

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

**INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA
REGIÃO DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL**

ANDREA PIRES DOS SANTOS

PORTO ALEGRE

2008

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

**INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA
REGIÃO DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL**

Autor: ANDREA PIRES DOS
SANTOS

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias
na área de Morfologia, Cirurgia e
Patologia Animal

Orientador: Félix Hilário Díaz
González

PORTO ALEGRE

2008

Andrea Pires dos Santos

INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA
REGIÃO DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

Aprovada em 01 de agosto de 2008

APROVADO POR:

Félix Hilário Díaz González

Orientador e presidente da comissão

Alexander Welker Biondo

Membro da comissão

Luis Antonio Sangioni

Membro da comissão

Sérgio Ceroni da Silva

Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu irmão Rodrigo pelas idéias e resultados de trabalharmos juntos.

Ao meu orientador Félix H. D. González pela oportunidade, confiança e amizade.

À minha orientadora no exterior Joanne B. Messick pelo suporte e aprendizado.

Ao meu amigo e colaborador Alexander Welker Biondo por todo apoio ajuda e oportunidades.

Aos membros da banca Luis Antonio Sangioni e Sérgio Ceroni da Silva.

Aos colegas, e funcionários do LACVet.

À equipe: Viviane Pedralli, Camila Lasta, Simone Tostes de Oliveira, Luciana Lacerda, Vanessa Esteves pela colaboração e dedicação a este trabalho.

Ao colega Rafael Stedile pela colaboração.

À professora Ana Paula Ravazollo e Professor Cláudio Canal pela oportunidade, ajuda e suporte laboratorial.

Aos colegas do Laboratório de microbiologia e virologia da UFRGS.

Ao colega Flávio da Silva pela colaboração.

Aos residentes, professores e funcionários do Hospital Clínico Veterinário da UFRGS pela ajuda direta ou indireta neste trabalho.

Ao professor Jorge Timenetsky e a colega Ana Márcia Guimarães na Universidade de São Paulo pela colaboração e suporte laboratorial.

Ao professor Hélio Autran de Moraes na Universidade de Wisconsin pela colaboração.

À Bárbara Willi e Regina Hofmann-Lehmann, University of Zurich, Switzerland.

A estagiária Lindsay Alice Halik na Universidade de Purdue pela ajuda e amizade.

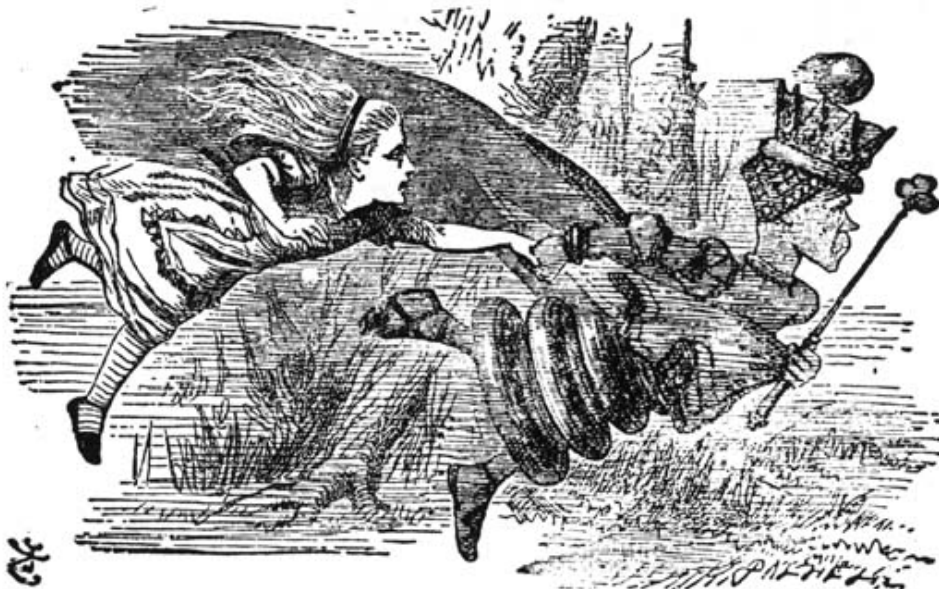
À epidemiologista Annete Litster e aos estatísticos, Ching-Yun Chang e Ahmed Mohamed na Universidade de Purdue pelo aprendizado e colaboração.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

à Universidade de Purdue pelo suporte laboratorial.

A Coordenação de Apoio e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro

EPÍGRAFE



'Now! Now!' cried the Queen. 'Faster! Faster!' And they went so fast that at last they seemed to skim through the air, hardly touching the ground with their feet, till suddenly, just as Alice was getting quite exhausted, they stopped, and she found herself sitting on the ground, breathless and giddy.

The Queen propped her up against a tree, and said kindly, 'You may rest a little now.'

Alice looked round her in great surprise. 'Why, I do believe we've been under this tree the whole time! Everything's just as it was!'

'Of course it is,' said the Queen, 'what would you have it?'

'Well, in our country,' said Alice, still panting a little, 'you'd generally get to somewhere else -- if you ran very fast for a long time, as we've been doing.'

'A slow sort of country!' said the Queen. 'Now, here, you see, it takes all the running you can do, to keep in the same place.'

If you want to get somewhere else, you must run at least twice as fast as that!'

*Lewis Carroll – Through the Looking Glass and
What Alice Found There (Red queen evolutionary hypothesis)*

INFECÇÃO POR HEMOPLASMAS EM FELINOS DOMÉSTICOS NA REGIÃO DE PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

Autor: Andrea Pires dos Santos

Orientador: Félix Hilário Díaz González

RESUMO

O termo hemoplasma refere-se ao grupo de micoplasmas que parasitam os eritrócitos do hospedeiro e podem causar anemia. O uso das técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizadas para a melhor compreensão da doença. No Brasil os hemoplasmas *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus* *Mycoplasma haemonminutum*' já foram identificados, porém dados de prevalência e fatores de risco não foram avaliados até o momento. A espécie '*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*' já foi descrita em diferentes países, porém a técnica de diagnóstico utilizando PCR em tempo real limita seu estudo no Brasil devido ao custo e necessidade de pessoal especializado. O presente trabalho desenvolveu uma técnica por PCR convencional para a detecção da espécie '*Candidatus* *M. turicensis*' e descreve pela primeira vez sua presença infectando gatos domésticos no Brasil e a prevalência, fatores de risco e achados hematológicos da infecção por hemoplasmas foi avaliada. No total de 371 gatos, 79 (21.3%) foram positivos para pelo menos uma espécie de hemoplasma. A infecção por '*Candidatus* *M. haemominutum*' foi detectada em 50 (13,48%) dos animais, '*Candidatus* *M. turicensis*' e *M. haemofelis* foram detectados em 10/371 (2.69%) e 8/371 (2.16%) dos animais respectivamente. Coinfecção com *M. haemofelis*-'*Candidatus*-*M. haemominutum*' foi detectada em 4/371 (1.08%), '*Candidatus* *M. haemominutum*'-'*Candidatus* *M. turicensis*' em 5/371 (1.35%) e infecção tripla em 2/371 (0.54%). Gatos machos, jovens e com acesso a rua são mais susceptíveis a infecção por hemoplasmas. Anemia é associada à infecção por *M. haemofelis* e '*Candidatus* *M. haemominutum*'. O presente trabalho também descreve a infecção por micoplasma hemotrófico similar ao *M. haemofelis* em um paciente humano HIV positivo e alerta para seu potencial zoonótico. Em conclusão, espécies de hemoplasmas são comuns e importantes agentes de infecções em gatos domésticos no sul do Brasil. Estudos futuros devem ser conduzidos para melhor entender seu impacto em animais de companhia e determinar o seu papel como agentes zoonóticos, particularmente em pessoas imunocomprometidas.

