

ESTUDO DA HEMOPLASMOSE DOS FELINOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

HEMOPLASMOSIS STUDY IN DISTRITO FEDERAL DOMESTIC FELINES ATTENDED AT VETERINARY HOSPITAL OF THE UNIVERSITY OF BRASÍLIA

SODRÉ, M. P. A.¹; ABRAHIM, M.A.¹; FIRMINO, F. de P.²; VASCONCELOS, M.F.^{2*}; CESAR, M. F. G.²; PALUDO, G.R.³

¹ Aluna de graduação em Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, UnB – DF/Brasil

² Pós-Graduandas de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, UnB – DF/Brasil

³ Professora adjunta de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília, UnB –DF/Brasil

Resumo

A hemoplasmose é uma doença infecciosa que acomete os animais da família *felidae*, caracterizada principalmente por anemia hemolítica imuno-mediada. Pelo menos três espécies do gênero *Mycoplasma* infectam gatos: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*. O presente trabalho teve por objetivos a identificação de gatos domésticos do Distrito Federal e atendidos no Hospital Veterinário da UnB infectados pelo *Mycoplasma* spp (citologia e PCR) e a avaliação dos aspectos hematológicos apresentados por estes animais. Foram utilizados 20 animais, todos pertencentes ao grupo de risco, e realizados hemogramas completos, pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo e PCR para *M. haemofelis*. Do total de amostras analisadas neste estudo, 60% dos animais foram positivos pela técnica da PCR, e apenas 25% dos animais foram considerados positivos ao exame do esfregaço sanguíneo. Não foi observada diferença ($p>0,05$) na hematologia entre os animais positivos e negativos. Apesar do pequeno número de animais testados, foi observada uma elevada ocorrência (60%) de animais infectados pelo *Mycoplasma haemofelis* e a PCR mostrou-se mais sensível que a análise citológica, o que justifica seu uso na identificação de animais infectados. Estudos futuros com maior número de animais devem ser desenvolvidos no intuito de investigar a possibilidade de infecção dos animais do Distrito Federal por outros agentes da hemoplasmose felina, como o *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

Palavras-chave: gato doméstico, hemoplasma, *Mycoplasma* spp, diagnóstico, hematologia, PCR.

Abstract

Hemoplasmosis is an infectious disease that affects animals of *felidae* family, characterized mainly by immune-mediated hemolytic anemia. At least three species of *Mycoplasma* infect cats: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Candidatus Mycoplasma turicensis*. The objectives of these work were to identify Distrito Federal domestic cats attended at Veterinary Hospital of UnB infected by *Mycoplasma* spp (cytology and PCR) and to

evaluate hematological findings of these animals. We used 20 animals, all belonging to the risk group, which were submitted to complete hemograms, hemoparasites search in blood smear and *M. haemofelis* PCR. In this study, 60% of the animals were *M. haemofelis* positive by PCR technique, 51 and only 25% of the animals were considered positive to the examination of blood smear. No differences ($p > 0,05$) were observed in hemograms between positive and negative animals. Despite of small number of animals tested, a higher occurrence (60%) of *Mycoplasma haemofelis* infection were detected and PCR test was more sensible than cytology analysis, which justifies its use in identification of infected animals. More studies should be conducted to identify if other feline hemoplasmosis agents are infecting Distrito Federal animals, as *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

Keywords: domestic cat, hemoplasmosis, *Mycoplasma* spp., diagnostic, hematology, PCR

Introdução

Haemobartonella felis, é o agente causador da anemia infecciosa felina (WILLI *et al*, 2006). Juntamente com o gênero *Eperythrozoon*, com base na análise genética e em similaridades morfológicas do gene 16S RNA, este gênero foi recentemente reclassificado como *Mycoplasma*. Estas bactérias sem parede celular, são parasitas eritrocitários que não podem ser cultivados *in vitro* (STOFFREGEN *et al*, 2006).

Pelo menos três espécies deste gênero infectam gatos: *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*. *Mycoplasma haemofelis* é capaz de causar anemia severa em gatos, enquanto *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ainda tem sido associado a doenças em gatos imunocompetentes (SYKES *et al*, 2007). Em estudo de infecções experimentais, *Mycoplasma haemofelis* é, aparentemente mais patogênico que *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, e no caso deste último, há suspeita da influência de status retroviral em sua manifestação clínica (WILLI *et al*, 2006).

