. C. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 194, n. 2, p. 213-220, jan. 1989.

ZULTY, J. C.; KOCIBA, G. J. Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg: American Veterinary Medical Association, v. 196, n. 6, p. 907-910, mar. 1990.

ANEXOS

- A - Termo de autorização apresentado aos proprietários dos animais visando a autorização para a inclusão destes no estudo.
- B - Ficha de entrevista com os proprietários, bem como orientações para o Clínico acerca da coleta de material e apresentação dos resultados do hemograma .

Anexo A - Termo de autorização apresentado aos proprietários dos animais visando a autorização para a inclusão destes no estudo.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu, _____
autorizo por meio deste documento a coleta de sangue, do(s) animal(ais)
_____ de minha propriedade,
para fins de pesquisa na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bem
como informo estar ciente do anonimato das informações referentes à minha
identidade na divulgação dos resultados do presente estudo.

Rio de Janeiro, ____/____/____

Assinatura do(a) proprietário(a) do(s) animal(is)

Anexo B – Ficha de entrevista com os proprietários, bem como orientações para o clínico acerca da coleta de material e apresentação dos resultados do hemograma (continua).

REGISTRO: _____-_____

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Daniel de Barros Macieira

FIV: Positivo; Negativo.

FeLV: Positivo; Negativo.

Nome do animal: _____ Sexo: _____ Data: _____

Idade: _____ Raça: _____ Castrado? Sim; Não.

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

- 1- O animal apresenta histórico de brigas? Sim; Não.
- 2- O animal foi mordido ou mordeu outro(a) gato(a)? Sim; Não.
- 3- O animal já recebeu alguma transfusão de sangue ou derivados em sua vida até o momento da coleta para o presente estudo? Sim; Não.
- 4- Presença de ectoparasitos?
 - Pulgas
 - Carrapatos
 - Piolhos
 - Miíase
 - Sarna / Ácaros
 - Lynxacarus radovsky*
 - Outros: _____
- 5- O animal mora em: Casa; Apartamento.
- 6- O animal tem acesso à rua? Sim; Não.
- 7- O animal vive com outros gatos? Sim (1-3; 4-6; 7-9; ≥ 10); Não.
- 8- O animal é vacinado? Sim; Não.

SINAIS CLÍNICOS

- 1- Anorexia: Sim; Não.
- 2- Letargia / Depressão: Sim; Não.
- 3- Mucosas pálidas: Sim; Não.
- 4- Icterícia: Sim; Não.
- 5- Taquipnéia: Sim; Não.
- 6- Taquicardia: Sim; Não.
- 7- Febre: Sim; Não.
 - a. Alta ($T > 40^{\circ}\text{C}$)
 - b. Moderada ($39,6 \leq T \leq 40^{\circ}\text{C}$)
 - c. Baixa ($39,2 < T \leq 39,5^{\circ}\text{C}$)

DIAGNÓSTICOS JÁ EFETUADOS NO ANIMAL E DEMAIS OBSERVAÇÕES

Anexo B. Continuação

COLETA DE MATERIAL

- 1- Esfregaço de ponta de orelha não-corado (1 unidade): Sim; Não.
- 2- Esfregaços convencionais não-corados (2 unidades): Sim; Não.
- 3- Separação de material (favor colocar o sangue utilizado para o hemograma na geladeira, separados da seguinte forma).
 - a. FIV positivo
 - b. FeLV positivo
 - c. Negativo
- 4- Separação do plasma (favor deixar o plasma utilizado para o exame de FIV/FeLV separado da mesma forma que o item anterior)

RESULTADOS HEMOGRAMA:

	Valor	Unidade
Hematimetria:		$\times 10^6$ /ul
Hemoglobina:		g%
Volume globular:		%
VGM:		fl
CHbGM:		%
Plaquetas:		/ul
Reticulócitos:		%
Metarrubricitos:		%
Policromasia:		
Anisocitose:		
Fibrinogênio		
PPT		(g/dl)

Leucometria global: <input type="text"/> /ul.		
Leucometria específica	Relativa (%)	Absoluta (/ul)
Basófilos		
Eosinófilos		
Mielócitos		
Metamielócitos		
Bastões		
Segmentados		
Linfócitos		
Monócitos		