Palavras-chave: micoplasma, hemoplasma, anemia infecciosa felina, zoonose, HIV, PCR.

Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, setembro, 2008. (162p).

Haemoplasma Infection in domestic cats from Porto Alegre, RS, Brazil

Author: Andrea Pires dos Santos

Advisor: Félix Hilário Díaz González

ABSTRACT

*The term haemoplasma refers to the mycoplasmas that parasitize the red blood cells of the host and can cause anemia. Molecular approaches based on the polymerase chain reaction (PCR) have been used to better understand the disease. In Brazil, The species *Mycoplasma haemofelis* and ‘Candidatus *Mycoplasma haemominutum*’ were identified, whereas prevalence and risk factor were not evaluated to date. The specie ‘Candidatus *Mycoplasma turicensis*’ was described in many countries, however the use of real time-PCR for the diagnostic of the infection had limited its use in Brazil and other countries since it is expensive and requires specialized technicians. The current study developed a conventional PCR assay to the diagnosis of ‘Candidatus *M. turicensis*’ and report for the first time the infection in domestic cats in Brazil. We also evaluated the prevalence, risk factors and hematological findings for the hemoplasma infections. In a total of 371 cat samples, 79 (21.3%) were PCR-positive for at least one species of haemoplasma. ‘Candidatus *M. haemominutum*’ infection was found in 50 out of 371 (13.48%) positive cats, ‘Candidatus *M. turicensis*’ and *M. haemofelis* DNA were found in 10/371 (2.69%) and 8/371 (2.16%) of the cats respectively. Coinfection with *M. haemofelis*-‘Candidatus *M. haemominutum*’ was found in 4/371 (1.08%), ‘Candidatus *M. haemominutum*’-‘Candidatus *M. turicensis*’ in 5/371 (1.35%) and infection with all 3 haemoplasmas in 2/371 (0.54%). Male cats, younger age and outdoor access were risk factors for haemoplasma infection. Anemia was associated with *M. haemofelis* and ‘Candidatus *M. haemominutum*’ infection. The present study also reports a case of a *Mycoplasma haemofelis*-like organism infection in a HIV positive patient and warns the zoonotic potential of the haemoplasmas. In conclusion, the haemoplasmas are common infectious agent in domestic cats in southern Brazil. Further studies are needed to better understand their impact on companion animals, as well as their role as zoonotic agents, particularly in immunocompromised people.*

Key words: *mycoplasma, haemoplasma, feline infectious anemia, zoonosis, HIV, PCR.*

1/ Thesis of Doctorate in Veterinary Sciences, School of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, September 2008. (162p).

LISTA DE FIGURAS

	Página
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Figura 1. Análise filogenética baseada na seqüências do gene 16S rRNA dos hemoplasmas e outros micoplasmas. As distâncias evolutivas estão representadas pela escala (Peters et al, 2008)	23
Figura 2. <i>Mycoplasma hemofelis</i> parasitando os eritrócitos de um felino experimentalmente infectado.....	24
Figura 3. Gráfico comparativo entre os valores de hematócrito e valores de parasitemia em relação aos dias apos a infecção experimental de um gato com <i>Mycoplasma haemofelis</i> e os resultados da PCR no DNA extraído do sangue. A figura com o resultado do PCR corresponde ao dia que foi o sangue foi coletado. A seta sólida correspomde ao pico da parasitemia e início do tratamento com doxiciclina (2.5 mg/kg via oral a cada 12 horas por 21 dias). As setas menores indicam tratamento com metilpredisolona (14 mg/kg, intravenoso). Dia 0 = dia da inoculação com sangue infectado com <i>Mycoplasma haemofelis</i> . Amostras de sangue foram coletadas diariamente entre os dias 0 a 21 e 215 a 245 e semanalmente 22 a 214. Linha fina: = valores do hematócrito (PCV). Linha grossa = valores de parasitemia estimados pelo esfregaço sanguíneo (<i>H. felis</i> score). N/D = período pré-patente onde o sangue não foi coletado para PCR. (BERENT, 2002).....	27
ARTIGO 1	
Figure 1. PCR products using 4 different sets of primers to amplify CMtc. Lane 1, 100 bp DNA ladder. Lanes 2 and 3,	

plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt1Fw and Mt1Rv (expected product size of 442 bp). Lanes 4 and 5, plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt1Fw and Mt2Rv (expected product size of 488 bp). Lanes 6 and 7, plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt2Fw and Mt1Rv (expected product size of 543 bp). Lanes 8 and 9, plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt2Fw and Mt2Rv (expected product size of 587 bp). Lanes 10 and 11 negative controls using water as template..... 76

Figure 2. Annealing gradient experiment. Singleplex PCR assay for CMtc using Mt1Fw and Mt2Rv primers in 1.5% ethidium bromide stained agarose gel. Lane 1, 100 bp DNA ladder. Lanes 2 to 12, respective annealing temperatures 45.3°C, 46.4°C, 48.2°C, 50.4°C, 53.0°C, 55.8°C, 58.5°C, 61.0°C, 63.1°C, 64.7°C and 65.6°C..... 77

Figure 3. MgCl₂ experiment in 1.5% ethidium bromide stained agarose gel using Mt1Fw and Mt2Rv primers and genomic DNA diluted to 10² templates. Lane 1, 100 bp DNA ladder. Lanes 2 to 9, respective MgCl₂ concentrations of 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM and 4.0 mM. Lane 10, negative control (1.5 mM MgCl₂ concentration using water as template)..... 78

Figure 4. Comparison between the singleplex PCR assay for CMtc and duplex-assay for CMtc and feline 28S rDNA in different dilutions. Lane 1, 100 bp DNA ladder. For the singleplex PCR, lane 2, genomic DNA control sample extracted from blood; lane 3 to 5 genomic DNA control in respective dilutions 10², 10³ and 10⁴; lane 6, genomic DNA from non-infected cat; and lanes 7 to 12 are the same samples as described for lanes 2 through 6, however the

duplex-PCR assay was used..... 79

ARTIGO 2

Figure 1. Prevalence of the hemoplasma species in 371 domestic cats from southern Brazil. *Mhf* = *Mycoplasma haemofelis*, CMhm = ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’; CMtc = ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. 105

Figure 2. PCV values (Mean \pm SE) of cats grouped by haemoplasma infection status. *Mhf* = *Mycoplasma haemofelis*, CMhm = ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’; CMtc = ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, *Mhf*-CMhm = co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, CMhm-CMtc = co-infection with ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, *Mhf*-CMhm-CMtc = co-infection with the three haemoplasmas, Not detected = cats tested negative for all three haemoplasmas..... 106

ARTIGO 3

Figure 1. PCR result for the detection of the *Mycoplasma haemofelis*-like organism in an HIV-positive patient. Lane 1, 100 bp marker. Lane 2, positive control: DNA extracted from the blood of a *Mycoplasma haemofelis*-positive cat. Lane 3, Negative control: water. Lane 4, DNA extracted from the blood of the patient in this study..... 123

DISCUSSÃO GERAL

Figura 1. Mapa ótico do *Mycoplasma haemofelis* utilizando a enzima de restrição *NcoI*. (OpGen, Inc.)..... 132