Mycoplasma haemofelis pode ser um agente oportunista, estando presente em animais sadios e levando a doença quando esses animais são estressados por outras doenças e procedimentos cirúrgicos. O aparecimento da doença causada pelo *Mycoplasma haemofelis* em gatos está intimamente ligado com a infecção destes com o vírus da FeLV, onde, em torno de 40% a 50% dos animais com a clínica de hemoplasmoze são FeLV positivo, pois o FeLV pode suprimir a resposta imunitária dos gatos, aumentando a suscetibilidade do animal. *Mycoplasma haemofelis* e FeLV geralmente resultam em anemia mais severa do que em animais com apenas um dos agentes (HARVEY, 2006). O chamado grupo de risco inclui animais com anemia, FeLV positivos, com histórico de abscessos por mordidas, de três anos, ou menos, e com acesso a rua (JAIN, 1993).

O presente projeto tem por objetivo a identificação de animais infectados pelo *Mycoplasma* spp (citologia e PCR), a avaliação dos aspectos hematológicos destes animais e a identificação da espécie de *Mycoplasma* que acomete os gatos domésticos do Distrito Federal.

Materiais e métodos

Foram obtidas 20 amostras sanguíneas de gatos domésticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, colhidas por meio de venopunção da cefálica ou jugular. Foram incluídos nessa amostragem felinos domésticos pertencentes ao grupo de risco, ou seja, animais de qualquer idade, com acesso direto a rua, apresentando ou não sintomatologia de hemoplasmose e animais com sintomatologia de hemoplasmose e com diagnóstico laboratorial confirmatório (visualização do agente em esfregaço de sangue fresco). As amostras foram acondicionadas em frascos com anticoagulante (EDTA) e mantidas sob refrigeração até o processamento.

Todas as amostras foram submetidas a hemogramas completos, realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade de Brasília. Com a utilização de um contador automático de células para uso veterinário (CC-550 - CELM) foram determinados o número total de hemácias, leucócitos e a concentração de hemoglobina. Para a determinação do volume globular (VG) foi utilizada a técnica do micro-hematócrito. As proteínas plasmáticas totais foram determinadas por refratometria. Os índices hematimétricos foram obtidos por cálculo. O diferencial leucocitário foi realizado em esfregaço sanguíneo (100 células) corado com corante Panótico.

A pesquisa de hemoparasita foi realizada por meio de exame citológico (esfregaço sanguíneo) e Reação de Polimerase em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction* - PCR).

Após a realização dos hemogramas, o restante do sangue foi centrifugado para a separação do plasma e da capa de células e armazenados (-20°C) até o momento da extração do DNA e realização da PCR. A extração do DNA foi realizada utilizando-se kit comercial (QIAamp DNA Blood Mini Kit - Qiagen), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para a reação da PCR foram utilizados primers específicos para o gene 16S rRNA de acordo as seqüências depositadas no *GenBank* (F1:GAC TTT GGT TTC GGC CAA GG e R3:CAG AGT ACT ATC ATA ATT ATC CCT C). As reações consistiram de aproximadamente 10 ng de DNA, 1X tampão de PCR, 3,0 mM MgCl₂, 0,15 mM de cada deoxinucleotídeo, 0,6 µM de cada primer e 1,5U de *Taq* DNA polimerase resultando em um volume final de 25µL. A PCR foi realizada em um termociclador (FTGene5D – Techgene) utilizando-se o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por dez minutos, seguida de 40 ciclos: 94°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e posterior extensão final 72°C por sete minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.5%, corados com brometo de etídio e

visualizados sob luz ultravioleta resultando em um produto de 393pb nos animais positivos. Para cada reação utilizaram-se controles negativo (água) e positivo (DNA de gato doméstico com hemoplasmose).

Para a padronização da técnica de PCR foram utilizadas amostras de DNA de animais (gatos domésticos) com diagnóstico laboratorial positivo para hemoplasmose confirmado por meio da visualização do agente em esfregaço sanguíneo. As condições da PCR foram determinadas experimentalmente. Foram considerados como animais positivos para hemoplasmose aqueles com resultado positivo na pesquisa do agente em esfregaço sanguíneo e/ou na PCR.

