

ESTUDO DA HEMOPLASMOSE NOS FELÍDEOS SILVESTRES DO PARQUE ZOOLOGÍCO DE BRASÍLIA-DF, BRASIL
HEMOPLASMOSIS STUDY IN WILD FELINES FROM BRASÍLIA-DF ZOO PARK, BRAZIL

ABRAHIM, M.A.¹; VASCONCELOS, M.F.²; SODRÉ, M.P.A.¹; FIRMINO, F. DE P.²; SILVA, L.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. Seu agente etiológico é um parasita epicelular gram-negativo de eritrócitos, que recentemente foi classificado em duas espécies: *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. A transmissão pode ocorrer por meio de artrópodes hematófagos, como pulgas e carrapatos, feridas causadas por mordeduras, transfusão sanguínea e transplacentária. Devido à alta mobilidade e não-especificidade a pulga parece ser o principal vetor, merecendo destaque a *Ctenocephalides felis*. Em felinos não domésticos, a forma de transmissão ainda é obscura. Foram coletadas amostras sanguíneas de nove felinos selvagens do Parque Zoológico de Brasília-DF e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (UnB). Todas as amostras foram submetidas a hemogramas completos, pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo e PCR para *M. haemofelis*. Não foram observadas alterações significativas nos hemogramas e nenhum hemoparasita foi encontrado nos esfregaços sanguíneos. Nenhuma amostra foi positiva para *M. haemofelis* na PCR realizada. Apesar do pequeno número de animais estudados do Parque Zoológico de Brasília, pode-se constatar que os hemogramas encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie e que nenhum animal apresentou infecção para *M. haemofelis*, denotando que os animais encontram-se hígidos. Mais estudos devem ser realizados para que se verifique a presença de outros agentes causadores de hemoplasmose felina, como *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ou *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

Palavras-chave: felino selvagem, 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. Its causative agent is a gram-negative epicelular parasite of red blood cells, which recently was classified in two species: *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. The transmission can occur through hematophagous arthropod such as fleas and ticks, wounds caused by bites, blood transfusions and

transmission. Due to the high mobility and non-specific flea seems to be the main vector, deserving highlight the *Ctenocephalides felis*.

In non-domestic cats, the transmission form is still unclear. Nine wild cats from Brasília Zoo Park were submitted to blood venopuncture. Blood samples were analyzed at Laboratory of Clinical Pathology from Veterinary Hospital of the University of Brasília (UNB). Complete blood count, hemoparasites search and *M. haemofelis* PCR were realized in all blood samples. None alteration was observed in the hemograms realized and none hemoparasite was observed in blood smear. *M. haemofelis* was not identified in the samples by the PCR realized. Despite of small number of animals studied from Brasília – DF Zoo Park, it is possible to notice that hemograms are 3 between species reference values and none of these 52 animals had *M. haemofelis* infection, indicating good healthy condition. More studies are necessary to identify infection by other possible causative agents of feline hemoplasmosis as *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ou *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

Keywords: wild cat, hemoplasmosis, *Mycoplasma* spp., diagnosis, hematology, PCR

Introdução

A hemoplasmose é uma doença infecciosa que acomete os animais da família *felidae*, sendo caracterizada por anemia hemolítica imuno-mediada. O agente etiológico é um parasita epitelial gram-negativo de eritrócitos, classificado em duas espécies: *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (JENSEN et al., 2001).

A transmissão pode ocorrer por meio de artrópodes hematófagos, como pulgas e carrapatos, feridas causadas por mordeduras, transfusão sanguínea e transplacentária. Devido à alta mobilidade e não-especificidade a pulga parece ser o principal vetor, merecendo destaque a *Ctenocephalides felis* (HARVEY, 2006).

O *Mycoplasma haemofelis* pode ser comensal em gatos saudáveis e a infecção pode resultar em doença aguda quando os animais infectados são submetidos a condições de estresse ou acometidos por infecções ou doenças concomitantes, como a infecção pelo vírus da leucemia felina (FeLV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), diabetes, dentre outras (SOUZA, 2003).

Existem poucos estudos sobre a hemoplasmose em felinos não domésticos, contudo existem indícios de que a infecção é rara, estando associada com baixa ou ausência de sinais clínicos (HAEFNER et al, 2003), denotando o potencial para estes animais servirem como reservatório do agente para infecção dos felinos domésticos.

O presente trabalho tem por objetivos a identificação de animais infectados pelo *Mycoplasma* spp, com a realização de exames citológicos e PCR, avaliar os parâmetros hematológicos apresentados por estes animais e identificar a espécie

de *Mycoplasma* spp infectante dos felinos não domésticos do Parque Zoológico de Brasília.

