

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Presença do *Mycoplasma haemocanis* (hemoplasma hemotrópico) em concentrado de eritrócitos canino e sua interferência no metabolismo eritrocitário**

**Autor: Mónica Alejandra Camargo Castillo**

**PORTO ALEGRE**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Presença do *Mycoplasma haemocanis* (hemoplasma hemotrópico) em concentrado de eritrócitos canino e sua interferência no metabolismo eritrocitário**

**Autor:** Mónica Alejandra Camargo Castillo

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS como requisito parcial da obtenção do título de Mestre

**Orientador:** Félix González

**PORTO ALEGRE**

**2020**

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

CIP - Catalogação na Publicação

Camargo Castillo, Monica Alejandra  
Presença do Mycoplasma haemocanis (hemoplasma hemotrópico) em concentrado de eritrócitos canino e sua interferência no metabolismo eritrocitário / Monica Alejandra Camargo Castillo. -- 2020.  
52 f.  
Orientador: Felix H González.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. hemoplasma. 2. hemocomponente. 3. lesão de armazenamento. 4. transfusão. 5. cão. I. González, Felix H, orient. II. Título.

Monica Alejandra Camargo Castillo

**PRESENÇA DO *Mycoplasma haemocanis* (HEMOPLASMA HEMOTRÓPICO) EM  
CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO E SUA INTERFERÊNCIA NO  
METABOLISMO ERITROCITÁRIO**

Aprovada em 31 de março de 2020

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Félix González – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Orientador e Presidente da Comissão Avaliadora

---

Prof. Dra. Raqueli França - Universidade Federal de Pelotas  
Membro da Comissão Avaliadora

---

Dra. Aline Girotto Soares - Laboratório Zelle  
Membro da Comissão Avaliadora

---

Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Membro da Comissão Avaliadora

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, pela oportunidade de estar aqui e por me guiar e iluminar no meu caminho obsequiando-me inumeráveis bençãos.

Agradeço ao Professor Félix e à Professora Stella pela oportunidade, pelo apoio e tempo dedicado, por suas orientações e por disponibilizar os recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

A minha mãe, meu pai e minha irmã por seu amor, guia e apoio incondicional, são meu exemplo de vida, de luta, honestidade e responsabilidade. Pensar em vocês me dá a certeza de que tudo vale a pena e me dá a força para continuar. A toda minha família pelo apoio e carinho sempre.

Ao César por seu amor, pela paciência, compreensão, apoio, ajuda, força e incentivo em todos os momentos. Obrigada por transformar minha vida, por colaborar na realização de meus sonhos, pelo exemplo de dedicação, perseverança e força. Te amo e te admiro muito.

Ao Bruno e à Daiani que estiveram sempre presentes no desenvolvimento desse trabalho, por toda a ajuda, paciência, auxílio, ensinamentos, carinho e incentivo em todas as horas. Ao Felipe pela ajuda e compreensão sempre que precisei. Às minhas colegas de mestrado Laura e Stephanie pela disposição e ajuda. A toda a equipe do LACVET, residentes, estagiários e técnicos por seu apoio e por fazer desses dois anos uma grande experiência de aprendizado, sou eternamente grata pelo carinho e conhecimentos transmitidos.

Ao professor João Fábio e a toda a equipe do Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet), pelos ensinamentos, pelo tempo dedicado e pela disposição para me ajudar.

À Naila, Lucia, Bárbara, Nathalia e Marina pela amizade, ensinamentos, conselhos e carinho durante todo o caminho.

Agradeço a minha amiga Xiomara pela amizade, pelo carinho e incentivo sempre.

E a todas as demais pessoas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

# **PRESENÇA DO *Mycoplasma haemocanis* (HEMOPLASMA HEMOTRÓPICO) EM CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO E SUA INTERFERÊNCIA NO METABOLISMO ERITROCITÁRIO**

Autor: Mónica Alejandra Camargo Castillo

Orientador: Félix González

## **RESUMO**

A medicina veterinária transfusional desempenha um papel importante na estabilização do paciente crítico. Infelizmente, patógenos como *Mycoplasma haemocanis*, uma bactéria pleomórfica, pode estar presente no sangue do doador e serem transmitidos na transfusão. Os mycoplasmas hemotrópicos podem causar doença subclínica, onde portadores assintomáticos podem ser identificados como doadores de sangue saudáveis, aumentando o risco de infecção iatrogênica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos canino, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), correlacionando-se com o metabolismo eritrocitário durante o armazenamento. Foram selecionados oito cães negativos (Grupo Controle) e oito positivos (Grupo Mycoplasma) para *M. haemocanis*, previamente confirmados pela técnica de qPCR, clinicamente saudáveis, que atendiam aos critérios de inclusão como doadores. Uma bolsa de sangue (390 a 450 mL) contendo 63 mL de CPDA-1 foi coletada de cada animal selecionado e centrifugadas para obter o concentrado de eritrócitos. Alíquotas do concentrado de eritrócitos nos dias 1, 7, 18 e 29 durante o armazenamento a 4°C foram analisadas por qPCR para determinar a presença de *M. haemocanis* e foi padronizado o número de cópias/ $\mu\text{L}$  de sangue, usando um controle interno sintético. Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros pH, bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ), glicose, lactato e amônia. Os dados foram analisados por ANOVA entre os grupos Controle e Mycoplasma e correlação de Pearson para determinar as interações entre as variáveis. *M. haemocanis* foi detectado em concentrado de eritrócitos nos dias 1, 7, 18 e 29 de armazenamento. Diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre os grupos foram observadas ao longo do período de armazenamento. Não foram identificadas correlações entre o número de cópias/ $\mu\text{L}$  de *M. haemocanis* e os parâmetros bioquímicos avaliados. Mais estudos são necessários para avaliar o potencial de infecção de *M. haemocanis*. No entanto, os dados do presente estudo são uma grande contribuição, demonstrando o risco de transmissão a traves da transfusão de concentrado de eritrócitos.

Palavras chave: hemoplasma, hemocomponente, lesão de armazenamento, transfusão, cão.

**PRESENCE OF *Mycoplasma haemocanis* (HEMOTROPIC MYCOPLASMA) IN  
STORED CANINE ERYTHROCYTE CONCENTRATE AND ITS CORRELATION  
WITH ERYTHROCYTE METABOLISM**

Author: Mónica Alejandra Camargo Castillo

Advisor: Félix González

**ABSTRACT**

Veterinary transfusion medicine plays an important role in stabilizing the critically ill patient. Unfortunately, pathogens such as *Mycoplasma haemocanis* may be present in the donor's blood and be transmitted during the transfusion. Haemotropic mycoplasmas can cause subclinical disease, where asymptomatic carriers can be identified as healthy blood donors, increasing the risk of iatrogenic infection. The aim of this work was evaluating the survival of *M. haemocanis* in canine packed red blood cell, using the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique, correlating with erythrocyte metabolism. Eight negative (Control group) and eight positive (Mycoplasma group) dogs for *M. haemocanis*, previously confirmed by qPCR, clinically healthy, which met the inclusion criteria as blood donors were selected. Blood transfusion bags (390 to 450 mL) containing 63 mL of CPDA-1 were collected from the selected animals and centrifuged to obtain packed red blood cells. Sampling were performed on days 1, 7, 18 and 29 during storage at 4°C and samples were analyzed by qPCR for determinate the presence of *M. haemocanis*. Log copy number/ $\mu$ L blood in real-time PCR assay was standardize using a synthetic gene as internal control. The parameters evaluated included pH, bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), sodium ( $\text{Na}^+$ ), chlorine ( $\text{Cl}^-$ ), glucose, lactate and ammonia. Statistical analyzes were performed using the SAS 9.4 software by ANOVA between the negative and *M. haemocanis* positive groups, and finally a Pearson correlation were made to determine interactions between variables. *M. haemocanis* was detected in pRBC on days 1, 7, 18 and 29 of storage. Significant differences in biochemical parameters between the pRBC control and Mycoplasma group were observed over the course of storage. Correlations analysis were not identified between qPCR copy number/ $\mu$ L and biochemical parameters evaluated. Further studies are needed to assess the potential for *M. haemocanis* infection. However, the data from the present study are an important contribution, demonstrating the risk of transmission through the transfusion of canine packed red blood cell.

*Keywords:* hemoplasma, hemocomponent, storage lesion, transfusion, dog.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Metabolismo do eritrócito .....	5
<b>Figure 2</b> - Variations in ammonia concentration during pRBC storage .....	23
<b>Figure 3</b> - Variations in glucose concentration during pRBC storage .....	24
<b>Figure 4</b> - Variations in Lactate concentration during pRBC storage .....	25
<b>Figure 5</b> - Variations in pH during pRBC storage .....	26
<b>Figure 6</b> - Variations in bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) concentration during pRBC storage .....	27
<b>Figure 7</b> - Variations in sodium ( $\text{Na}^+$ ) concentration during pRBC storage.....	28
<b>Figure 8</b> - Variations in potassium ( $\text{K}^+$ ) concentration during pRBC storage.....	29
<b>Figure 9</b> - Variations in chloride ( $\text{Cl}^-$ ) concentration during pRBC storage.....	30
<b>Figure 10</b> - Variations in PCV percentage during pRBC storage.....	31
<b>Figure 11</b> - Variations in hemolysis percentage during pRBC storage .....	32



## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b> - Changes in ammonia, glucose, lactate, pH, bicarbonate, Na, K, Cl, PCV and percentage hemolysis of pRBC negatives (Control) and positives (Mycoplasma) for <i>M. haemocanis</i> .....	33
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3-diphosphoglycerate/2,3 difosfoglicerato
ACDA	Acid citrate dextrose adenosine/Citrato ácido dextrose e adenosina
ATP	Adenosine triphosphate/Adenosina trifosfato
CPD	Citrate phosphate dextrose/Citrato fosfato dextrose
CPDA-1	Citrate phosphate dextrose adenine/Citrato, fosfato, dextrose e adenina
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonate/Bicarbonato
HGB	Hemoglobin/Hemoglobina
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide/Nicotinamida adenina dinucleotídeo
pRBC	Packed red blood cell/Concentrado de eritrócitos
PCV	Packed Cell Volume/hematócrito

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Eritrócitos</b> .....	<b>3</b>
2.1.1	Hemoglobina .....	4
2.1.2	Metabolismo do eritrócito .....	4
<b>2.2</b>	<b>Concentrado de eritrócitos</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>Lesões de armazenamento</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4</b>	<b><i>Mycoplasma haemocanis</i></b> .....	<b>8</b>
2.4.1	Prevalência .....	8
2.4.2	Transmissão.....	9
2.4.3	Fisiopatologia.....	9
2.4.4	Sinais clínicos.....	9
2.4.5	Alterações laboratoriais.....	10
2.4.6	Diagnóstico .....	10
2.4.7	Tratamento .....	11
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>4.1</b>	<b>Artigo</b> .....	<b>14</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A medicina transfusional na medicina veterinária tem um papel importante na estabilização do paciente crítico. Com a implementação de transfusões como terapia de suporte, foram estabelecidos bancos de sangue veterinários para suprir a demanda das clínicas e realizar coletas, armazenamento e processamento adequados de hemocomponentes como o concentrado de eritrócitos (YAGI; HOLOWAYCHUK, 2016). Nos processos de transfusão de produtos sanguíneos podem se apresentar respostas indesejadas como reações imunomediadas e transferência de patógenos presentes no sangue do doador, agravando potencialmente a condição do paciente receptor transfundido. Portanto, os doadores de sangue devem ser adequadamente selecionados e testados como livres de agentes infecciosos, o que pode ser difícil devido às limitações laboratoriais, logísticas e de custos (WARDROP *et al.*, 2016).