- Figura 2.** PCR convencional desenvolvido para a detecção de micoplasmas hemotróficos. Diluições seriadas utilizando amostra controle positiva para *Mycoplasma suis* para determinar o limite e detecção..... 138
- Figura 3.** Gradiente de temperatura aplicado ao PCR convencional desenvolvido para a detecção de micoplasmas hemotróficos utilizando amostra controle positiva para *Mycoplasma suis* em alta e baixa concentrações. Canaleta 2-8: Amostra diluída 1/10, linha 10 a 15 amostra diluída 1/100000. Canaleta 1 – marcador de peso molecular de 100 pb. Canaleta 9 – controle negativo..... 138
- Figura 4.** PCR convencional desenvolvido para a detecção de micoplasmas hemotróficos utilizando amostras de diferentes espécies..... 139

LISTA DE TABELAS

	Página
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Tabela 1. Prevalência da infecção pelas 3 espécies de hemoplasmas e o tipo de população estudada em diferentes países.....	39
 ARTIGO 1	
Table 1. Set of primers for CMtc amplification used in this study.....	75
 ARTIGO 2	
Table 1. Comparison of source, gender, breed, age and outdoor access of healthy and unhealthy cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.	107
Table 2. Blood parameters of healthy and unhealthy cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.....	108
Table 3. Prevalence estimates and <i>P</i> values for hemoplasma infection by Polymerase Chain Reaction (PCR+) among healthy and unhealthy cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.....	109
Table 4. Risk factors and <i>P</i> values for the haemoplasma infection and ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’ infection alone in domestic cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.....	110

DISCUSSÃO GERAL

Tabela 1. Condições da reação para o protocolo de PCR convencional otimizado para o diagnóstico do <i>Mycoplasma haemofelis</i>	136
Tabela 2. Condições do termociclador para o protocolo de PCR convencional otimizado para o diagnóstico de <i>Mycoplasma haemofelis</i>	136
Tabela 3. Condições da reação para o protocolo de PCR convencional desenvolvido para o diagnóstico do ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’.....	137
Tabela 4. Condições do termociclador para o protocolo de PCR convencional desenvolvido para o diagnóstico de ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’.....	137

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Histórico e classificação.....	20
3.2 Características.....	22
3.3 Anemia Infeciosa felina.....	25
3.3.1 Doença aguda.....	26
3.3.2 Doença crônica.....	28
3.3.3 Outras afecções.....	30
3.3.4 Transmissão.....	30
3.3.5 Fatores de risco.....	32
3.3.6 Diagnóstico.....	33
3.3.7 Prevalência.....	36
3.3.8 Tratamento.....	39
3.3.9 Anemia Infeciosa Felina no Brasil.....	40
3.7 Hemoplasrose em cães.....	42
3.8 Hemoplasrose em humanos.....	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1 ARTIGO 1	
4.1.1 Design, Optimization and Application of a Conventional PCR Assay with an Internal Control for Detection of ' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ' 16S	

rDNA in Domestic Cats from Brazil.....	49
4.1.2 ABSTRACT.....	50
4.1.3 INTRODUCTION.....	51
4.1.4 MATERIAL AND METHODS.....	53
4.1.5 RESULTS.....	58
4.1.6 DISCUSSION.....	62
4.1.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	68
4.1.8 REFERENCES.....	74
4.2 ARTIGO 2	
4.2.1 Prevalence, Risk Factors and Hematological Findings of Haemoplasma Infection in Domestic Cats from Southern Brazil.	80
4.2.2 ABSTRACT.....	80
4.2.3 INTRODUCTION.....	83
4.2.4 MATERIAL AND METHODS.....	84
4.2.5 RESULTS.....	88
4.2.6 DISCUSSION.....	90
4.2.7 REFERENCES.....	96
4.2.8 ACKNOWLEDGEMENTS.....	104
4.3 ARTIGO 3	
4.3.1 Haemoplasma Infection in an HIV-positive Patient in Brazil.....	111
4.3.2 ABSTRACT.....	111
4.3.3 THE STUDY.....	112
4.3.4 CLONCLUSIONS.....	113
4.3.5 ACKNOWLEDGEMENTS.....	117
4.3.6 BIOGRAPHICAL SCRETCHES.....	120
4.3.7 REFERENCES.....	120
	121
4.4 RESUMO 1	
4.3.1 Detection of ‘<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>’-	

like Organism in Dogs From Brazil.....	124
5 DISCUSSÃO GERAL.....	125
6 CONCLUSÕES.....	140
7 REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	142
ANEXO 1.....	161
ANEXO 2.....	162

1 INTRODUÇÃO

A hemobartonelose ou anemia infecciosa felina (AIF) é uma doença causada pelo agente antigamente conhecido como *Haemobartonella felis*. Os gatos infectados podem desenvolver anemia que varia de leve anemia a severa anemia hemolítica que pode levar a morte ou não apresentarem sinais clínicos. Classicamente existiam duas formas da *Haemobartonella* spp. conhecidas como forma grande ou isolado de Ohio e a forma pequena ou isolado da Califórnia onde a forma maior estaria relacionada com a doença aguda e a forma menor considerada menos patogênica.

Anteriormente classificada como membro da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, a *Haemobartonella* spp. foi reclassificada no gênero *Mycoplasma*, baseado em análises filogenéticas e em dados da seqüência do gene 16S ribossômico (16S rDNA) e devido a grande semelhança das suas características moleculares (genoma) e fenotípicas (pequeno tamanho do parasita, ausência de parede celular e flagelos, resistência à penicilina e seus análogos, e susceptibilidade à tetraciclina). Além de serem classificados como *Mycoplasma*, observou-se a existência de dois genótipos de *H. felis* distintos morfológicamente e geneticamente. Estes genótipos foram nomeados como *Mycoplasma haemofelis* (isolado de Ohio) e ‘*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*’ (isolado da Califórnia), esta última forma permanece com o termo ‘*Candidatus*’, pois essa nomenclatura ainda não foi validada. Mais recentemente uma nova forma de micoplasma foi identificada em felinos e denominada ‘*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*’.

Não existem relatos da prevalência destes hemoplasmas no Brasil, e os relatos de casos da AIF são usualmente diagnosticados através observação do agente aderido aos eritrócitos por microscopia óptica, visto que estes organismos não se multiplicam em meios artificiais devido à necessidade de fatores de crescimento ainda não identificados. Este método de diagnóstico possui baixa sensibilidade, agravado pelo fato de que os esfregaços sanguíneos a serem observados geralmente são os mesmos utilizados para hemograma utilizando-se EDTA (etileno-diamino-tetracético de sódio ou potássio) como

anticoagulante causando o desprendimento do agente dos eritrócitos gerando falsos negativos.

O diagnóstico por microscopia no esfregaço sanguíneo ficou mais complicado ainda decorrente da identificação da espécie aparentemente menos patogênica '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e do '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' pois não distingue o agente causal. A natureza cíclica da parasitemia e a presença de um estágio de portador também tornam esse método pouco sensível. Devido à baixa sensibilidade e especificidade de outros métodos de diagnóstico para infecções agudas e crônicas em felinos a reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada o método diagnóstico definitivo para detecção e identificação do agente envolvido.