Materiais e Métodos

Foram obtidas nove amostras de sangue de felinos não domésticos provenientes do Parque Zoológico de Brasília-DF, pertencentes as seguintes espécies: jaguatiricas (*Leopardus pardalis* – duas amostras); gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus* – uma amostra); leões (*Panthera leo* – três amostras); onças (*Panthera onca* – duas amostras) e suçuarana (*Puma concolor* – uma amostra).

Para a realização das colheitas de sangue, os animais foram sedados e as amostras foram obtidas por venopunção da jugular ou cefálica e acondicionadas em tubos com EDTA e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (UnB). O número total de eritrócitos, leucócitos e a concentração de hemoglobina foram realizados em um contador semi-automático de células para uso veterinário (CC 550 – CELMTM, Brasil). O hematócrito ou volume globular (VG) foi determinado utilizando a técnica da microcentrifugação e a determinação da concentração das proteínas plasmáticas totais (PPT) foi realizada com o auxílio do refratômetro. O diferencial leucocitário foi realizado pela observação de 100 células em esfregaço sanguíneo corado com panótico. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração corpuscular média de hemoglobina (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. A pesquisa de hemoparasitas foi realizada por meio do exame no esfregaço de sangue circulante. A identificação de animais infectados pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) foi realizada utilizando-se SNAP® Feline Combo.

Após a realização dos hemogramas, o restante do sangue foi centrifugado (2500 rpm/5min) para a separação do plasma e da capa de células e congelados (-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. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da realização da PCR.

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. Para a padronização da técnica de PCR foram utilizadas amostras de DNA de animais (felinos domésticos) com diagnóstico laboratorial positivo para hemoplasmose. As condições da PCR foram determinadas experimentalmente.

Resultados e Discussão

Nenhuma das amostras testadas foi positiva na pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sangüíneo e na PCR para *Mycoplasma haemofelis*. Dois dos nove animais examinados no presente experimento são portadores do vírus da imunodeficiência felina (FIV) pelo teste SNAP® Feline Combo. Isso pode ser explicado pelo fato de que felinos selvagens de cativeiro estão menos expostos aos fatores de risco de contágio, como presença de ectoparasitas hematófagos (Willi et al, 2007). Porém, isso não significa que também sejam negativos para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* já que nos exames da PCR realizados foram utilizados primers específicos apenas para *M. haemofelis* e, a pesquisa do agente em esfregaço sangüíneo é pouco sensível, conforme descrito por WILLI *et al* (2005).

Os resultados dos hemogramas dos pequenos e médios felinos estão apresentados na Tabela 1 e dos grandes felinos estão na Tabela 2. Os hemogramas, de maneira geral, apresentaram-se dentro dos valores de referência para as espécies. Foram observadas linfocitose no hemograma do *Leopardus tigrinus* e leucocitose por neutrofilia no hemograma do *Puma concolor*.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos observados nos *Leopardus pardalis* (2 animais) e *Leopardus tigrinus* (1 animal) do Parque Zoológico de Brasília – DF.

	<i>Leopardus pardalis</i>	Valores de Referência	<i>Leopardus tigrinus</i>	Valores de Referência*
Hematócrito (%)	40 (± 3)	35 – 44	40	38 - 46
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	7,0 (± 0)	4,07 – 5,33	7,74	5,82 - 8,24
Hemoglobina (g/dL)	13,0 (± 1)	10,51 – 15,23	13,33	13,73 - 16,93
VCM (fL)	62 (± 0)	77 – 95	51,67	49 – 75
CHCM (%)	32 (± 1)	27 – 36	33,25	33 – 39
Leucócitos (μL)	9.000 (± 1)	6,2 – 12,4	4.750	4,1 – 9,6
Bastonetes (μL)	0	0 – 212	0	0 - 66
Segmentados (μL)	6.739 (± 706)	4407 – 9771	380	2719 – 7369
Linfócitos (μL)	950 (± 14)	751 – 2309	4.180	907 - 2679
Monócitos (μL)	294 (± 150)	0 – 292	190	0 - 157
Eosinófilos (μL)	717 (± 448)	137 – 886	0	0 - 249
Basófilos (μL)	0	-	0	-
PPT (g/dL)	8,0 (± 1)	8,5 – 9,5	7,6	7,2-9,1
Plaquetas (μL)	327.500 (± 60.104)	-	255.000	-

*Fonte: Santos, 1999. PPT – Proteína Plasmática Total

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos observados nos *Panthera leo* (3 animais), *Panthera onca* (2 animais) e *Puma concolor* (1 animal) do Parque Zoológico de Brasília – DF.