Em 2016, o *American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)* atualizou a lista dos patógenos potencialmente infectantes que podem ser transmitidos nas transfusões sanguíneas de cães, dentre dos quais se incluem: *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Leishmania spp.*, *hemoplasmas*, *Hepatozoon spp.*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia felis*, *Trypanosoma cruzi* e *Brucella canis* (WARDROP *et al.*, 2016). Um deles, o *Mycoplasma haemocanis* é um organismo epicelular dos eritrócitos (WARDROP *et al.*, 2005), que pode causar doença subclínica, de forma que os animais assintomáticos podem ser identificados como doadores de sangue saudáveis e permanecer como portadores crônicos meses ou anos, mesmo tratados com antibióticos, aumentando o risco de infecção iatrogênica (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007a).

Devido às suas características metabólicas, *M. haemocanis* ainda não foi isolado com sucesso e o diagnóstico é limitado por falta de disponibilidade de testes sorológicos (HII *et al.*, 2015). Por esta razão, sua detecção é embasada na visualização em esfregaços sanguíneos que é pouco sensível e por técnicas moleculares como a PCR, considerada padrão ouro (WARDROP *et al.*, 2016).

Gary *et al.* (2006) demonstraram em felinos que *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ são detectáveis após o armazenamento do sangue com CPDA-1 (citrato fosfato dextrose adenina) por uma hora e uma semana, respectivamente. Esse estudo ainda enfatizou a importância do uso da PCR para a identificação de patógenos em doadores de sangue. No entanto, a sobrevivência do *M. haemocanis* após o armazenamento de sangue ou

hemocomponentes caninos com CPDA-1 não tem sido avaliada, sendo de grande importância, já que este patógeno depende do metabolismo do eritrócito para sobreviver e as transfusões podem ser um meio de transmissão entre os cães.

Atualmente, desconhece-se a relação entre o tempo de armazenamento de hemocomponentes como o concentrado de eritrócitos, o uso da solução conservante (CPDA-1), metabolismo da hemácia e sobrevivência de hemoplasmas no sangue armazenado para transfusão em cães, gerando a necessidade de estudar e entender os processos e alterações celulares no armazenamento, com a finalidade de diminuir o risco de infecção para os receptores e garantir a qualidade dos hemocomponentes para transfusão (WARDROP *et al.*, 2016). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença do *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos canino correlacionando-o com alterações no metabolismo do eritrócito durante o armazenamento. Esses dados irão colaborar para estudos futuros que visam determinar o potencial infectante em receptores.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Eritrócitos

Na espécie canina, as hemácias possuem 7 µm de diâmetro com 1,5 a 2,0 µm de largura, com uma vida média de 115 dias (SHALM; WILLIAM, 2010). As hemácias são células bicôncavas, sem núcleo ou demais organelas, o que impossibilita a síntese de ácidos nucleicos ou proteínas. A perda da mitocôndria durante a maturação resulta na perda da capacidade de realizar o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (SHALM; WILLIAM, 2010).

A função primária da hemácia é o transporte de oxigênio, dos pulmões aos tecidos e de dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões. A forma de disco bicôncavo é eficiente para a troca de oxigênio, e permite que a célula seja deformável e maleável para movimentar-se através da vasculatura (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

A membrana da hemácia consiste em uma bicamada lipídica que contém fosfolípidos, proteínas, colesterol, glicoproteínas e glicolípidos. Alterações na composição lipídica (principalmente fosfolípidos e colesterol) e proteínas da membrana pode resultar em formas anormais, comprometendo o citoesqueleto e a integridade da célula (SHALM; WILLIAM, 2010).

Estruturalmente, o citoesqueleto da hemácia está composto pela proteína espectrina, formando complexos com anquirina, actina e proteína banda 4.1 desde a membrana lipídica dando suporte e estabilidade. Os complexos de espectrina dependem da disponibilidade de ATP para funcionar adequadamente. Por tanto, a funcionalidade da hemácia depende da oferta de ATP e o dano oxidativo pode levar à perda da maleabilidade (HARRIS, 1990; MURADOR; DEFFUNE, 2007).

A membrana celular da hemácia apresenta uma distribuição assimétrica de fosfolípidos, com alto conteúdo de glicoproteínas como as glicoforinas (MURADOR; DEFFUNE, 2007). A proteína integral trans-membranal mais abundante das hemácias é a banda 3, e sua principal função é mediar a troca de cloro e ânions de bicarbonato através da membrana plasmática. A banda 3 contém sítios de ligação para proteínas do citoesqueleto e enzimas glicolíticas, desempenhando um papel na remoção de eritrócitos senescentes (HARRIS, 1990). A segunda proteína integral mais abundante na membrana é a sialoglicoproteína glicoforina A

(GPA). A GPA apresenta alto conteúdo de ácido siálico, portanto, fornece uma rede de carga negativa na superfície da membrana da hemácia para reduzir a interação célula-célula e prevenir sua aglutinação (HARRIS, 1990; MURADOR; DEFFUNE, 2007).

Água e ânions, como cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), fluem livremente através da membrana das hemácias. Acredita-se que isso ocorra por meio de canais de troca aniônica. Os cátions, no entanto, como sódio ( $\text{Na}^+$ ) (extracelular em maior proporção) e potássio ( $\text{K}^+$ ) (intracelular em maior proporção), na hemácia são controlados com bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependentes de ATP. A concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) também é controlada por bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes de ATP (HARRIS, 1990).

### 2.1.1 Hemoglobina

A hemoglobina é 95% do peso seco e 35% do volume da hemácia. A hemoglobina é composta por duas cadeias de globina alfa ( $\alpha$ ) e duas de globulina beta ( $\beta$ ), cada uma contendo um grupo heme que está composto por quatro anéis pirrólicos, com um núcleo de ferro em seu interior. O átomo de ferro no grupo heme liga-se aos quatro nitrogênios no centro do anel protoporfirínico, formando uma bolsa hidrofóbica na estrutura da molécula de globina, que protege da oxidação do ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). (HARRIS, 1990; SHALM; WILLIAM, 2010).

### 2.1.2 Metabolismo do eritrócito

Para fornecer energia, os eritrócitos dependem de duas vias metabólicas, via das pentoses-fosfato e a via da glicólise anaeróbica. Na via das pentoses-fosfato, é metabolizada cerca de 10% da glicose. A primeira enzima desta via é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que desvia glicose-6-fosfato (G6P) para ribose-5 fosfato. No processo, o nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP) é convertido em sua forma reduzida (NADPH), substrato utilizado para reduzir a glutatona pela enzima glutatona redutase. A G6PDH fornece o único meio de gerar NADPH e reduzir a glutatona; na ausência dela, os eritrócitos são vulneráveis a danos oxidativos (KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016) (Figura 1).

Da glicose que entra na hemácia, 90% é metabolizada por via anaeróbia ou via Embden-Meyerhof, a qual produz dois ATP por cada molécula de glicose, sendo a única via de ATP

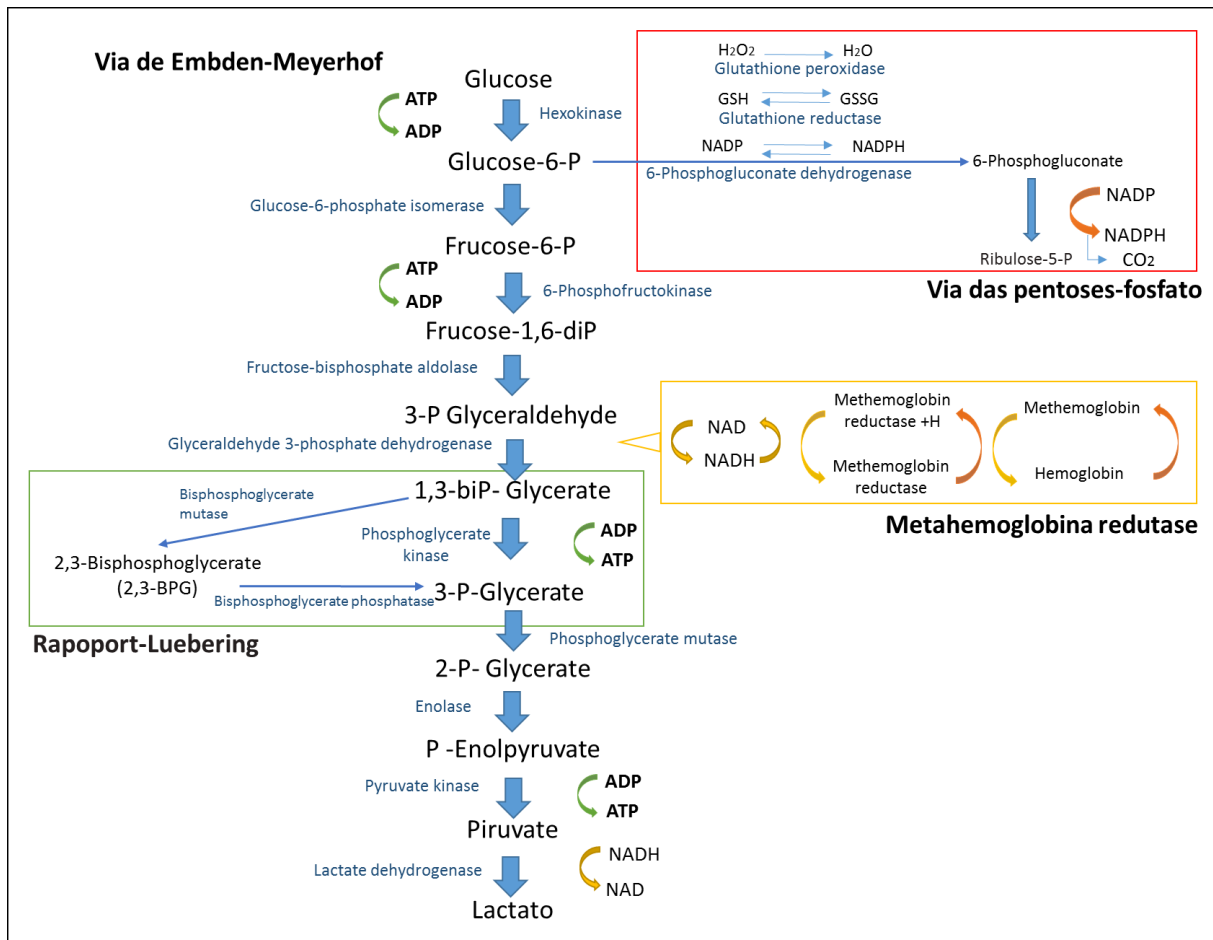


Figura 1 - Metabolismo do eritrócito (Modificado de KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016)

utilizável na célula. Por outro lado, a via Embden-Meyerhof, também gera nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), molécula necessária para reduzir a meta-hemoglobina para hemoglobina. Nesta via, o gliceraldeído-3-P (G3P) é oxidado a 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) através da ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD). O 1,3-DPG é desfosforilado pela fosfoglicerato quinase, que gera duas moléculas de ATP e 3-fosfoglicerato (3-PG). Posteriormente o 3-PG é isomerizado pela fosfoglicerato mutase a 2-fosfoglicerato (2-PG). A enzima enolase converte então o 2-PG em fosfoenolpiruvato (PEP), a piruvato quinase (PK) separa os fosfatos, formando piruvato e liberando duas moléculas de ATP. O piruvato torna-se lactato, um substrato da ação da lactato desidrogenase, com a regeneração da forma oxidada da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) (HESS, 2010; KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016). Dentro desta via, ocorre a derivação Rapoport-Luebering onde o 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) é desviado pela difosfoglicerato mutase para formar 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), deixando de produzir duas moléculas de ATP. O 2,3-DPG regula a liberação de oxigênio para os tecidos, através da



competição pelo sítio de ligação do oxigênio na hemoglobina, que ocorre quando o 2,3-DPG se liga ao grupo heme da hemoglobina. A degradação de 2,3-DPG a 3-fosfoglicerato (3-PG) é catalisada pela atividade da difosfoglicerato fosfatase, onde é formado 2-fosfoglicerato (2-PG). pela ação da difosfoglicerato mutase (KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016) (Figura 1).