Existem poucos trabalhos descrevendo isolados destes hemoplasmas, portanto sua distribuição mundial permanece desconhecida. Além disso, os trabalhos descritos na literatura são conflitantes em relação à prevalência das três formas e sua patogenicidade. Outras questões ainda permanecem em relação à transmissão e impacto clínico na população de felinos domésticos e potencial zoonótico. Na população de felinos de Porto Alegre - Brasil, a casuística de animais anêmicos é considerada importante, e suspeita-se que o percentual de animais infectados por parasitas hemotróficos seja alta. Infecções por estes agentes determinam quadros clínicos importantes e quando associada com outras afecções, tornam-se coadjuvantes oportunistas, agravando a severidade da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esse estudo tem como objetivo utilizar a tecnologia de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para verificar a presença de *M. haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' em felinos domésticos da região de Porto Alegre/RS e determinar a prevalência, fatores de risco e alterações hematológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver protocolo de diagnóstico por PCR para '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'.
- Verificar a presença dos agentes *M. haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' em felinos domésticos da região de Porto Alegre, RS, Brasil.
- Relacionar a presença do agente com a anemia.
- Estabelecer as principais alterações hematológicas para a doença.
- Verificar os fatores de risco associados a doença.
- Realizar um estudo molecular das formas presentes na região e compará-las com os isolados descritos na literatura.
- Otimizar os protocolos existentes para *M. haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'
- Desenvolver protocolo de PCR específico para mycoplasmas hemotróficos.
- Utilizar as ferramentas desenvolvidas e otimizadas para a pesquisar os hemoplasmas em cães e humanos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico e classificação

A Anemia Infecciosa Felina (AIF) ou hemobartonelose é uma doença dos gatos domésticos causada pelo agente antigamente conhecido como *Haemobartonella felis*. A prova de que a *H. felis* é o agente causador da doença foi historicamente controversa devido à inabilidade de se fazer cultura do organismo em laboratório e a presença de um estado assintomático da doença (CARNEY & ENGLAND, 1993). Em 1953, Flint & Moss reconheceram que a AIF era causada pela *H. felis*, porém somente no ano de 2000, Berent e colaboradores conseguiram, através da técnica de hibridização *in situ*, a evidência final de que a *H. felis* era realmente o agente causador da doença. No entanto, diferenças significativas foram encontradas entre duas formas de *H. felis* pela análise do gene 16S rRNA (RIKIHISA et al., 1997; FOLEY et al., 1998; MESSICK et al., 1998). Duas espécies de *Haemobartonella* então foram descritas em gatos: o organismo de Ohio ou forma maior da *H. felis*, causadora da anemia infecciosa (BERENT et al., 2000) e o organismo da Califórnia, ou forma menor, com baixa patogenicidade (FOLEY et al., 1998).

Uma histórica confusão sobre a natureza da *Haemobartonella* spp. tem persistido por mais de 50 anos. Até 1993, a ordem das Rickettsiales continha três famílias: Rickettsiaceae, Bartonellaceae e Anaplasmataceae, onde a *Haemobartonella* spp. era classificada na família Anaplasmataceae, baseada na sua biologia e características fenotípicas (MOULDER, 1974). A transmissão por artrópodes também aproximava a bactéria à família Rickettsiaceae. Porém havia uma suspeita de que a *Haemobartonella* spp., assim como o parasita *Eperythrozoon* spp. estivessem mais próximos da classe Mollicutes devido a perda do parasitismo intracelular, tamanho pequeno, perda da membrana celular, perda do flagelo, resistência à penicilina e derivados e susceptibilidade as tetraciclina (TANAKA et al., 1965). A classe Mollicutes é filogeneticamente diversa e inclui mais de 150 espécies divididas em 8 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma*) (WOLF et al., 2004).

Metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) facilitaram a detecção e caracterização da *H. felis* deixando clara a taxonomia do organismo. Análises iniciais do gene 16S rRNA trouxe o organismo da classe das rickettsias para a classe Mollicutes e indicaram uma grande similaridade com *Mycoplasma* spp. (NEIMARK & KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997; JOHANSSON et al., 1999). Então *H. felis* (Organismo de Ohio ou forma maior) foi transferida para o gênero *Mycoplasma* como *M. haemofelis* e a forma menor ou organismo da Califórnia, que permanece sendo uma espécie nova e incompleta ganhou a designação de ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (RIKIHISA et al., 1997). Devido suas características, os mycoplasmas hemotróficos ganharam o termo “hemoplasmas” (MESSICK, 2004). Baseado nas semelhanças moleculares e características fenotípicas o gênero *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram definitivamente removidos da ordem Rickettsiales e colocados na família Mycoplasmataceae (NEIMARK et al., 2001; NEIMARK et al., 2002).

Em 2005, Willi e colaboradores identificaram uma terceira espécie de hemoplasma infectando felinos domésticos na Suíça designada ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. Análises moleculares demonstraram que esta espécie possui maior homologia com duas espécies de micoplasmas presentes em roedores, *Mycoplasma coccoides* e *Mycoplasma muris*. A infecção experimental com ‘*Candidatus M. turicensis*’ resultou em anemia severa em um gato após imunossupressão com metilpredisolona e moderada diminuição no volume globular em um gato imunocompetente. Outro estudo envolvendo análise filogenética do ‘*Candidatus M. turicensis*’ revelou que alguns gatos infectados na Austrália e África do Sul apresentavam a sequência do gene 16S rRNA contendo 32 a 33 nucleotídeos que divergem dos demais isolados sugerindo que pelo menos duas cepas do ‘*Candidatus M. turicensis*’ estão presentes infectando felinos domésticos (WILLI et al., 2006b).

Mesmo depois da transferência dos hemoplasmas para a família Mycoplasmataceae, a classificação destes no gênero *Mycoplasma* ainda causa controvérsia. Uilenberg e colaboradores (2004) argumentam que não existem evidências suficientes para essa classificação e sugere que os hemoplasmas devem ser reclassificados em um gênero separado ao do *Mycoplasma* devido suas características biológicas e moleculares específicas.

Peters e colaboradores (2008) utilizaram 40 diferentes espécies do gênero *Mycoplasma*, incluindo 11 hemoplasmas para construir duas árvores filogenéticas utilizando seqüências do gene 16S RNA ribossômico (16S rDNA) e Ribonuclease P (RNase P ou *rnpB*). Ambas as árvores colocam os hemoplasmas em um único grupo, mais proximamente relacionado com o *Mycoplasma fastidiosum* concordando com outros autores (JOHANSSON et al., 1999). Os hemoplasmas ainda foram subdivididos em dois grupos, um contendo os hemoplasmas *M. wenyonii*, *M. suis*, *M. ovis*, CM. haemolamae, CM. haemominutum, CM kahanei e CM. haematoparvum (Grupo Haemominutum) e outro contendo *M. haemofelis*, *M. haemocanis*, *M. coccoides* e CM. turicensis (Grupo haemofelis) (Figura 1).

3.2 Características

As bactérias do gênero *Mycoplasma* são os menores organismos conhecidos capazes de auto-replicação. São geneticamente relacionados às bactérias Gram positivas, das quais descendem provavelmente por evolução reductiva que lhes causou a perda de muitos genes. Em virtude desta perda de genes os micoplasmas não possuem parede celular e comportam-se como gram negativos com células medindo de 0,2 a 0,5 micra, com genoma variando de 580 a 1.330 Kb. Estes organismos não possuem grande parte das rotas metabólicas relacionadas com produção de energia e síntese de componentes celulares contidos nas demais bactérias, portanto são dependentes de nutrientes pré-formados e só ocorrem em associação com células animais hospedeiras. Os micoplasmas são ubíquos no reino animal e virtualmente todo mamífero, ave, réptil, anfíbio e peixe podem revelar a presença de alguma espécie. A maioria das espécies de micoplasmas parecem ser hospedeiro-específicas, porém existem vários relatos de infecções em hospedeiros diferentes do seu natural (PITCHER & NICHOLAS, 2004). Exemplos foram relatados em infecções por *M. ovis*, *M. muris* e *M. haemocanis* (RISTIC & KREIER, 1984; DADDOW, 1979; LUMB, 1961).