<i>Panthera leo</i>	Valores de Referência	<i>Panthera onca</i>	Valores de Referência	<i>Puma concolor</i>	Valores de Referência
---------------------	-----------------------	----------------------	-----------------------	----------------------	-----------------------

Hematócrito (%)	41 (± 2)	39,1 (± 5,4)	36 (±9)	33 - 40	31	33 - 44
Hemácias (x10⁶/μL)	8,0 (± 1)	7,9 (± 1,23)	7,0 (± 1)	5,55 - 7,97	5,44	6,89 - 8,17
Hemoglobina (g/dL)	14,0 (±1)	13 (± 2)	12,0 (± 3)	10,66 - 14,02	10,33	13,73 - 15,59
VCM (fL)	52 (±3)	49,9 (± 4,5)	50 (± 5)	47 - 65	56,98	50 - 55
CHCM (%)	33 (±0)	33,2 (± 2,9)	33 (± 0)	29 - 37	33,32	33 - 40
Leucócitos (μL)	8.000 (± 1)	4290 (± 1035)	10.000 (± 1)	8,9 - 15,7	17.650	8,5 - 14,3
Bastonetes (μL)	24 (±43)	-	107 (± 151)	0 - 340	0	0 - 132
Segmentados (μL)	6.555 (±373)	9947 (± 3632)	7.208 (±509)	6985 - 12476	14.120	2659 - 8329
Linfócitos (μL)	1.005 (±761)	1904 (± 1164)	1.896 (± 1.708)	757 - 2606	1.942	189 - 5290
Monócitos (μL)	228 (±200)	474 (± 357)	107 (±151)	58 - 279	530	0 - 412
Eosinófilos (μL)	503 (±370)	454 (± 408)	333 (±16)	125 - 955	1059	0 - 252
Basófilos (μL)	36 (±41)	264 (± 437)	0	-	0	-
PPT (g/dL)	8,0 (±1)	-	8,0 (±1)	8,5 - 9,9	10	9,3 - 10,6
Plaquetas/μL	275.000 (±71.842)	285000 (± 105000)	271.250 (±104.298)	-	295.000	-

*Fonte: Santos, 1999. PPT – proteína plasmática total

A presença de *M. haemofelis* e de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* é pouco reportada em felinos selvagens de cativeiro do Brasil (Guimarães et al, 2007). Contudo, em estudos realizados em felinos selvagens dos Estados Unidos foi observada a prevalência de 10% de animais positivos para hemoplasrose felina (Haefner et al, 2003). Recentemente, uma terceira espécie de hemoplasma, *Candidatus Mycoplasma turicensis* (Willi et al, 2005), foi relatada acometendo um felino selvagem da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (Willi et al, 2007).

O *M. 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 domésticos 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 hemoplasrose são FeLV positivos, pois o FeLV pode suprimir a resposta imunitária dos gatos, aumentando a suscetibilidade do animal. Em contraste, a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) não parece aumentar a gravidade da anemia quando associado ao *Mycoplasma haemofelis* (HARVEY, 2006). No presente trabalho não foi observado a relação da presença do vírus da imunodeficiência felina e a infecção por *M. haemofelis*, uma vez que os dois animais que eram positivos para FIV não foram positivos nos exames da PCR, denotando que os felinos silvestres podem apresentar predisposição diferente em relação aos felinos domésticos.

Conforme pode ser observado nas tabelas 1 e 2, os felinos silvestres do Parque Zoológico de Brasília apresentam hemogramas dentro dos valores esperados para a espécie, denotando que os animais apresentam-se clinicamente hígidos. A linfocitose observada no hemograma do *Leopardus tigrinus* e leucocitose por neutrofilia no hemograma do *Puma concolor*, podem ter sido ocasionadas devido ao estresse da captura, uma vez que o cortisol liberado nestas situações pode resultar na liberação de linfócitos dos tecidos linfóides, particularmente dos felinos,

e na desmarginalização de neutrófilos segmentados ocasionando leucocitose (Jain, 1993).

Conclusões

Apesar do pequeno número de animais estudados do Parque Zoológico de Brasília, pode-se constatar que os hemogramas encontram-se dentro dos valores de referência para as espécies e que nenhum animal apresentou infecção para *M. haemofelis*, denotando que os animais encontram-se hígidos.

Mais estudos devem ser realizados para que se verifique a presença de outros agentes causadores de hemoplasmose felina, como *Candidatus Mycoplasma haemominutum* ou *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

Referências Bibliográficas

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

HAEFNER, M.; BURKE, T.J.; KITCHELL, BE.; LAMONT, BE.; SCHAEFFER, DJ. et al. (2003) **Identification of *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) in captive nondomestic cats**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Vol. 34, No. 2 pp. 139–143.

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

SANTOS, L.C. **Diagnóstico Ambiental**. 1ª ed. Editora Universitária, Cascavel, 1999.

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.F. Livros. Rio de Janeiro. 2002.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, 285 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**. Jun. 2005, vol. 43, n. 6, p. 2581 - 2585.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATAO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; ROELKE, M. E.; RYSER-DEGIOGIRS, M. P.; LEUTENEGGER, C. M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHAMAN, R.. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **J. Clin. Microbiol.** 2007 : JCM.02005-06.