Aproximadamente 3% da hemoglobina contida nos eritrócitos é oxidada a meta-hemoglobina e, através da enzima citocromo-b5-redutase (Cb5R) é constantemente reduzida a hemoglobina novamente. Para isso, os elétrons da NADH, gerados na glicólise, retornam o ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) ao seu estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ) para unir-se ao oxigênio (SHALM; WILLIAM, 2010; KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016).

## **2.2 Concentrado de eritrócitos**

O aumento da demanda de produtos sanguíneos na medicina veterinária, levou à separação dos componentes do sangue para proporcionar um uso mais específico e eficiente, evitando os riscos de fornecer partes desnecessárias do sangue (LOGAN *et al.*, 2001). Para a obtenção do concentrado de eritrócitos, o sangue total é centrifugado e o plasma sobrenadante é removido. O concentrado de eritrócitos, o qual também contém leucócitos, plaquetas, plasma remanescente e anticoagulante, é um dos componentes sanguíneos mais utilizado na clínica de pequenos animais (KISIELEWICZ; SELF; BELL, 2014).

Dependendo do anticoagulante, das soluções aditivas usadas e das condições do banco de sangue, o concentrado de eritrócitos pode ser armazenado entre 35 a 42 dias, a uma temperatura entre 1 e 6°C (PRITTIE, 2003; PATTERSON *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2017). O armazenamento desse hemocomponente deve ser constantemente monitorado, para a avaliar a qualidade das bolsas de sangue, devido a ocorrência de fatores limitantes que podem se apresentar como a hemólise, a qual pode interferir na capacidade dos concentrados de eritrócitos de transportar e fornecer oxigênio, diminuindo significativamente a eficácia da transfusão. Além de contribuir com a apresentação de reações transfusionais e mudanças bioquímicas e biomecânicas durante o armazenamento, também conhecidas como lesões de armazenamento (HARRELL; KRISTENSEN, 1995; PODER; NONKANI; TSAKEU LEPONKOUO, 2015 OBRADOR; MUSULIN; HANSEN, 2015).

### 2.3 Lesões de armazenamento

O envelhecimento das hemácias armazenadas em bolsas de sangue é caracterizado pela ocorrência de acúmulo significativo de alterações bioquímicas e morfológicas. Mudanças bioquímicas incluem uma queda no pH, diminuição nas concentrações de glicose, ATP e da 2,3-DPG, aumento do potássio extracelular, lactato e amônia, além de danos oxidativos e enzimáticos que afetam proteínas e lipídios da hemácia (D'ALESSANDRO *et al.*, 2015).

O solução preservativa de armazenamento (CPDA) tem um pH entre 5,0 a 6,0, que ao momento de misturar-se com o sangue muda para 7,2 aproximadamente (HESS, 2010). À medida que as hemácias degradam a glicose via anaeróbica, o lactato se acumula e o pH das células armazenadas diminui gradualmente. Como a glicólise diminui, o nível de ATP dos eritrócitos se reduz, alterando assim os diferentes mecanismos que controlam o equilíbrio eletrolítico da célula e a integridade da membrana, produzindo também um aumento na susceptibilidade ao dano oxidativo (HESS, 2010; ORLOV; KARKOUTI, 2015).

O bicarbonato tem um efeito tamponante no meio extracelular, que neutraliza os ácidos produzidos do metabolismo energético anaeróbico dos eritrócitos (DOS SANTOS SOUSA *et al.*, 2012), assim como o efeito produzido pelo contato do sangue com a solução preservativa da bolsa de sangue, que também tem um pH ácido (HEINZ *et al.*, 2016). Essas são as causas prováveis dos relatos da diminuição gradual do bicarbonato durante o armazenamento de sangue (STERLING; REITHMEIER; CASEY, 2001; DOS SANTOS SOUSA *et al.*, 2012).

No armazenamento, a atividade das bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de ATP no eritrócito são reduzidas. Portanto, com a diminuição do ATP no armazenamento há um aumento de potássio ( $\text{K}^+$ ) extracelular, um acúmulo de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) no interior da célula, fato atribuído também à baixa temperatura de armazenamento (HESS, 2010). Além disso, aumento nas concentrações de cloro em concentrados de eritrócitos caninos têm sido reportados a partir do 28º dia de armazenamento, sugerindo que depósitos de cloro intracelular sejam liberados por causa da hemólise (WILSON *et al.*, 2017).

Durante o armazenamento de hemocomponentes, tem sido observado um aumento na concentração de amônia, resultado do catabolismo de compostos nitrogenados, como a desaminação de proteínas intra-eritrocitárias, aminoácidos e purinas como adenina, encontrada também em soluções conservantes (CONN, 1966; OBRADOR; MUSULIN; HANSEN, 2015).

A adenina é um precursor para a produção de ATP dos eritrócitos e pode contribuir à formação de amônia adicional nas bolsas de sangue durante o armazenamento (PECK *et al.*, 1981; WILSON *et al.*, 2017).

Além das alterações bioquímicas que podem alterar a qualidade dos produtos sanguíneos, patógenos potencialmente infectantes podem ser transmitidos nas transfusões, dentro dos quais se incluem o *M. haemocanis*, o qual pode causar doença subclínica e esses portadores assintomáticos podem ser identificados como doadores de sangue saudáveis, aumentando o risco de infecção iatrogênica (WARDROP *et al.*, 2016).

## 2.4 *Mycoplasma haemocanis*

O *M. haemocanis* é uma bactéria pleomórfica, epicelular, Gram negativa, que se fixa e desenvolve na superfície das hemácias de vertebrados (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007<sup>a</sup>; PETERS *et al.*, 2008; DE SOUSA *et al.*, 2017;). Anteriormente foi classificado como membro da ordem *Rickettsia*, do gênero *Hemobartonella* e *Eperythrozoon*, família Anaplasmataceae. No entanto, baseado nas características moleculares (análises da sequência do gene 16S rRNA) e características fenotípicas como tamanho (< 1 µm), ausência de parede celular e flagelos, resistência a penicilinas ou análogos e susceptibilidade a tetraciclinas foram reclassificados no gênero *Mycoplasma*, família Mycoplasmataceae, classe *Mollicutes*. Além disso, por sua característica de aderência à superfície do eritrócito, representam um novo agrupamento distinto dentro do gênero *Mycoplasma* e receberam o nome de mycoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas (CHALKER; BROWNLIE, 2004; MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007<sup>b</sup>; PETERS *et al.*, 2008; BARKER *et al.*, 2011).

### 2.4.1 Prevalência

Mycoplasmas hemotrópicos de cães, como o *M. haemocanis*, têm sido descritos em todo o mundo (BARKER *et al.*, 2010; NOVACCO *et al.*, 2010; ROURA *et al.*, 2010; COMPTON; MAGGI; BREITSCHWERDT, 2012; HII *et al.*, 2012). No Brasil, os mycoplasmas hemotrópicos caninos foram relatados nas regiões Nordeste (RAMOS *et al.*, 2010), Sudeste (ALVES *et al.*, 2014; CONSTANTINO *et al.*, 2017), Sul (VALLE *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2016) e Centro-Oeste (DE SOUSA *et al.*, 2017), detectando a presença de *M. haemocanis* em todas as regiões do país (BIONDO *et al.*, 2009).

#### 2.4.2 Transmissão

A transmissão dos hemoplasmas ainda não está completamente esclarecida, mas acredita-se que o patógeno possa ser transmitido através da picada de vetores hematófagos, como pulgas e carrapatos, sendo suspeito como principal vetor o carrapato do cão, o *Rhipicephalus sanguineus*. A transmissão também pode ocorrer devido a transfusão sanguínea e/ou fômites contaminados, assim como pela via transplacentária (WILLI *et al.*, 2007b, 2010; NOVACCO *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2016).

#### 2.4.3 Fisiopatologia

A fisiopatologia da infecção pelos hemoplasmas ainda não está completamente definida; vários mecanismos têm sido propostos, incluindo, a produção de radicais livres pelo organismo que induzem a oxidação e dano de membrana celular do hospedeiro; e a secreção de enzimas que podem levar ao rompimento das células (MESSICK, 2004).

Outros mecanismos patogênicos incluem depleção de nutrientes ou precursores biossintéticos, levando a danos nas células hospedeiras e ao desenvolvimento de anticorpos que desencadeiam distúrbios imunológicos comprometendo o metabolismo das hemácias (WILLI *et al.*, 2007; BARKER *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; DO NASCIMENTO *et al.*, 2012;).

#### 2.4.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos atribuíveis aos hemoplasmas em cães são variáveis e inespecíficos, e a gravidade da doença depende da espécie de hemoplasma infectante e da presença de doenças concomitantes ou infecções (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004; ROURA *et al.*, 2010). O espectro clínico da infecção varia de assintomático a um estado comprometedor da vida do animal, dependendo parcialmente da suscetibilidade do hospedeiro e dos fatores de risco (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004).

A forma aguda, na qual, se apresentam sinais clínicos entre 1 a 2 semanas após a infecção-ativação (PRYOR; BRADBURY, 1975), é associada com anemia grave de rápido desenvolvimento, na maioria das vezes em cães imunocomprometidos ou esplenectomizados (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004). Sinais concomitantes, incluindo letargia, perda de peso, febre e anorexia também são encontrados em alguns casos. Em casos mais graves, ocorre anemia hemolítica aguda que geralmente se resolve. No entanto, em alguns cães isso

pode levar à morte ( KEMMING *et al.*, 2004; MESSICK, 2004; CHALKER, 2005; WENGI *et al.*, 2008).

A forma crônica geralmente é assintomática, ocorrendo em animais aparentemente saudáveis e imunocompetentes que geralmente não desenvolvem a sintomatologia da doença, sendo necessária uma imunossupressão, esplenectomia, doenças associadas ou estresse para que os sinais clínicos tornarem-se evidentes (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004). Os animais infectados com hemoplasmas, mesmo sendo tratados com antibióticos, provavelmente permanecem como portadores crônicos após a resolução dos sinais clínicos apresentados na fase aguda da doença, por meses a anos (KEMMING *et al.*, 2004b).

#### 2.4.5 Alterações laboratoriais

Provavelmente os achados hematológicos e bioquímicos variem e dependam do estágio clínico da doença (VALLE *et al.*, 2014). Entretanto, as infecções do hemoplasma clinicamente manifestadas têm sido associadas a anormalidades hematológicas como anemia regenerativa, macrocítica e normocrômica, com valores de hematócritos de até 11% (MESSICK, 2004; HII *et al.*, 2015; CANNON *et al.*, 2016;), reticulocitose, anisocitose, policromasia e corpúsculos de Howell-Jolly podem ser verificados (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007a). Presença de esferócitos, leucocitose e trombocitopenia também foram relatadas (MESSICK, 2004; HII *et al.*, 2015;). A bioquímica sanguínea pode revelar hiperbilirrubinemia, hiperproteinemia e aumento dos níveis séricos de atividade das enzimas hepáticas que pode resultar de danos hipóxicos (WILLI *et al.*, 2007a). A infecção crônica tem sido associada com anemia discreta, leucopenia e apatia em cães infectados experimentalmente (MESSICK, 2004). Mesmo assim, é importante sinalizar que a anemia não é característica da doença produzida pelo *M. haemocanis*, e é relatada em vários estudos com baixa prevalência (WENGI *et al.*, 2008; ROURA *et al.*, 2010; HII *et al.*, 2015).

#### 2.4.6 Diagnóstico

*M. haemocanis* nunca foi isolado pela cultura tradicional (DO NASCIMENTO *et al.*, 2012). Entretanto, o diagnóstico de infecções por hemoplasmas pode ser realizado através de diversas ferramentas como a citologia dos organismos em esfregaços sanguíneos, testes moleculares como PCR convencional e PCR em tempo real (BRINSON; MESSICK, 2001; BARKER *et al.*, 2010;), testes de Western *immunoblot* e imunofluorescência de anticorpos

(WILLI *et al.*, 2007<sup>a</sup>; NOVACCO *et al.*, 2010;). Além disso, o diagnóstico terapêutico pode ser realizado avaliando a resposta clínica do animal ao tratamento com drogas de eleição para tratar o *Mycoplasma* spp. (BRADDOCK; TASKER; MALIK, 2004).