Resultados e Discussão

Do total de vinte amostras analisadas, em 5 amostras (25%) foi identificada a presença de *Mycoplasma haemofelis* no esfregaço sanguíneo, enquanto que 12 amostras (60%) foram positivas na PCR para *Mycoplasma haemofelis*. Todos os animais positivos na pesquisa do esfregaço sanguíneo foram também positivos na PCR. Os animais positivos na PCR do *Mycoplasma haemofelis* apresentaram um produto de 373 pares de bases na eletroforese em gel de agarose 1.5%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Os resultados dos hemogramas apresentados pelos animais positivos e negativos estão apresentados na tabela 1. Não houve diferença ($p>0,05$) nos valores hematológicos entre os animais positivos e negativos.

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos observados nos animais positivos e negativos para *M. haemofelis*.

| | Animais Positivos (n=12) | Animais Negativos (n=8) | Valores de Referência |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Hematócrito (%) | 14,5 (± 7) | 20,37 ($\pm 9,41$) | 24 – 45 |
| Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | 3,42 ($\pm 1,86$) | 5,19 ($\pm 2,76$) | 5,0 – 10 |
| Hemoglobina (fL) | 5,44 ($\pm 3,32$) | 7 ($\pm 3,49$) | 8 – 15 |
| VCM (fL) | 44,65 ($\pm 8,34$) | 43,44 ($\pm 13,97$) | 39 – 55 |
| CHCM (%) | 36,42 ($\pm 10,21$) | 33,87 ($\pm 2,23$) | 30 – 36 |
| Leucócitos ($/\mu\text{L}$) | 1.2630 (± 8.080) | 11.050 (± 7.620) | 5.500 – 19.500 |
| Bastonetes ($/\mu\text{L}$) | 27,75 ($\pm 50,27$) | 39,75 ($\pm 73,83$) | 0 – 300 |
| Segmentados ($/\mu\text{L}$) | 9.028,66 ($\pm 8.783,61$) | 9.657,87 ($\pm 7.609,16$) | 2.500 – 12.500 |
| Linfócitos ($/\mu\text{L}$) | 2.754,83 ($\pm 2.015,22$) | 2.224,62 ($\pm 1.847,66$) | 1.500 – 7.000 |
| Monócitos ($/\mu\text{L}$) | 286,41 ($\pm 297,71$) | 225,75 ($\pm 217,64$) | 0 – 850 |
| Eosinófilos ($/\mu\text{L}$) | 413,41 ($\pm 436,72$) | 313,25 ($\pm 612,68$) | 0 – 1.500 |
| Basófilos ($/\mu\text{L}$) | 0 (± 0) | 26,25 ($\pm 48,74$) | Raros |
| Proteína (g/dL) | 6,85 ($\pm 1,06$) | 7,2 ($\pm 1,25$) | 6,0 – 8,0 |
| Plaquetas ($/\mu\text{L}$) | 313.958,3 ($\pm 186.869,5$) | 206.625 ($\pm 194.117,7$) | 200.000 – 500.000 |

*Fonte: Jain, 1993

Dentre as amostras analisadas, em 25% das amostras foi identificada a presença de *Mycoplasma haemofelis* no esfregaço sanguíneo, enquanto que em 60% das amostras foram positivas na PCR para *Mycoplasma haemofelis*. A discrepância entre os resultados da PCR e da análise citológica, mostram a maior sensibilidade

do teste molecular para detecção do paciente. Segundo Lapping e Tasker (2002). Os mesmos autores referem que a PCR, quando comparada ao exame citológico, apresenta uma maior sensibilidade e em um estudo comparativo a citologia obteve 37,5% de animais positivos, contra 100% da PCR.

Embora tenha sido observada elevada prevalência da hemoplasmosose nos animais testados (60%), não foi constatada diferença significativa entre os hemogramas dos animais positivos e negativos, o que também já foi observado por outros autores (TASKER *et al*, 2004).