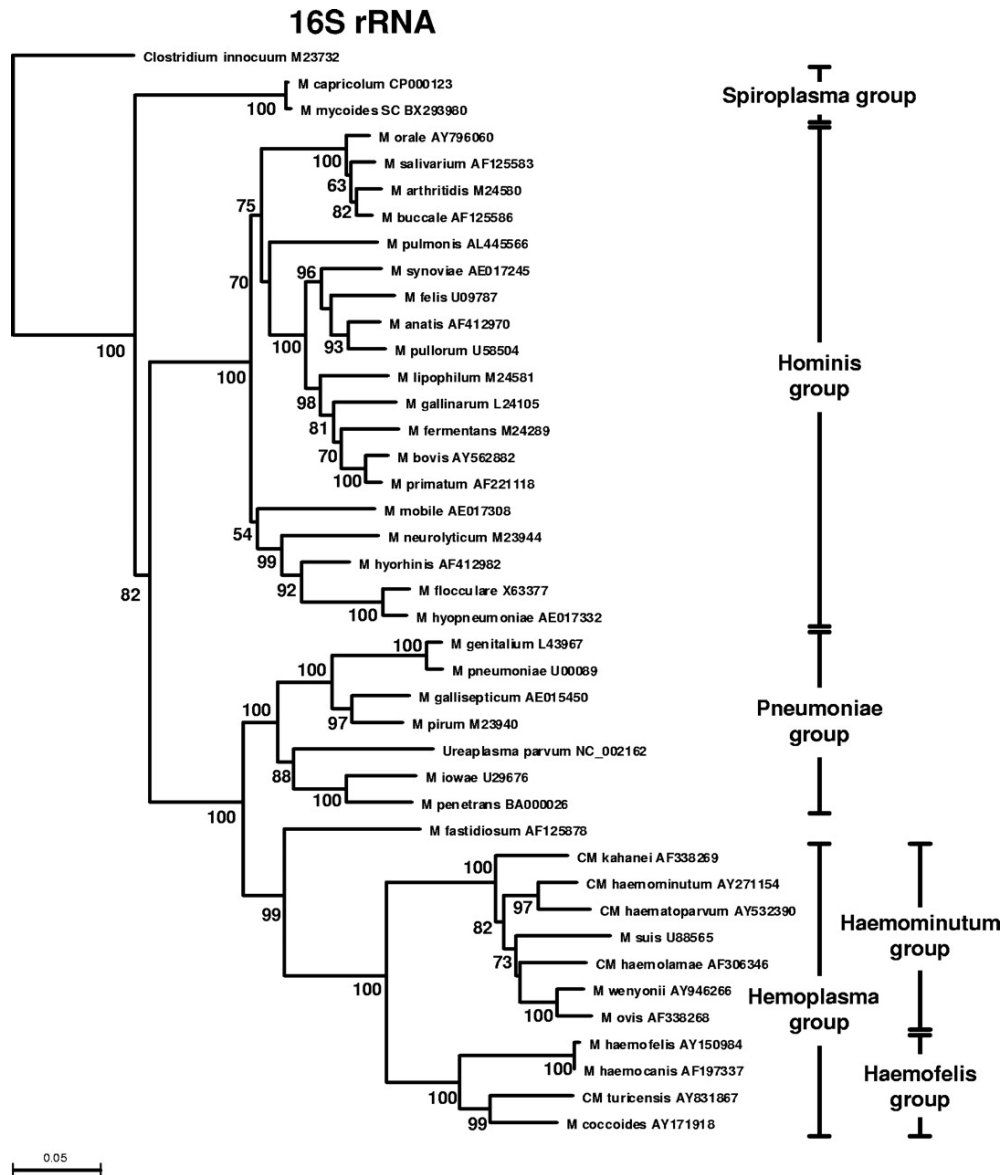


Figura 1. Análise filogenética baseada na seqüências do gene 16S rRNA dos hemoplasmas e outros micoplasmas. As distâncias evolutivas estão representadas pela escala (PETERS et al, 2008).

Os hemoplasmas, são parasitas epiteliais, pleomórficos que se aderem à superfície do eritrócito do hospedeiro (individualmente ou em cadeias), porém não invadem a célula, e como consequência podem causar anemia (MESSICK, 2004) (figura 2). Não são encontrados na natureza na forma livre e acredita-se que contenham apenas os genes essenciais para vida. Possuem DNA fita dupla contendo as informações que garantem replicação, transcrição e síntese protéica. Também possuem ribossomos. O *M. haemofelis* também mantém alguns genes responsáveis por conferir proteção contra

estresse oxidativo (BERENT & MESSICK, 2003). Para manter o ciclo vital, uma grande quantidade de seus genes é responsável por produzir adesinas e vários sistemas genéticos que conferem uma variabilidade de antígenos de superfície para escapar do sistema imune do hospedeiro (YOGEV & NAOT, 1998). Diferente dos demais *Mycoplasmas*, os hemoplasmas dependem da célula hospedeira para aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas e, por essa razão, estão associados aos eritrócitos (MILES, 1992).

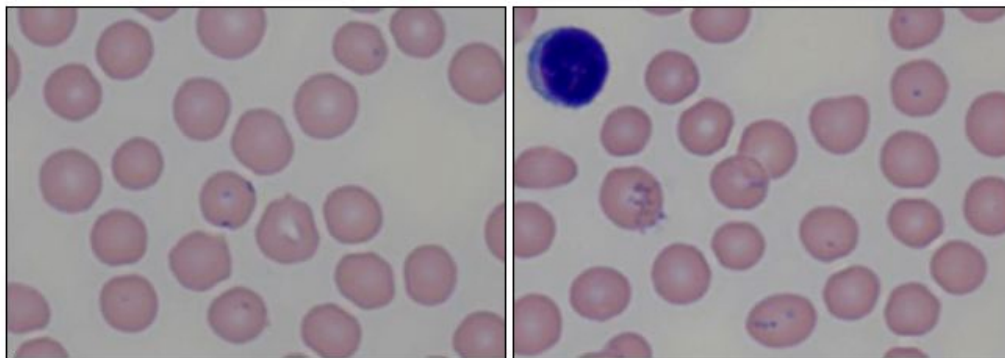


Figura 2. *Mycoplasma haemofelis* parasitando os eritrócitos de um felino experimentalmente infectado.

Berent & Messick (2003) ao desenvolverem o mapa físico e criarem a biblioteca genômica utilizando cromossomo bacteriano artificial (BAC) do *M. haemofelis*, chegaram a um produto, contendo todo genoma, de tamanho (linearizado) estimado em 1,199 kb (desvio padrão, 13,5 kb) e relataram 75 genes únicos e distintos que nunca haviam sido descritos em *Mycoplasma* spp. e que provavelmente são responsáveis pela adaptação ao eritrócito do hospedeiro. As autoras ainda relataram que cerca de 25% dos genes estão relacionados com tradução, estrutura ribossomal e biogênese, 14% com replicação do DNA, 9% com metabolismo de carboidratos, 6% com transcrição e 6% com transporte de nucleotídeos. Vários genes relacionados com fatores de virulência também foram encontrados neste estudo, estes incluem lipoproteínas de membrana, possivelmente relacionadas com sistema de variação antigênica (CITTI & WISE, 1995) e outros bem conhecidos como o gene VacB e MgpA para proteína adesina (CHENG et al., 1998; DALLO et al., 1989).