Nos esfregaços sanguíneos corados por Romanowsky, os hemoplasmas são diagnosticados com uma baixa sensibilidade (TASKER *et al.*, 2010; MASCARELLI *et al.*, 2016), e a especificidade diagnóstica é frequentemente prejudicada por artefatos como precipitados de corante ou corpúsculos Howell-Jolly (TASKER *et al.*, 2003; WILLI *et al.*, 2007a).

A PCR é o método padrão-ouro para diagnosticar infecções pelos hemoplasmas. Todos os ensaios de PCR desenvolvidos até o presente momento baseiam-se no gene 16S rRNA dos hemoplasmas e permitem a amplificação do gene alvo específico a partir de amostras de sangue ou tecido de animais infectados (MESSICK, 2003). Também são desenvolvidos ensaios quantitativos de PCR em tempo real por serem altamente específicos e permitir quantificação do DNA dos hemoplasmas (BARKER *et al.*, 2010).

#### 2.4.7 Tratamento

Nenhum tratamento tem sido estabelecido consistentemente para eliminar a infecção por hemoplasmas. No entanto, foi relatado que os antibióticos doxiciclina e enrofloxacina reduzem as cargas do microorganismo no sangue e os sinais clínicos (KEMMING *et al.*, 2004a; PITORRI *et al.*, 2012), mas a eficácia na eliminação da hemoplasmosse canina e investigações sobre a duração mínima da terapia não foram estabelecidas (PITORRI *et al.*, 2012).

Previamente foi documentada uma diminuição no número de cópias de *M. haemocanis* e resolução dos sinais clínicos num cão esplenectomizado, mas não a eliminação do organismo, com a administração prolongada durante 100 dias de oxitetraciclina e subsequentemente 240 dias de enrofloxacina (HULME-MOIR *et al.*, 2010). Em outro caso, foi observada uma redução acentuada no número de cópias de *M. haemocanis* e nos sinais clínicos no início da terapia, mas resultados negativos de qPCR foram obtidos depois de 3 meses de tratamento com doxiciclina (PITORRI *et al.*, 2012).

A combinação de antibióticos com corticosteroides como prednisolona para limitar a hemólise e a fagocitose de hemácias foi recomendada por alguns autores (WILLI *et al.*, 2007a). No entanto, o uso de corticosteróides pode ter um impacto negativo na infecção com a supressão

da resposta imune do hospedeiro em casos no confirmados (WILLI *et al.*, 2007<sup>a</sup>; PITORRI *et al.*, 2012).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a presença de *Mycoplasma haemocanis* em concentrado de eritrócitos canino através da técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), realizando uma correlação com o metabolismo eritrocitário.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a presença do *M. haemocanis*, em cães com infecção assintomática, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (qPCR) e a presença do organismo em concentrado de eritrócitos com CPDA-1 durante os dias 1, 7, 18 e 29 de armazenamento.
- Avaliar as lesões de estoque em concentrado de eritrócitos com CPDA-1 nos dias 1, 7, 18 e 29 durante o armazenamento a 4°C.
- Correlacionar o número de cópias de DNA de *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos caninos com o metabolismo dos eritrócitos e lesões de estoque durante o armazenamento a 4°C.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados em forma de artigo científico que será submetido para publicação.

### 4.1 Artigo

#### **ERYTHROCYTE METABOLISM IN CANINE PACKED CELL BLOOD CELL WITH *Mycoplasma haemocanis***

Monica Alejandra Camargo Castillo <sup>a</sup>, Bruno Albuquerque de Almeida <sup>a</sup>, Daiani Wissmann <sup>a</sup>,  
Felipe Yuki Okano <sup>a</sup>, João Fabio Soares <sup>a</sup>, Stella de Faria Valle <sup>a\*</sup>, Felix González <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Veterinary Clinical Pathology, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre – RS, Brazil

\* Corresponding author.

E-mail address: [stella.valle@ufrgs.br](mailto:stella.valle@ufrgs.br)

Postal address: Avenida Bento Gonçalves, 9090, LACVet, CEP 91540-000, Porto Alegre - RS Brazil.

Tel.: +55 51 3308-8033

#### **Abstract**

**Background:** Veterinary transfusion medicine plays an important role in stabilizing the critically ill patient. Unfortunately, pathogens such as canine hemoplasmas can cause subclinical disease and asymptomatic carriers can be identified as healthy blood donors. Besides, the survival of *Mycoplasma haemocanis* after canine hemocomponents storage with CPDA-1 has not been evaluated, being of great importance, because this pathogen depends of erythrocyte metabolism to survive and the blood transfusions can contribute with a transmission between dogs.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the survival of *M. haemocanis* in canine packed red blood cell, using the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and correlating with erythrocyte metabolism.

**Animals:** Ten positive and ten negative dogs for *M. haemocanis*, previously confirmed by qPCR, were selected that met the inclusion criteria as blood donors.

**Methods:** Packed red blood cells (pRBCs) were obtained from the selected dogs. Samples from days 1, 7, 18 and 29 during storage at 4°C were analyzed by qPCR for determinate the presence of *M. haemocanis* and were evaluated the parameters pH, bicarbonate, K, Na, CL, glucose, lactate and ammonia, PCV and hemolysis percentage.

**Results:** *M. haemocanis* could be detected in pRBC on days 1, 7, 18 and 29 during storage. Significant differences between Control and Mycoplasma group were observed over of storage in biochemical parameters analyzed during the storage. Correlations analysis were not identified between *M. haemocanis* blood loads and biochemical parameters.

**Conclusions and clinical importance:** *M. haemocanis* altered biochemical parameters as ammonia, glucose, lactate, pH, bicarbonate and electrolytes concentrations on canine pRBC, supported with significant differences between Control and Mycoplasma group. Studies are needed to assess the potential for *M. haemocanis* infection. However, the data from the present study are an important contribution, demonstrating the risk of transmission through the transfusion of canine packed red blood cell.

**Keywords:** hemoplasma, hemocomponent, storage lesion, transfusion, dog.

## 1 Introduction

2 Small animal blood transfusions have been successfully performed since 1665 and have  
3 become more common in the last 60 years (DAVIDOW, 2013). Unfortunately, pathogens  
4 present in the donor's blood can be transmitted by transfusion (WARDROP *et al.*, 2005).  
5 Therefore, blood donors must be properly selected and must be free of infectious agents, which  
6 can be difficult due to laboratory, logistical and cost limitations. Current recommendations to  
7 decreases the risk of transmission of infectious diseases include appropriately screened for  
8 infectious agents of blood donors for *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma* spp., *Babesia* spp.,  
9 *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Leishmania* spp., *hemoplasmas*, *Hepatozoon* spp, *Leishmania*

10 spp., *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia felis*, *Trypanosoma cruzi* e *Brucella canis* (WARDROP  
11 *et al.*, 2016).

12 *M. haemocanis* is an epicellular organism that attach to erythrocytes surface, which can  
13 cause subclinical disease in dogs. Since asymptomatic chronic carriers dogs can remain infected  
14 for months or years, even if these are treated with antibiotics (WARDROP *et al.*, 2016), these  
15 can be identified as healthy blood donors, (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007a).  
16 Identification of *M. haemocanis* is limited due to the lack of availability of rapid tests to use in  
17 blood banks routine, and the isolation has not still been achieved due to the metabolic  
18 characteristics of hemoplasmas, being the PCR the gold standard method for detection  
19 (MESSICK, 2004; BARKER *et al.*, 2010; HII *et al.*, 2015).

20 Previous studies in cats suggested that feline blood donors should be screened for  
21 hemoplasma by PCR, based in the transmission of *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) and  
22 ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (Mhm) in stored blood products in CPDA-1  
23 (GARY *et al.*, 2006). In dogs, the survival of *M. haemocanis* after storage of hemocomponents  
24 with CPDA-1 storage has not been evaluated, being of great importance, because this pathogen  
25 depends of erythrocyte metabolism to survive and the blood transfusions can be an iatrogenic  
26 transmission pathway. The objective of the present study was to evaluate the presence of *M.*  
27 *haemocanis* in packed red blood cells (pRBC) submitted to storage, assessing their interactions  
28 from the erythrocyte metabolism.

## 29 **Materials and Methods**

### 30 **Animal selection**

31 Sixteen dog’s donors, regardless of gender or breed, presented in a public veterinary hospital  
32 were evaluated. These animals satisfied the inclusion criteria: age between one and eight years  
33 old, weight greater than 28 kg, vaccines and dewormers up to date, neutered, with clinical and  
34 laboratory parameters within reference intervals. Besides, negative result in serological test for  
35 *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*,  
36 *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* using the SNAP 4Dx Plus (IDEXX) and *Leishmania*  
37 spp., with the SNAP Leishmania Test (IDEXX). Eight dogs negative (Control group) and eight  
38 positive (Mycoplasma group) for *M. haemocanis* (n = 16), with PCV of  $\geq 45\%$ , previously  
39 confirmed by qPCR were selected. This study was developed with a protocol approved by the

40 Animal Ethical Use Committee from the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS),  
41 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (protocol number 35648) and all owners authorized  
42 the participation.

### 43 **Sample collection**

44 Blood samples were collected in two EDTA-K<sub>2</sub> and serum gel tube, and were submitted  
45 to CBC, serological and molecular tests. One day after confirmation of *M. haemocanis*  
46 positivity the whole blood (450 mL) was obtained from each dog and stored in a CPDA-1 in a  
47 satellite blood bags (CompoFlex, Fresenius-Kabi) until separation. All dog donors were  
48 positioned in lateral decubency, followed by trichotomy of the ventral cervical region and  
49 aseptic preparation using alcohol 70%, for jugular venipuncture.

50 The parameters of weight, blood flow and homogenization from blood bags were  
51 mechanically controlled (Biomixer 323, Ljungberg & Kögel), until the desired volume was  
52 completed (between 390 to 450 mL). The whole blood was kept undisturbed for 1 hour and  
53 posteriorly was centrifuged at 4,050g for 7 minutes using a refrigerated centrifuge (Novatecnica  
54 NT850). The centrifuged blood bags were fractionated in to non-leukoreduced pRBC and fresh  
55 plasma. On days 0, 7, 18 and 29 of storage, two aliquots of 1 mL and 7 mL from each pRBC  
56 was aseptically separated (Sampling Site Coupler, Fenwal).

### 57 **Analytical methods**

58 CBC was performed using an automatic analyzer (ProCyte Dx IDEXX). The pRBC  
59 units were manually mixed for one minute prior to the sampling. Aliquot of 1 mL from pRBC  
60 were submitted to measure of pH, bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), potassium (K<sup>+</sup>), sodium (Na<sup>+</sup>) and  
61 chloride (Cl<sup>-</sup>) using a blood gas analyzer (Cobas b121, Roche). Packed Cell Volume (PCV)  
62 were accomplished using the microhematocrit technique. Total hemoglobin (HGB) were  
63 measured using hemoglobinometer (HemoCue Hb 301, Fresenius) after dilution 1:1 with saline  
64 solution. Hemolysis percentage was determined, using the following formula (SOWEMIMO-  
65 COKER, 2002):

$$66 \quad \% \text{ hemolysis} = \text{supernatant HGB (g/dL)} \times (100 - \text{PCV}) / \text{total HGB (g/dL)}$$

67 From 7 mL aliquots, a 6 mL were centrifuged at 3,300 g for 10 minutes (Heraeus  
68 Megafuge 8, Thermo Scientific) and the supernatant was submitted to lactate and ammonia

69 determinations (Catalyst Dx Chemistry Analyzer, IDEXX laboratories) and glucose and HGB  
70 concentration were obtained by enzymatic colorimetric method in an automatic  
71 spectrophotometer (CM 200, Wiener Lab Group). Aliquots of 1 mL were placed in sterile tubes  
72 for molecular test, stored at -80 °C during 48 hours until processing.