Geralmente em animais infectados encontra-se anemia macrocítica hipocrômica (SOUZA e ALMOSNY, 2002), porém neste estudo foi encontrada uma maior proporção de anemia normocítica normocrômica, possivelmente devido ao número reduzido de animais testados ou mesmo devido a uma coinfeção por retrovírus que pode estar ocasionando esta anemia arregenerativa. A ausência de anemia em dois dos animais positivos utilizados neste estudo pode indicar que na ocasião da coleta os animais estavam no estado subclínico e crônico da infecção (WILLI *et al*, 2007). Cabe salientar que o aparecimento da doença causada pelo *Mycoplasma haemofelis* em gatos domésticos está intimamente ligado com a infecção destes com o vírus da FeLV, onde, pois o FeLV pode suprimir a resposta imunitária dos gatos, aumentando a suscetibilidade do animal (HARVEY, 2006).

Atualmente, sabe-se que existem três espécies de hemoplasmas importantes nos felinos domésticos, sendo comum a co-infecção, bem como a infecção isolada. Animais negativos para *Mycoplasma haemofelis* podem estar infectados com outro hemoplasma, mostrando a importância de estudos futuros em conjunto da análise de outras espécies por meio da PCR.

A PCR mostrou-se mais sensível do que a pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sangüíneo, corroborando resultados anteriores, denotando a importância do uso de métodos mais sensíveis para identificação de animais infectados, principalmente em casos de baixa parasitemia.

Conclusões:

Foi observada uma elevada ocorrência (60%) da infecção pelo *Mycoplasma hemofelis* nos animais pertencentes ao grupo de risco e atendidos no Hospital Veterinário da UnB.

Não foram observadas diferenças significativas entre os hemogramas dos animais positivos e negativos o que pode ser atribuído ao critério de inclusão do experimento em que os animais deveriam pertencer ao grupo de risco da infecção.

Referências bibliográficas

HARVEY J.W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) In: **GREENE C.E. Infectious Diseases of dog and cat**. Terceira edição.2006.p.252 - 260.

JAIN C.N.. Hemolytic Anemias Associated with Some Infectious Agents. In: **Essentials of Veterinary Hematology**. Cap. 10, pg. 177 – 192, Philadelphia, 1993.

LAPPING M.R., TASKER S., *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. 2002. vol.4, p. 3 - 11.

SOUZA A.M., ALMOSNY N.R.P., Hemobartonelose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. Cap. 5, pg. 90– 109. L.280 F. Livros. Rio de Janeiro. 2002.

STOFFREGEN, W. C., ALT, D. P., PALMER, M. V., OLSEN, S. C., WATERS, W. R., STASKO, J. A. (2006). Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (rangifer tarandus). **Journal Wildl Dis** 42: 249-258

SYKES, J. E., DRAZENOVICH, N. L., KYLES, A. E., BALL, L. M., LEUTENEGGER, C. M. (2007). Detection of Mixed Infections with "Candidatus Mycoplasma Haemominutum" and Mycoplasma Haemofelis Using Real-time Taqman Polymerase Chain Reaction. **JVDI** 19: 250-25

TAKER S., BRADDOCK J.A., BARAL R., HELPS C.R, DAY M.J., GRUFFYD 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** (2004) 6, 345-354.

WILLI, B., BORETTI, F. S., BAUMGARTNER, C., TASKER, S., WENGER, B., CATTORI, V., MELI, M. L., REUSCH, C. E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN,R. (2006). Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland.. **J. Clin. Microbiol.** 44: 961-969

WILLI, B., BORETTI, F. S., CATTORI, V., TASKER, S., MELI, M. L., REUSCH,C., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. (2005). Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. **J. Clin. Microbiol.** 43: 2581-2585

WILLI, B., FILONI, C., CATAO-DIAS, J. L., CATTORI, V., MELI, M. L., 304 VARGAS, A., MARTINEZ, F., ROELKE, M. E., RYSER-DEGIORGIS, M.-P., LEUTENEGGER, C. M., LUTZ, H., HOFMANN-305 LEHMANN, R. (2007).

Worldwide Occurrence of Feline Hemoplasma Infections in Wild Felid Species. **J. Clin. Microbiol.** 45: 1159-1166