O gene para superóxido desmutase (SOD), que confere proteção contra o estresse oxidativo, parece ser exclusivo do *M. haemofelis* dentre os micoplasmas apesar do mesmo parecer ter um ancestral comum nas bactérias, os demais micoplasmas parecem ter perdido o gene ou um produto de um gene diferente assumiu o papel da produção da SOD. Existem ainda dois genes encontrados no *M. haemofelis* envolvidos na biossíntese da purina que codifica proteínas similares com a inosina-5`-monofosfato (IMP) desidrogenase e guanossina 3`,5`-monofosfato (GMP) sintetase, conferindo maior flexibilidade na biossíntese de aminoácidos, não existe nenhum relato descrevendo estas enzimas em *Mollicutes* spp., porém a presença do gene não prova a atividade da enzima (BERENT & MESSICK, 2003).

Diferente dos demais micoplasmas que, em condições laboratoriais apresentam colônias (menores que 1mm de diâmetro e com a forma característica referenciada como de “ovo frito”) e possuem crescimento lento (TIMENETSKY et al., 1992), os hemoplasmas não foram cultivados com sucesso até o momento (HARVEY, 2006), portanto as técnicas moleculares tornaram-se ferramenta essencial para o estudo da doença.

3.3 Anemia Infecciosa Felina (AIF)

A AIF também é conhecida como Hemobartonelose felina devido a antiga classificação dos parasitas. Em 2003(b), Sykes sugeriu a nomenclatura Micoplasmose Hemotrófica Felina para definir a mesma doença.

A infecção por *M. haemofelis* geralmente resulta em anemia hemolítica severa (BERENT et al., 1998) enquanto que a infecção por CMhm normalmente não desenvolve sinais clínicos (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001) apesar de alguns relatos onde o animal apresentou leve a moderada anemia após a infecção (LORIMER et al, 2004; GEORGE et al, 2002). A infecção experimental com ‘*Candidatus M. turicensis*’ resultou em anemia moderada a severa (WILLI et al, 2005) porém um novo estudo sugere que a co-infecção com outros hemoplasmas, algumas retrovíroses e imunossupressão podem estar envolvidos no desenvolvimento da anemia (WILLI et al, 2006a).

A doença pode ocorrer de forma aguda ou crônica. A anemia hemolítica regenerativa se dá pela destruição extra vascular pelo sistema fagocítico mononuclear e lise intravascular, pela lesão direta na membrana da célula parasitada aumentando a fragilidade osmótica, ou ambos os mecanismos (MESSICK, 2004).

3.3.1 Doença aguda

A forma aguda causada pelo *M. Haemofelis* é associada com massiva parasitemia dos eritrócitos causando severa anemia hemolítica que pode ser fatal. Sinais clínicos incluem: anemia, febre, letargia e esplenomegalia (CARNEY & ENGLAND, 1993) além de anorexia, icterícia (TASKER, 2004). A esplenomegalia pode estar associada à hiperplasia linfóide e reticulo endotelial ou pela hematopoiese extra medular e é geralmente o primeiro e único sinal aparente da infecção latente (MAEDE, 1978). A anemia é classificada como regenerativa, macrocítica e hipocrômica apresentando anisocitose, policromasia e aumento absoluto de reticulócitos (HARVEY & GASKIN, 1977). Segundo Kewish e colaboradores (2004), a infecção por FeLV pode inibir a regeneração eritróide e apresentar inicialmente anemia regenerativa que pode evoluir para arregenerativa, portanto a AIF deve ser adicionada como diagnóstico diferencial de gatos tanto com anemia regenerativa quanto arregenerativa. O autor enfatiza ainda a importância de utilizar-se de todas as informações disponíveis além do hemograma, como uma adequada avaliação clínica em animais suspeitos.

A leucometria apresenta pouca correlação com a doença. Gatos moribundos podem apresentar leucopenia e gatos com infecção aguda podem apresentar leucocitose por neutrofilia e desvio à esquerda regenerativo (FLINT et al., 1958). Monocitose, presença de monócitos ativados e eritrofagocitose são comuns na fase aguda (HARVEY & GASKIN, 1977).

A infecção experimental com *M. haemofelis* é bem documentada e cursa com o pico da parasitemia, que acompanha febre e letargia, 2 semanas após a infecção (FLINT et al., 1959; HARVEY & GASKIN, 1977;; BERENT et al., 1998; TASKER et al., 2006). Segundo Berent (2002), durante a infecção experimental em 4 gatos, anemia hemolítica foi observada 15 a 17 dias após a

infecção e durante este período, o hematócrito variou de 15 a 19%. Durante o pico da parasitemia, mais 80% dos eritrócitos estão infectados. A figura 3 demonstra o curso da infecção experimental em um dos gatos deste trabalho.

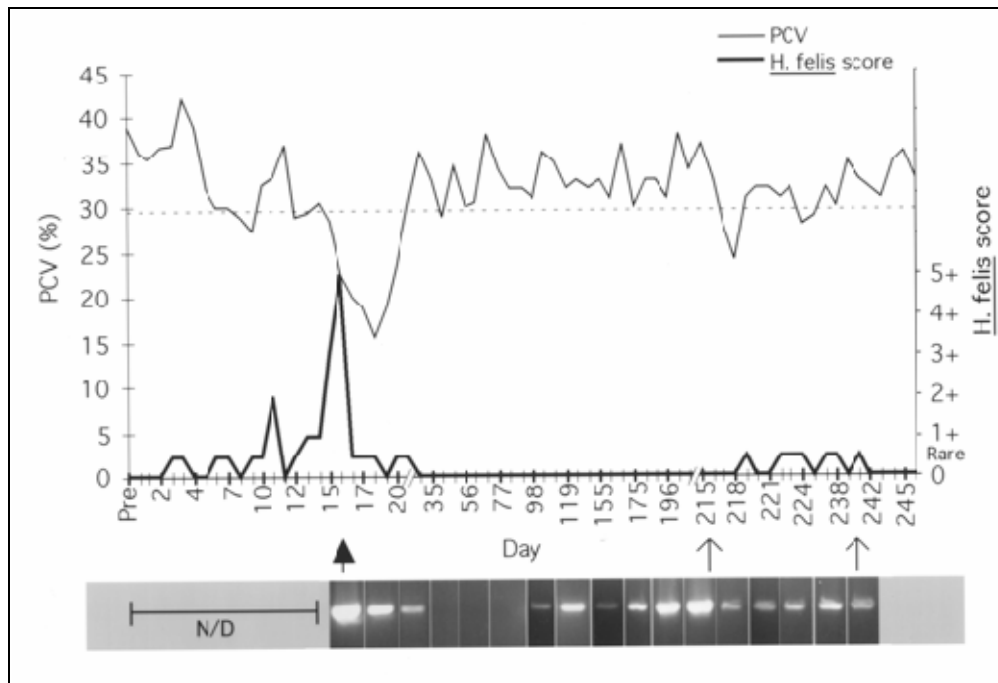


Figura 3. Gráfico comparativo entre os valores de hematócrito e valores de parasitemia em relação aos dias após a infecção experimental de um gato com *Mycoplasma haemofelis* e os resultados da PCR no DNA extraído do sangue. A figura com o resultado do PCR corresponde ao dia que o sangue foi coletado. A seta sólida corresponde ao pico da parasitemia e início do tratamento com doxiciclina (2.5 mg/kg via oral a cada 12 horas por 21 dias). As setas menores indicam tratamento com metilpredisolona (14 mg/kg, intravenoso). Dia 0 = dia da inoculação com sangue infectado com *Mycoplasma haemofelis*. Amostras de sangue foram coletadas diariamente entre os dias 0 a 21 e 215 a 245 e semanalmente 22 a 214. Linha fina: = valores do hematócrito (PCV). Linha grossa = valores de parasitemia estimados pelo esfregaço sanguíneo (H. felis score). N/D = período pré-patente onde o sangue não foi coletado para PCR. (BERENT, 2002).