73 DNA was extracted from 200 µL of whole blood (PureLink Genomic DNA MiniKit),  
74 quantified (NanoDrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific) and immediately stored at -  
75 8°C until qPCR analysis. Before DNA extraction, all pRBC samples were standardized with  
76 sterile PBS for 45% hematocrit. Samples were analyzed by qPCR of *M. haemocanis* using 16S  
77 rRNA gene sequence data, primers and TaqMan probes targeted as previous described (Barker  
78 et al. 2010), with forward primer 5' GTGCTACAATGGCGAACACA 3', reverse primer 5'  
79 TCCTATCCGAACTGAGACGAA 3' and probe 5' FAM-  
80 TGTGTTGCAAACCAGCGATGGT-BHQ1 3'. The reactions were performed using an initial  
81 denaturation at 95°C for 15 min followed by 45 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s,  
82 during which fluorescence data were collected (StepOnePlus Real-Time PCR system, Applied  
83 Biosystems, Life Technologies). Negative controls (ultrapure water) were included in each  
84 qPCR run. All reactions were performed in duplicate and the results were reported as means  
85 (copies/µL). The qPCR technique was performed with the following modifications: 10 µL  
86 TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), 0.75 µL of each  
87 primer (10 nM/µL), 0.25 µL TaqMan probe (10 nM/µL), 2 µL DNA and 7.25 µL ultrapure  
88 water in a total volume of 21 µL for reaction.

89

90 Standard curve was constructed using a commercial plasmid containing a fragment of  
91 16S rRNA synthetic gene of 283bp inserted into pMA-RQ (AmpR) vector Backbone. The  
92 plasmidial DNA was purified from transformed bacteria and concentration determined by UV  
93 spectroscopy. The final construct was verified using next-generation sequencing (NGS). This  
94 plasmid was used to determine hemoplasma reaction specificity, sensitivity and efficiency. The  
95 plasmids were diluted and was standardized a 10-fold serial dilution of each plasmid (range: 6  
96 to 600,000 copies/reaction). Upon completion of sampling on day 29, pRBC bags were sent for  
97 aerobic and anaerobic blood culture.

98

99

100

## 101 **Statistical analyses**

102 Variables were evaluated using commercial software (IBM SPSS Statistics software,  
103 version 22.0, IBM Corp. Armonk, 2013). Hematocrit, hemolysis, ammonia, glucose, lactate,  
104 pH,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and mycoplasma presence were considered as dependent variables.  
105 Independent variables were considered Control and Mycoplasma group, and Day evaluation 1,  
106 7, 18 and 29. Independent and dependent variables were submitted with repeated-measures  
107 analysis of variance using a linear model type of the generalized estimating equation. Pearson  
108 correlation test between variables were performed. Differences  $P \leq 0.05$  were considered  
109 significant for all hypothesis tests.

## 110 **Results**

111 Biochemical changes from pRBC Control and Mycoplasma group at 1, 7, 18 and 29  
112 days of storage are showed in Table 1. In pRBC control group, mean ammonia (Figure 1),  
113 lactate (Figure 3), Na (Figure 6), K (Figure 7), Cl (Figure 8) and hemolysis percentage (Figure  
114 10) increased significantly during the storage. The mean of glucose (Figure 2), pH (Figure 4),  
115 bicarbonate (Figure 5) decreased significantly during storage. PCV percentage did not differ  
116 over storage (Figure 9). In pRBCs Mycoplasma group, ammonia (Figure.1), lactate (Figure 3),  
117 K (Figure 6), Cl (Figure 8) and hemolysis percentage (Figure 10) increased significantly during  
118 the storage. The mean of glucose (Fig. 2), pH (Fig. 4), bicarbonate (Fig. 5) decreased  
119 significantly during storage period. Both Na (Figure 6) and PCV (Figure 9) did not differ in the  
120 time.

121 Significant differences were observed between Control and Mycoplasma groups in  
122 ammonia during all storage, glucose on day 7 and 18 of storage, lactate at day 7, pH on days 1  
123 and 7, bicarbonate at days 1, 7 and 18, sodium on day 7, potassium on days 7 and 18 and PCV  
124 on days 1 and 18 (Table 1).

125 Copy number/ $\mu\text{L}$  from qPCR whole blood of dogs and Mycoplasma group during  
126 storage did not differ statistically in the time ( $P > 0.05$ ). All qPCR ultrapure water controls were  
127 negative. Correlations analysis did not show interactions between qPCR blood loads and  
128 biochemical parameters ( $P \geq 0.05$ ). Aerobic and anaerobic bacterial culture were negative in  
129 100% of samples.

130 **Discussion**

131 During canine pRBC storage, we related the presence of loads of *M. haemocanis* during  
132 29 days and their likely correlation with erythrocyte metabolism. Significant differences  
133 between the pRBC Control and Mycoplasma group were observed over the course of storage.  
134 Correlations analysis were not identified between qPCR copy number/ $\mu$ L and biochemical  
135 parameters.

136 The biochemical parameters analyzed showed significant changes during the canine  
137 pRBC storage in the two groups. Glucose and pH showed a decrease, accompanying with an  
138 increase in lactate concentrations, similar to previously describe in canine pRBC stored in  
139 CPDA (PRICE *et al.*, 1988) and canine pRBC stored in polyvinyl chloride bags containing  
140 acid-citrate-dextrose-adenosine (ACDA) with additive solution AS-3 (dextrose monohydrate,  
141 sodium citrate, sodium chloride, sodium phosphate, citric acid monohydrate and adenine)  
142 (WILSON *et al.*, 2017). These changes could be explain because the erythrocyte continued  
143 consuming glucose during storage, to preserve energy metabolism through anaerobic glycolysis  
144 (ORLOV; KARKOUTI, 2015). Glucose is metabolized to piruvate and reduced to lactate,  
145 generating two moles of ATP for each mole of glucose (ALLEN; HOLM, 2008). The lactate  
146 produced accumulates and consequently decreases pH (HOGMAN; MERYMAN, 1999). The  
147 pRBC pH also can be influenced by the blood contact with the acidic preservative solution, that  
148 can modify the mechanisms that control the electrolyte balance of the cell (HESS, 2010).

149 Statistical differences were observed between Control and Mycoplasma groups for  
150 variables pH, glucose and lactate, on days 1, 7 and 18, where glucose concentration from the  
151 Mycoplasma group was lower in comparison to Control group and lactate concentration was  
152 higher in Mycoplasma group that in negative samples. These changes could be attributed to *M.*  
153 *haemocanis* metabolic pathways, limited to enzymes of the glycolytic pathway which  
154 apparently rely heavily on the nutrients like glucose afforded by its host environment (DO  
155 NASCIMENTO *et al.*, 2012). Therefore, it is a probable reason for the colonization of the  
156 epierythrocytic environment that is rich in glucose (BARKER *et al.*, 2011), carrying to a  
157 competition of nutrients between the pathogen and the erythrocyte, limiting the production of  
158 energy of the erythrocytes, which can cause oxidative stress and shorten the life of the cells.  
159 (SANTOS *et al.*, 2011)

160 In the present study, changes in electrolyte concentration were observed during the  
161 blood storage. Significant increase in Na and K extracellular in pRBC was a well-documented  
162 change in stored canine and feline pRBC (PRICE *et al.*, 1988; LACERDA *et al.*, 2014; HEINZ  
163 *et al.*, 2016; WILSON *et al.*, 2017). In erythrocytes, the Na/K pump maintains the balance of  
164 gradient, which is dependent on ATP levels, temperature and pH (HOGMAN; MERYMAN,  
165 1999). Blood stored between 1 to 6°C decreases cell metabolism and energy demand, negatively  
166 influencing the activity of ion transporters (ADAMS *et al.*, 2015; OBRADOR; MUSULIN;  
167 HANSEN, 2015). At days 7 and 18, statistical differences in Na and K were observed between  
168 groups. In hemoplasmas, cation transporter proteins, with carrier electrolyte such as cobalt,  
169 magnesium, potassium and sodium have been identified (BARKER *et al.*, 2011), suggesting  
170 that, hemoplasmas have the potential to obtain amino acids, glucose, phosphates and cations  
171 from their environment (BARKER *et al.*, 2011).

172 Chloride concentration increased in both groups on days 1, 7 and 18 in the pRBC during  
173 storage. This finding is in contrast to reports of human pRBC stored in CPDA-1, where Cl did  
174 not present a significant change (LATHAM; BOVE; WEIRICH, 1982; BENNETT-  
175 GUERRERO *et al.*, 2007; ADIAS, T. C. ZACCHEAUS, A. MOORE-IGWE, 2012) or in canine  
176 pRBC in ACDA solution, where chloride remained static on the initial four weeks of storage  
177 and after presented a significant rise on day 28 (WILSON *et al.*, 2017). A decrease in  
178 bicarbonate also was observed, probably due to the buffering effect (STERLING;  
179 REITHMEIER; CASEY, 2001) and electrolyte shifts within the storage solution, which can  
180 also be attributed to hemolysis, probably by chloride exit from the erythrocyte (SPARROW,  
181 2012; WILSON *et al.*, 2017).

182 Ammonia concentration increased over the time of storage in both groups with  
183 differences between them. Ammonia increases were reported in canine and human pRBC and  
184 whole blood during storage (LATHAM; BOVE; WEIRICH, 1982; WADDELL *et al.*, 2001;  
185 WILSON *et al.*, 2017). This increase has been associated with the production within the  
186 erythrocyte, by the deamination of proteins, amino acids and purines, like adenine, also found  
187 in preservative solutions such as CPDA-1 (CONN, 1966; OBRADOR; MUSULIN; HANSEN,  
188 2015; WILSON *et al.*, 2017). A study of *M. haemocanis* genome relate their capacity of  
189 producing ATP from adenine acquired from environment (DO NASCIMENTO *et al.*, 2012),  
190 which likely contribute to the formation and accumulation of additional ammonia in the  
191 Mycoplasma group in the pRBC of the present study.



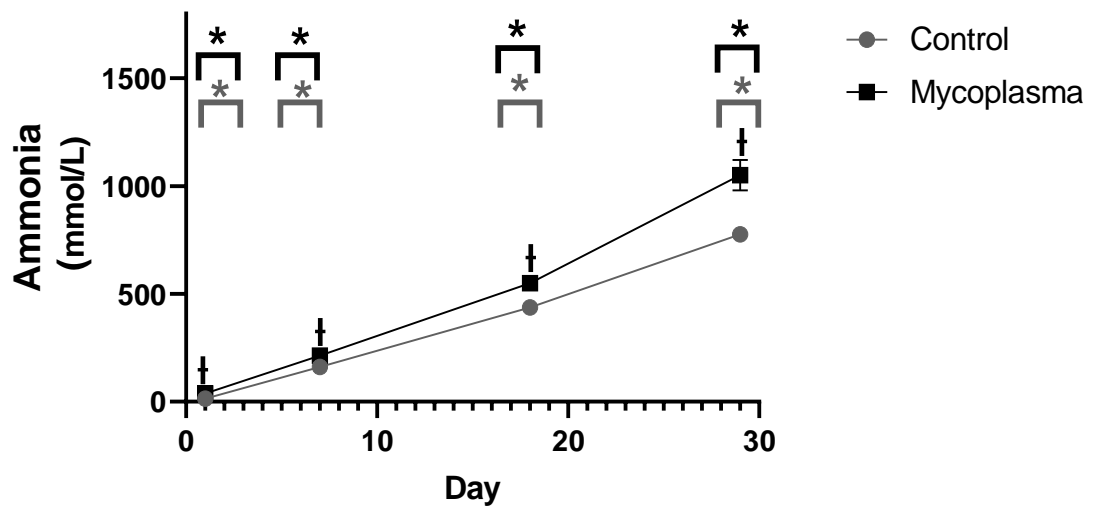
192 We evaluated the presence of *M. haemocanis* in pRBC. *M. haemocanis* blood loads  
193 between the days 1 to 29 of storage did not differ statistically between periods of storage. Our  
194 results are similar to those reported with feline whole blood stored in CPDA-1 solution,  
195 inoculated with *M. haemofelis* and *Candidatus Mycoplasmas haemominutum*, where DNA was  
196 amplified from the blood bags after 1 h, 1 week, and 1 month of storage and the standardized  
197 blood loads did not increase over the time (GARY *et al.*, 2006) suggesting no hemoplasma  
198 replication.

199 In the present study, inoculation or transfusion of pRBC units with *M. haemocanis* to  
200 recipient dogs did not perform to confirm virulence after storage. Besides *M. haemocanis*  
201 isolation by culture have been not reach (DO NASCIMENTO *et al.*, 2012) and detection of 16S  
202 ribosomal RNA (rRNA) gene only describe presence but no metabolic status or survival of this  
203 pathogen, being hard determinate its viability. No statistical changes of the *M. haemocanis*  
204 blood loads stored also suggested no DNA alteration or degeneration by CPDA-1 solution of  
205 preservation or low temperatures. However, cats infected experimentally with *M. haemofelis*  
206 blood stored, results positive, suggesting that *M. haemofelis* remains viable for at least 1 week  
207 in blood bags stored, detecting a major DNA copies of hemoplasma in the blood of the recipient  
208 cat (GARY *et al.*, 2006).

209 Finally, in countries such as Brazil, different mycoplasma species have been detected in  
210 both rural and urban areas (BIONDO *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2014; VALLE *et al.*, 2014;  
211 SOARES *et al.*, 2016; DE SOUSA *et al.*, 2017) . For this reason, it is necessary to carry out  
212 complete molecular analyzes for hemoplasmas and other pathogens in dog donors, as was  
213 suggested by ACVIM (WARDROP *et al.*, 2016), to reduce the risk of disease transmission  
214 through the transfusion of blood products.

215 In conclusion, the results of the present study demonstrate that *M. haemocanis* DNA  
216 remain in canine pRBC during 29 days of storage. Blood loads was not correlated with RBC  
217 metabolism and should not be used as a virulence index. As previous discussed, Control and  
218 Mycoplasma groups showed changes in the biochemical parameters like ammonia, glucose,  
219 lactate, pH, bicarbonate and electrolytes, these changes may be associated with nutrients  
220 competition between the pathogen and the erythrocyte. Mycoplasma species can be detected in  
221 blood donors and blood components, therefore test detection should be done routinely.

**Figure 2 - Variations in ammonia concentration during pRBC storage**



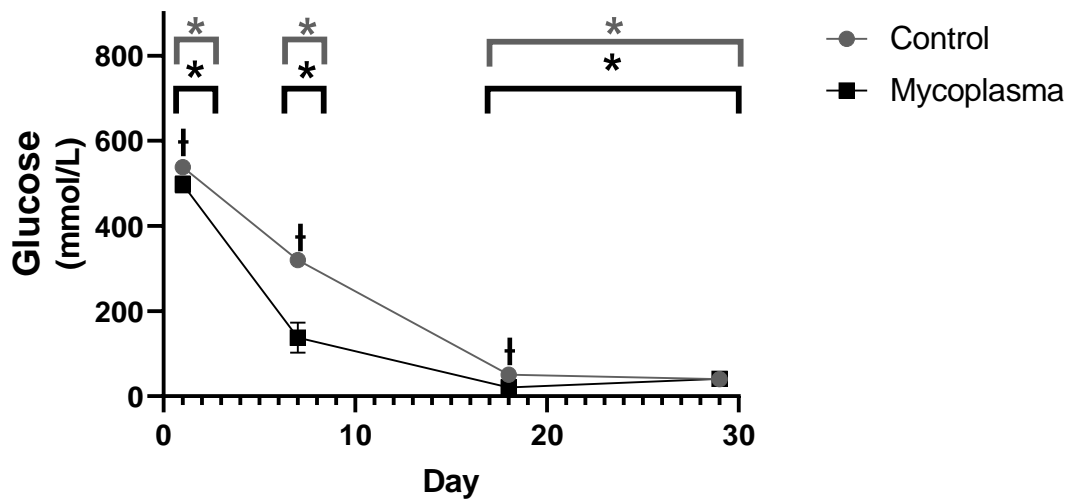
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 3** - Variations in glucose concentration during pRBC storage



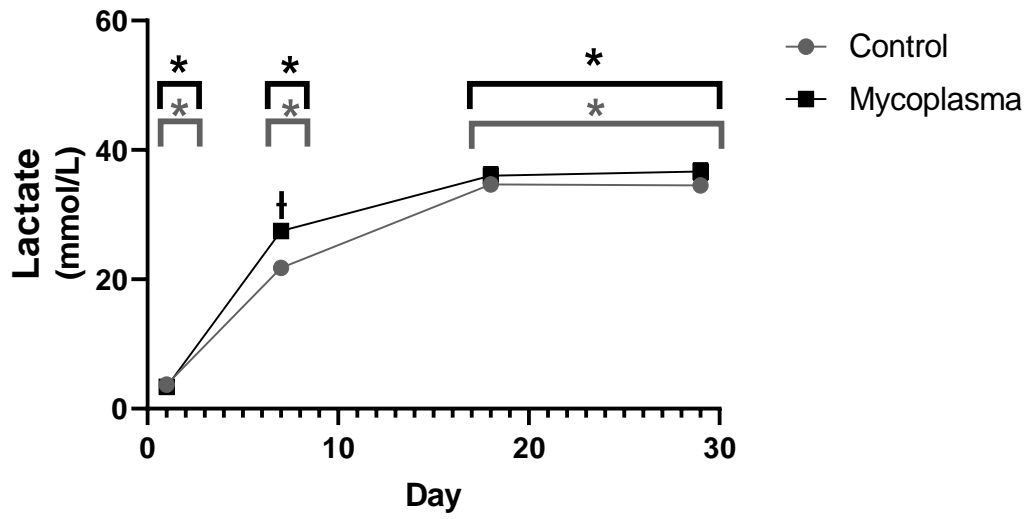
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 4** - Variations in Lactate concentration during pRBC storage



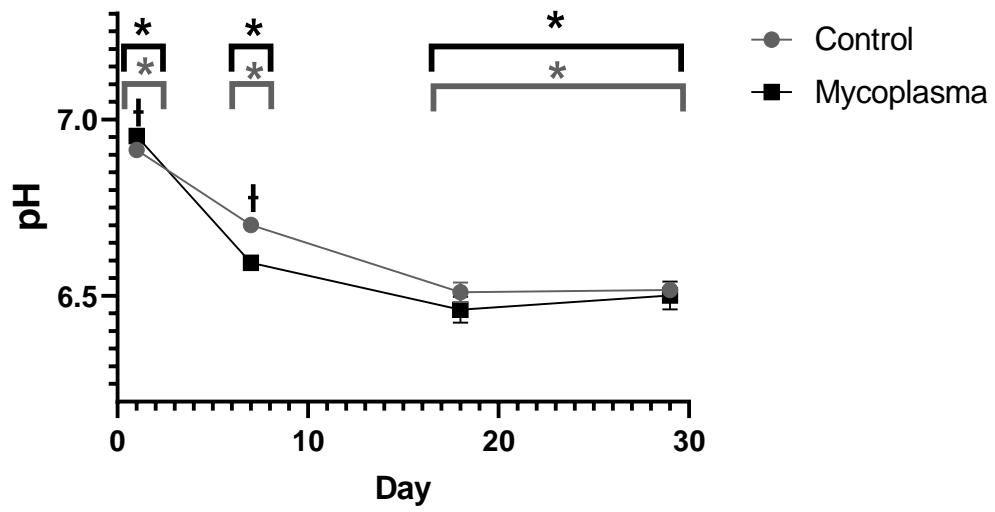
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 5 - Variations in pH during pRBC storage**



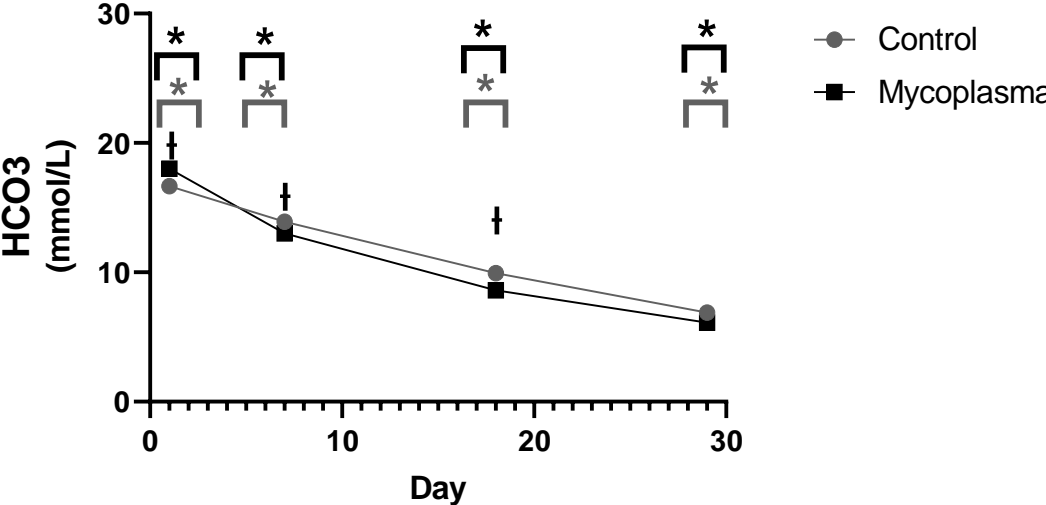
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 6 - Variations in bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) concentration during pRBC storage**



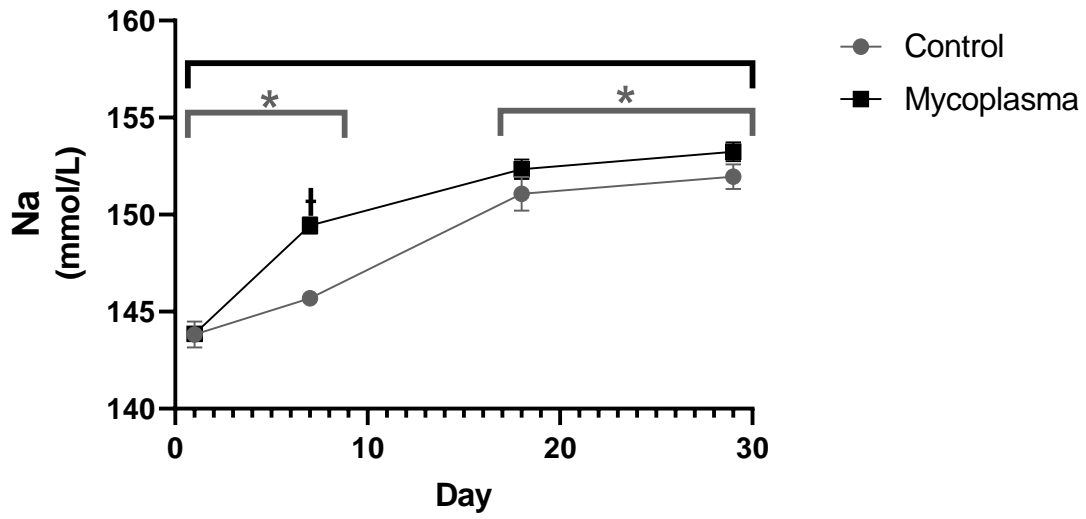
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 7 - Variations in sodium (Na<sup>+</sup>) concentration during pRBC storage**