Em estudos anteriores realizados por Harvey & Gaskin (1977 e 1978), os animais se recuperaram após a infecção experimental apenas com tratamento dos sinais clínicos, sem o uso de antibióticos, porém se tornaram

animais cronicamente infectados e carreadores do organismo. No estudo realizado por Berent (2002), os animais foram tratados com doxiciclina, 2.5 mg/kg 2 vezes ao dia por 21 dias, e se recuperaram, porém tornaram-se carreadores da doença.

A infecção experimental com a forma pequena, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', desenvolveu mínimos sinais clínicos da doença aguda e parece portanto ser menos patogênica (FOLEY et al., 1998; JENSEN et al., 2001) mas, para Kewish e colaboradores (2004), em certas circunstâncias a infecção com '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' pode ser associado com a doença clínica séria. Para Westfall e colaboradores (2001), estas diferenças na severidade da doença clínica podem estar refletindo uma diferença na patogenicidade das duas formas e um efeito dose-dependente. Dentre as alterações bioquímicas pode-se observar hiperbilirrubinemia e aumento das transaminases (VANSTEENHOUSE, 1995).

Dados sobre a infecção com a nova espécie '*Candidatus M. turicensis*' são escassas porém parecem ser dependentes de cofatores como imunossupressão e co-infecção com outros hemoplasmas (WILLI et al., 2007b). A infecção experimental em dois gatos com '*Candidatus M. turicensis*' causaram anemia leve em um dos gatos e moderada no outro gato que foi adicionalmente tratado com corticosteróide. O pico da parasitemia foi entre os dias 16 e 18 após a infecção (WILLI et al, 2005).

Infecções por piroplasmas como a babesiose felina possuem sinais clínicos como anorexia, depressão, letargia, perda de peso e icterícia principalmente na fase aguda, e devem ser incluídas no diagnóstico diferencial da doença aguda (SCHOELAN et al., 2001).

3.3.2 Doença crônica

A forma crônica da infecção por hemoplasmas é assintomática ou pode causar apenas uma leve anemia, alguns autores acreditam que a doença crônica pode resultar em aguda quando os animais são submetidos a condições de estresse, ou seja, quando o sistema imune torna-se comprometido (BOBADE et al., 1988; SMALL & RISTIC, 1971), o que se confirmou em gatos experimentalmente infectados durante a fase crônica da doença sob diversas

condições de estresse e da administração de glicocorticóides (HARVEY & GASKIN, 1978). No mesmo experimento, animais foram esplenectomizados e revelaram o aumento da parasitemia, porém não desenvolveram anemia, o que indica que a esplenectomia resulta em uma inabilidade transitória na elaboração da resposta imune específica. Em nenhum dos casos os animais ficaram doentes. Berent (2002) demonstrou que após a administração de metilpredisolona (14 mg/kg IV) em 2 gatos cronicamente infectados, os valores de hematócrito diminuíram de 37 a 24% e 35 a 27%, porém os animais não desenvolveram sinais clínicos da doença.

Quando um gato experimentalmente infectado recebe apenas tratamento paliativo para a resolução dos sintomas, sem o uso de antimicrobianos, uma recuperação é observada e o estado de portador pode ser desenvolvido (HARVEY & GASKIN, 1978) o mesmo acontece mesmo com o tratamento com doxiciclina (BERENT 2002). O animal pode permanecer portador por anos, e nesta fase podem ocorrer pequenas diminuições no hematócrito, variando de 25 a 35% e nunca abaixo de 20%, apesar disso, poucos parasitas podem ser detectados no esfregaço sanguíneo. Os valores hematológicos voltam a normalidade antes dos sinais clínicos após a infecção aguda, não sendo possível a diferenciação pela hematologia dos gatos portadores e sadios (HARVEY & GASKIN, 1978). Berent (2002) demonstrou que mesmo a administração de antimicrobianos, gatos experimentalmente infectados, também tornam-se portadores (figura 3) e Bobade e colaboradores (1988) relataram que gatos naturalmente infectados podem tornar-se portadores após o tratamento com antimicrobianos (BOBADE et al., 1988). Gatos infectados com '*Candidatus M. turicensis*' espontaneamente se recuperaram da infecção e apresentaram PCR negativo pelo período de um ano, mesmo com a administração de corticosteróides (WILLI et al., 2006a).

Gatos portadores tornam-se positivos ao teste de Coomb's, o que indica a presença de anticorpos anti-eritrocitários induzidos pela infecção, dificultando assim o diagnóstico entre anemia infecciosa felina e anemia hemolítica auto-imune (ZULTY & KOCIBA, 1990). A diferença entre gatos sadios e portadores é difícil de diferenciar, visto que o diagnóstico pelo esfregaço sanguíneo é pouco sensível e inespecífico. A PCR é indicada para a identificação de portadores, porém resultados negativos para a PCR foram

evidenciados imediatamente após o tratamento com doxiciclina (figura 3) (BERENT, 2002). Foley e colaboradores (1998) também observaram resultados negativos pela PCR logo após a administração de antimicrobianos, porém os animais retornaram a serem positivos aproximadamente uma semana após a suspensão do tratamento. Até o momento não se sabe como os organismos escapam ao tratamento. Especula-se que os hemoplasmas podem ter um tropismo por outro tipo celular ou podem ter a capacidade de invadir as células do sistema imune.

Animais cronicamente infectados são um risco para outros animais e ambiente e o uso da PCR como pré-requisito para animais como doadores de sangue é recomendado.

3.3.3 Outras afecções

Doenças associadas com micoplasmas incluem artrite, pneumonia, conjuntivite, infertilidade, mastite e vulvovaginite e os sinais clínicos são dependentes do tecido que o parasita tem tropismo (SIMECKA et al., 1992). Os hemoplasmas têm a característica única de parasitar eritrócitos, no entanto, baseado em evidências clínicas, a infecção de tecidos reprodutivos pode ser uma importante manifestação na doença crônica, porém isto ainda não foi investigado (MESSICK, 2004).

Sugere-se que a infecção por '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' pode causar doença mieloproliferativa e a infecção crônica por *M. haemofelis* pode causar a transformação neoplásica de células hematopoiéticas em animais FeLV-positivos (SHELTON & LINERBERGER, 1995).

3.3.4 Transmissão

As formas de transmissão dos hemoplasmas ainda são pouco compreendidas. Sabe-se que AIF pode ser induzida por ingestão oral ou injeção parenteral com sangue infectado (HARVEY & GASKIN, 1977; FLINT et al., 1958; BERENT et al., 1998). Transfusão sangüínea de animais portadores pode produzir a doença aguda em gatos susceptíveis (SPLITTER et

al., 1956; WILLI et al., 2006a). Existem relatos de infecção por *M. haemofelis* em filhotes recém nascidos sugerindo que a transmissão transplacentar também pode ocorrer, apesar de não ter sido confirmada (HARBUTT, 1963).