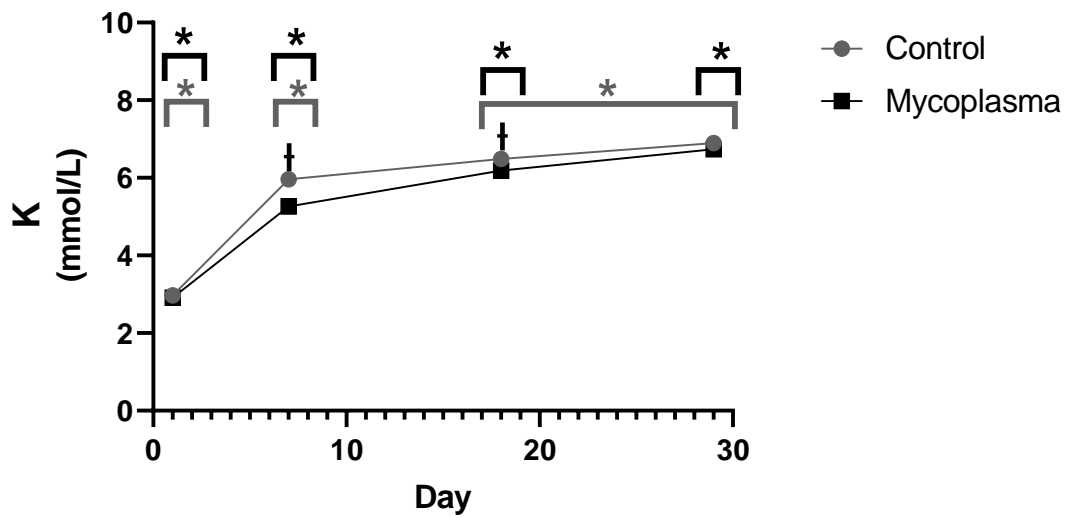
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

‡ Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 8** - Variations in potassium ( $K^+$ ) concentration during pRBC storage



Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

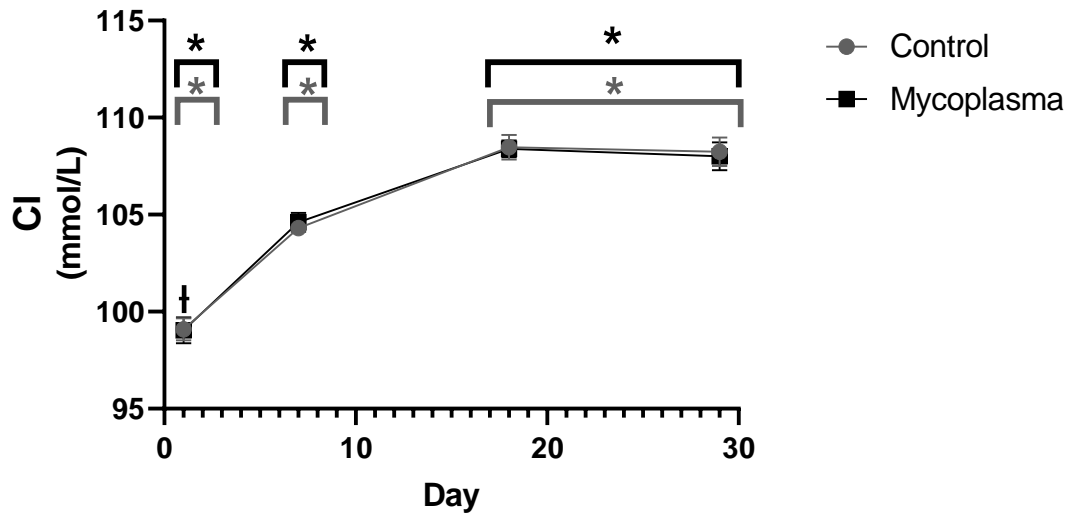
Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.



**Figure 9** - Variations in chloride (Cl<sup>-</sup>) concentration during pRBC storage



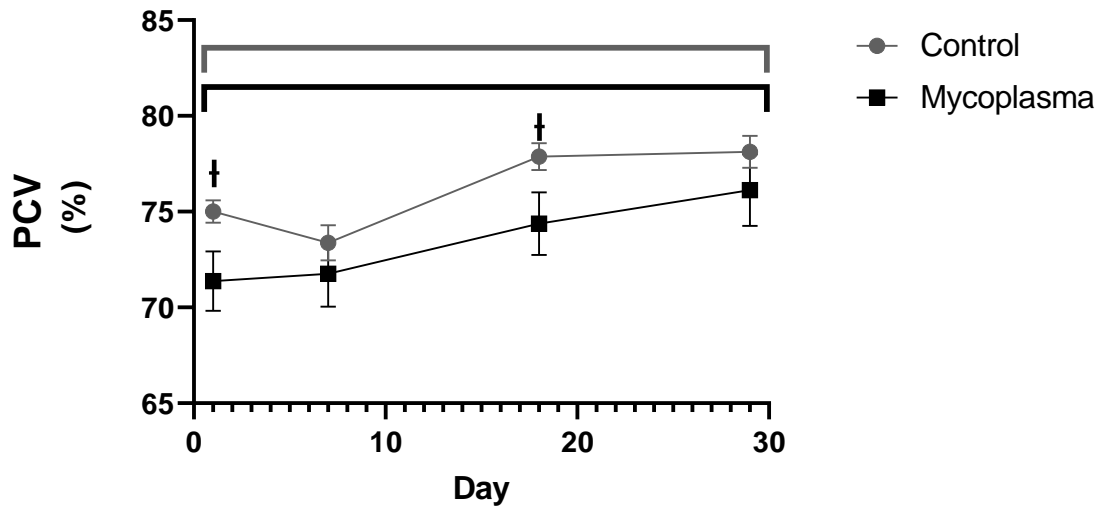
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 10** - Variations in PCV percentage during pRBC storage



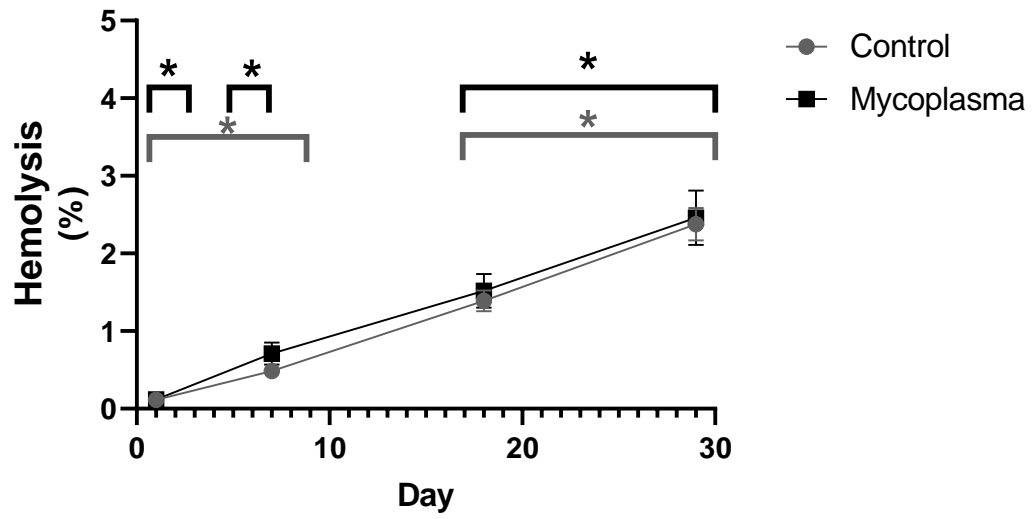
Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

† Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Figure 11** - Variations in hemolysis percentage during pRBC storage



Mean and standard error obtained from pRBC control (gray) and Mycoplasma (black) groups at days 1, 7, 18 and 29.

Data points that are included in the brackets are not statistically different from each other.

‡ Symbol represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

\* Asterisk represent significant difference ( $P \leq 0.05$ ) between sampling day.

**Table 1** - Changes in ammonia, glucose, lactate, pH, bicarbonate, Na, K, Cl, PCV and percentage hemolysis of pRBC negatives (Control) and positives (Mycoplasma) for *M. haemocanis*.

	Day 1		Day 7		Day 18		Day 29	
	Control	Mycoplasma	Control	Mycoplasma	Control	Mycoplasma	Control	Mycoplasma
<b>Ammonia</b> <b>μmol/L</b>	14.5 ± 2.4 <sup>*,d</sup>	38 ± 13.5 <sup>†,D</sup>	160.5 ± 19.4 <sup>*,c</sup>	214 ± 38.7 <sup>†,C</sup>	436.5 ± 80.4 <sup>*,b</sup>	549 ± 91.4 <sup>†,B</sup>	776.8 ± 79.2 <sup>*,a</sup>	1050 ± 201 <sup>†,A</sup>
<b>Glucose</b> <b>mg/dL</b>	538 ± 13.8 <sup>†,a</sup>	497.8 ± 13.8 <sup>*,A</sup>	319.8 ± 25 <sup>†,b</sup>	137.625 ± 27.5 <sup>*,B</sup>	50.3 ± 10.3 <sup>†,c</sup>	20.3 ± 11 <sup>*,C</sup>	40.1 ± 5 <sup>†,c</sup>	40.6 ± 6.1 <sup>†,C</sup>
<b>Lactate</b> <b>mmol/L</b>	3.7 ± 0.6 <sup>†,d</sup>	3.3 ± 0.4 <sup>†,C</sup>	21.7 ± 1.3 <sup>*,c</sup>	27.4 ± 2.8 <sup>†,B</sup>	34.6 ± 2.8 <sup>†,b</sup>	36.0 ± 3.8 <sup>†,A</sup>	34.5 ± 2.7 <sup>†,a</sup>	36.6 ± 3.7 <sup>†,A</sup>
<b>pH</b>	6.91 ± 0.0 <sup>*,a</sup>	6.95 ± 0.0 <sup>†,A</sup>	6.7 ± 0.0 <sup>†,b</sup>	6.5 ± 0.0 <sup>*,B</sup>	6.5 ± 0.0 <sup>†,c</sup>	6.4 ± 0.1 <sup>†,C</sup>	6.5 ± 0.0 <sup>†,c</sup>	6.5 ± 0.1 <sup>†,C</sup>
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> <b>mmol/L</b>	16.6 ± 1.2 <sup>*,a</sup>	18 ± 0.8 <sup>†,A</sup>	13.9 ± 1.0 <sup>†,b</sup>	13.0 ± 0.5 <sup>*,B</sup>	9.9 ± 1.2 <sup>†,c</sup>	8.6 ± 1.1 <sup>*,C</sup>	6.8 ± 1.1 <sup>†,d</sup>	6.1 ± 1.6 <sup>†,D</sup>
<b>Na<sup>+</sup></b> <b>mmol/L</b>	143.8 ± 1.8 <sup>†,b</sup>	143.8 ± 0.7 <sup>†,A</sup>	145.7 ± 1.0 <sup>*,b</sup>	149.4 ± 1.2 <sup>†,A</sup>	151.0 ± 2.4 <sup>†,a</sup>	152.3 ± 1.4 <sup>†,A</sup>	151.9 ± 1.7 <sup>†,a</sup>	153.2 ± 1.3 <sup>†,A</sup>
<b>K<sup>+</sup></b> <b>mmol/L</b>	2.9 ± 0.2 <sup>†,c</sup>	2.91 ± 0.2 <sup>†,D</sup>	5.9 ± 0.4 <sup>†,b</sup>	5.2 ± 0.4 <sup>*,C</sup>	6.4 ± 0.3 <sup>†,a</sup>	6.1 ± 0.3 <sup>*,B</sup>	6.8 ± 0.3 <sup>†,a</sup>	6.7 ± 0.2 <sup>†,A</sup>
<b>Cl<sup>-</sup></b> <b>mmol/L</b>	99.1 ± 1.6 <sup>†,c</sup>	99.0 ± 1.8 <sup>*,C</sup>	104.3 ± 1.1 <sup>†,b</sup>	104.6 ± 1.3 <sup>†,B</sup>	108.4 ± 1.8 <sup>†,a</sup>	108.4 ± 1.2 <sup>†,A</sup>	108.2 ± 2.1 <sup>†,a</sup>	108 ± 2.0 <sup>†,A</sup>
<b>PCV</b> <b>%</b>	75 ± 1.6 <sup>†,a</sup>	71.3 ± 4.3 <sup>*,A</sup>	73.3 ± 2.6 <sup>†,a</sup>	71.7 ± 4.8 <sup>†,A</sup>	77.8 ± 1.9 <sup>†,a</sup>	74.3 ± 4.6 <sup>*,A</sup>	78.1 ± 2.5 <sup>†,a</sup>	76.1 ± 5.3 <sup>†,A</sup>
<b>Hemolysis</b> <b>%</b>	0.1 ± 0.1 <sup>†,b</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>†,C</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>†,b</sup>	0.7 ± 0.4 <sup>†,C</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>†,a</sup>	1.5 ± 0.6 <sup>†,B</sup>	2.3 ± 0.5 <sup>†,a</sup>	2.4 ± 0.9 <sup>†,A</sup>

Different symbols (†,\*) represent significant difference (P = 0.05) between Control and Mycoplasma Group in each day, respectively.

Different lowercase (a,b,c,d) represent significant differences (P = 0.05) between days (1,7,18 and 29) from the Control Group.

Different uppercase (A,B,C,D) represent significant differences (P = 0.05) between days (1,7,18 and 29) from the Mycoplasma Group.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo permitiu identificar a presença de *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos armazenado a 4°C durante 29 dias. Porém, o potencial infectante desse patógeno não foi definido, sendo a transfusão ou inoculação de produtos sanguíneos contaminados de maneira experimental uma das possibilidades para verificar o risco de infecção. No entanto, os resultados do presente estudo, são a base para estudos futuros que visam determinar o potencial de infecção e transmissão de *M. haemocanis* em hemocomponentes caninos, considerando a importância das diferenças encontradas nos parâmetros bioquímicos analisados entre os grupos Controle e Mycoplasma.

No presente estudo também foram observadas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos amônia, glicose, lactato, pH, bicarbonato e eletrólitos nos concentrados de eritrócitos caninos com *M. haemocanis* em comparação com o grupo controle.

Além disso, a condição dos receptores de sangue geralmente é crítica e a transfusão com concentrado de eritrócitos contaminados com *M. haemocanis* pode representar um risco de introdução de um patógeno que piore o estado de saúde do paciente.

Este estudo ressalta a importância da triagem de componentes sanguíneos para patógenos como hemoplasmas pelas técnicas de PCR, devido a que estes patógenos podem causar doença subclínica em cães e os doadores podem ser identificados como saudáveis com testes laboratoriais de rotina.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, F. *et al.* Biochemical storage lesions occurring in nonirradiated and irradiated red blood cells: A brief review. **BioMed Research International**, [S. l.], p. 1–8, 2015.
- ADIAS, T. C. ZACCHEAUS, A. MOORE-IGWE, B. W. Storage Related Haematological and Biochemical Changes of CPDA-1 Whole Blood in a Resource Limited Setting. **Journal of Blood Disorders & Transfusion**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 3–6, 2012. Disponível em: <http://www.omicsonline.org/2155-9864/2155-9864-3-124.php>
- ALLEN, S. E.; HOLM, J. L. Lactate: Physiology and clinical utility. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 123–132, 2008.
- ALVES, T. B. *et al.* Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Archivos de Medicina Veterinaria**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 333–336, 2014.
- BARKER, E. N. *et al.* Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “Candidatus *Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 140, n. 1–2, p. 167–170, 2010.
- BARKER, E. N. *et al.* Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 1–8, 2011.
- BENNETT-GUERRERO, E. *et al.* Evolution of adverse changes in stored RBCs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 43, p. 17063–17068, 2007.
- BIONDO, A. W. *et al.* A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotropic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 18, n. 03, p. 1–7, 2009.
- 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**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 161–165, 2004.
- BRINSON, J. J.; MESSICK, J. B. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 218, n. 12, p. 1943–1945, 2001.

- CANNON, S. H. *et al.* Infectious diseases in dogs rescued during dogfighting investigations. **Veterinary Journal**, [S. l.], v. 211, p. 64–69, 2016.
- CHALKER, V. J. Canine mycoplasmas. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 1–8, 2005.
- CHALKER, V. J.; BROWNLIE, J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 537–542, 2004.
- COMPTON, S. M.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Candidatus Mycoplasma haematoparvum and Mycoplasma haemocanis infections in dogs from the United States. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 557–562, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.06.004>
- CONN, H. O. Studies on the origin and significance of blood ammonia. II. The distribution of ammonia in whole blood, plasma and erythrocytes of man. **Yale Journal of Biology and Medicine**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 38–53, 1966.
- CONSTANTINO, C. *et al.* Survey of spatial distribution of vector-borne disease in neighborhood dogs in southern Brazil. **Open Veterinary Journal**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 50–56, 2017.
- D’ALESSANDRO, A. *et al.* An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. **Transfusion**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 205–219, 2015.
- DAVIDOW, B. Transfusion medicine in small animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 735–756, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.03.007>
- DE SOUSA, K. C. M. *et al.* Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 171, n. January, p. 172–181, 2017.
- DO NASCIMENTO, N. C. *et al.* Mycoplasma haemocanis - The canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 43, n. 1, 2012.
- DOS SANTOS SOUSA, R. *et al.* Lesões de armazenamento durante a conservação de sangue nas diferentes espécies: Uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 68–79, 2012.

GARY, A. T. *et al.* Survival of *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in blood of cats used for transfusions. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 321–326, 2006.

HARRELL, K. A.; KRISTENSEN, A. T. Canine transfusion reactions and their management. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1333–1364, 1995. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(95\)50158-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(95)50158-5)

HARRIS, J. R. **Cell biochemistry**. 1st ed. ed. New York [s. n.]. v. 271

HEINZ, J. A. *et al.* Biochemical evaluation of the effects of storage on feline erythrocytes. **Journal of Small Animal Practice**, [S. l.], v. 57, n. 11, p. 637–643, 2016.

HESS, J. R. Red cell changes during storage. **Transfusion and Apheresis Science**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 51–59, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>

HII, S. F. *et al.* Canine vector-borne disease pathogens in dogs from south-east Queensland and north-east Northern Territory. **Australian Veterinary Journal**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 130–135, 2012.

HII, S. F. *et al.* Canine tick-borne pathogens and associated risk factors in dogs presenting with and without clinical signs consistent with tick-borne diseases in northern Australia. **Australian Veterinary Journal**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 58–66, 2015.

HOGMAN, C. F.; MERYMAN, H. T. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 275–296, 1999.

HULME-MOIR, K. L. *et al.* Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 582–587, 2010.

KEMMING, G. *et al.* Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old problem - New insight. **European Surgical Research**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 198–205, 2004 a.

KEMMING, G. I. *et al.* *Mycoplasma haemocanis* infection - A Kennel Disease? **Comparative medicine**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 404–409, 2004 b.



KEOHANE, M.; SMITH, L.; WALENGA, M. **Hematology Clinical principles and applications**. 5th ed. ed. New York [s. n.].

KISIELEWICZ, C.; SELF, I.; BELL, R. Assessment of clinical and laboratory variables as a guide to packed red blood cell transfusion of euvoletic anemic dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 576–582, 2014.

LACERDA, L. A. *et al.* Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 362–370, 2014.

LATHAM, J. T.; BOVE, J. R.; WEIRICH, F. L. Chemical and hematologic changes in stored CPDA-1 blood. **Transfusion**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 158–159, 1982.

LOGAN, J. C. *et al.* Clinical indications for use of fresh frozen plasma in dogs: 74 dogs (October through December 1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 218, n. 9, p. 1449–1455, 2001.

MASCARELLI, P. E. *et al.* Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–5, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1920-8>

MESSICK, J. B. New perspectives about Hemotropic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1453–1465, 2003.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 2–13, 2004.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.

NOVACCO, M. *et al.* Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 142, n. 3–4, p. 276–284, 2010.

OBRADOR, R.; MUSULIN, S.; HANSEN, B. Red blood cell storage lesion. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 187–199, 2015.

- ORLOV, D.; KARKOUTI, K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. **Anaesthesia**, [S. l.], v. 70, p. 29–37, 2015.
- PATTERSON, J. *et al.* In vitro lysis and acute transfusion reactions with hemolysis caused by inappropriate storage of canine red blood cell products. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 927–933, 2011.
- PECK, C. C. *et al.* Adenine blood preservation. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 173–212, 1981.
- PETERS, I. R. *et al.* RNase P RNA gene (rnpB) phylogeny of hemoplasmas and other Mycoplasma species. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 1873–1877, 2008.
- PITORRI, F. *et al.* Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of Mycoplasma haemocanis infection with doxycycline in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 493–496, 2012.
- PODER, T. G.; NONKANI, W. G.; TSAKEU, L. É. Blood Warming and Hemolysis: A Systematic Review With Meta-Analysis. **Transfusion Medicine Reviews**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 172–180, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2015.03.002>
- PRICE, G. S. *et al.* Evaluation of Citrate-Phosphate- Dextrose-Adenine as a Storage Medium for Packed Canine Erythrocytes. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 126–132, 1988.
- PRITTIE, J. E. Triggers for use, optimal dosing, and problems associated with red cell transfusions. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1261–1275, 2003.
- PRYOR, W. H.; BRADBURY, R. P. **Haemobartonella canis infection in research dogs**. [S. l.: s. n.]
- RAMOS, R. *et al.* Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 1115–1120, 2010.
- ROURA, X. *et al.* Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 270–274, 2010.

- SANTOS, Andrea P. *et al.* Genome of *Mycoplasma haemofelis*, unraveling its strategies for survival and persistence. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 42, n. 1, 2011.
- SHALM, J.; WILLIAM, O. **Veterinary hematology**. 6th editio ed. New York [s. n.].
- SOARES, R. L. *et al.* Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande , Mato Grosso do Sul , Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 359–363, 2016.
- SOWEMIMO-COKER, S. O. RBC Hemolysis during processing. **Transfusion Medicine Reviews**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 46–60, 2002.
- SPARROW, R. L. Time to revisit red blood cell additive solutions and storage conditions: A role for “omics” analyses. **Blood Transfusion**, [S. l.], v. 10, n. SUPPL. 2, p. 8–12, 2012.
- STERLING, D.; REITHMEIER, R. A. F.; CASEY, J. R. A transport metabolon: Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 51, p. 47886–47894, 2001.
- TASKER, S. *et al.* 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. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 152, n. 7, p. 193–198, 2003.
- TASKER, S. *et al.* Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 59, n. 11, p. 1285–1292, 2010.
- VALLE, S. F. *et al.* Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 259–265, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2014.08.001>
- WADDELL, L. S. *et al.* The effect of storage on ammonia concentration in canine packed red blood cells. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 23–26, 2001.
- WARDROP, K. J. *et al.* Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 135–142, 2005.
- WARDROP, K. J. *et al.* Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 15–35,

2016.

WENGI, N. *et al.* Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 126, n. 1–3, p. 132–141, 2008.

WILLI, B. *et al.* From Haemobartonella to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 125, n. 3–4, p. 197–209, 2007 a.

WILLI, B. *et al.* Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 73, n. 12, p. 3798–3802, 2007 b.

WILLI, B. *et al.* Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: Transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, [S. l.], v. 152, n. 5, p. 237–244, 2010.

WILSON, C. R. *et al.* Biochemical evaluation of storage lesion in canine packed erythrocytes. **Journal of Small Animal Practice**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 678–684, 2017.

YAGI, K.; HOLOWAYCHUK, M. **Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking**. John Wiley ed. Chennai, India.: Wiley, 2016.