Vetores artrópodes como pulgas e carrapatos são transmissores potenciais e tem sido proposto que têm um papel na transmissão entre os animais (CARNEY & ENGLAND, 1993). No japão, DNA do ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ foram detectados em carrapatos *Ixodes ovatus* em diferentes regiões sugerindo que os carrapatos podem ser responsáveis pela transmissão transestadial (TAROURA et al., 2005).

O DNA de *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ já foi detectado em pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* em vários estudos (SHAW 2003; WOODS et al., 2005; LAPPIN et al., 2006) porém a tentativa de se transmitir *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ entre gatos infectados com pulgas infectadas não foi conclusiva, onde apenas um dos 6 gatos do estudo se tornou positivo para *M. haemofelis* pela PCR porém não apresentou sinais da doença (WOODS et al., 2006).

Pouco se sabe sobre a presença de hemoplasmas em vetores artrópodes a prova definitiva da identidade do vetor permanece desconhecida. No Brasil, o papel dos vetores artrópodes na transmissão dos hemoplasmas não foi investigada até o momento.

Novos estudos sobre os fatores de risco para a infecção com hemoplasmas sugerem que a infecção pode ser transmitida pelo contato direto entre os gatos. ‘*Candidatus M. turicensis*’ foi detectado pela PCR na saliva e fezes de gatos infectados (WILLI et al., 2007a). ‘*Candidatus M. haemominutum*’ também foi detectado na saliva e glândula salivar de gatos experimentalmente infectados, porém *M. haemofelis* não foi detectado (DEAN et al., 2005). Este fato sugere que a convivência entre os gatos, a ocorrência de brigas pode estar envolvida na transmissão dos organismos. Willi e colaboradores (2007a) sugerem que devido as baixas concentrações de parasitas na saliva e fezes dos animais a interação entre eles deve ser agressiva para que a infecção ocorra.

3.3.5 Fatores de risco

A existência de fatores de risco que predispõe os felinos à AIF, pode ser: animais portadores de leucemia infecciosa felina (FeLV), imunização incorreta, histórico de abscessos por mordeduras e arranhaduras de outros gatos, animais que possuem livre acesso à rua, estresse, gestação, infecções intercorrentes, neoplasias, presença de ectoparasitos e flebotomídeos no ambiente (TASKER et al., 2003a; GRINDEM et al., 1990). Animais podem ter predisposição à infecção aguda pela idade, co-infecções, imunossupressão ou esplenectomia. A infecção crônica é pouco definida e geralmente é inaparente ou ocorre em animais imunocompetentes sem esplenectomia (MESSICK, 2004).

A infecção por *M. haemofelis* pode ocorrer associada à retrovíroses, incluindo o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV) (LAPPIN, 1995). Segundo Grindem e colaboradores (1990) o risco da infecção aumenta quando o animal apresenta anemia, falta de vacinação, histórico de mordedura de outro gato concomitante com a presença de abscesso e/ou anemia, idade menor ou igual a três anos e em gatos de vida livre. Sexo, raça, número de gatos convivendo juntos, presença ou não de pulgas não foram fatores significantivos, no entanto machos doentes apresentaram grande risco.

Gatos experimentalmente infectados com FeLV e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ desenvolvem anemia mais severa do que gatos com o parasita sozinho, que podem perder a patogenicidade pela passagem por gatos livres de FeLV e ainda induzir doença mieloproliferativa em gatos FeLV positivos (GEORGE et al., 2002). Harrus e colaboradores (2002), em um estudo de 45 casos de AIF clínica em Israel, encontraram 38% dos gatos testados positivos para FeLV e 22% para FIV; prevalência superior a população de gatos domésticos da região. Foi observado também que os gatos positivos para FeLV desenvolviam maior grau de anemia, com volume corpuscular médio superior e temperatura corporal inferior aos FeLV negativos. Luria e colaboradores (2004) observaram que a presença de retrovíroses também aumenta o risco de infecção por *Mycoplasma* spp. em gatos de vida livre no norte da Florida.

A infecção por *M. haemofelis* é vista com maior frequência em climas quentes ou durante as estações quentes do ano, fato relacionado com a maior presença dos vetores (CARNEY & ENGLAND, 1993).

3.3.6 Diagnóstico

Historicamente, o diagnóstico da AIF é feito através da visualização da bactéria nos eritrócitos, em esfregaço sangüíneo com corantes do tipo Romanowsky ou laranja de acridina (BOBADE & NASH, 1987), porém os episódios cíclicos de parasitemia na doença aguda e os baixos números de organismos circulantes na doença crônica complicam o diagnóstico da doença, perdendo a relação de parasitemia e sinais clínicos (HARVEY & GASKIN, 1977). Segundo Alleman e colaboradores (1999), parasitemias de 80% ou mais podem persistir por 3 dias ou mais se evitada a demora na colheita da amostra, porém para Harvey & Gaskin (1977) o número dos parasitas freqüentemente declinam de mais 90% para menos de 0,1% em 3 horas ou menos mesmo que os animais sejam esplenectomizados. Flutuações da parasitemia parecem ser exclusivas do *M. haemofelis* (FOLEY et al., 1998; JENSEN et al., 2001; WESTFALL et al., 2001). Os números podem diminuir drasticamente de 90% de parasitemia, com os eritrócitos contendo múltiplos organismos, até um número mínimo indetectável em um período de uma hora tanto em animais esplenectomizados quanto intactos (BERENT et al., 1998). Uma hipótese para este evento é que o *M. haemofelis* seja capaz de se aderir a outro tipo celular durante seu desaparecimento do sangue.

O mecanismo da retirada dos parasitas em animais esplenectomizados é especulativo, mas acredita-se que os macrófagos nos pulmões, fígado e medula óssea realizem este papel (HARVEY, 1990). Parece evidente que o baço é o principal responsável pela retirada dos parasitas dos eritrócitos infectados visto que a parasitemia declina mais devagar (até duas vezes mais) em gatos esplenectomizados que em não esplenectomizados (MAEDE, 1978). Gatos assintomáticos que forem esplenectomizados podem apresentar parasitemia recorrente, mas na maioria dos casos não desenvolvem a doença (HARVEY & GASKI, 1978). Mesmo sendo freqüentemente observada no esfregaço sangüíneo de gatos anêmicos, seu papel e a etiologia da síndrome permanecem

obscuros, pois este agente não se multiplica em cultura e gatos portadores assintomáticos podem servir como reservatórios da infecção (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998). Testes sorológicos também são referidos como insensíveis (FOLEY et al., 1998).

Técnicas moleculares baseadas na PCR se fizeram necessárias para a detecção dos hemoplasmas. A PCR é uma técnica molecular extremamente sensível e específica que amplifica *in vitro* um fragmento de DNA particular do organismo e é capaz de detectar tanto animais cursando com a doença aguda como crônica, bem como servir como ferramenta para a identificação de animais portadores, evitando sua utilização como doadores de sangue ou animais a serem usados em pesquisa científica.

Relman e colaboradores (1990) demonstraram que os organismos que não se multiplicam em cultura podiam ser detectados por amplificação por PCR da porção 16S do RNA ribossômico (rRNA) e Regenery e colaboradores (1992) detectaram esses organismos em amostras clínicas como o sangue periférico. As seqüências de nucleotídeos da porção 16S rRNA são conservadas entre as bactérias perdendo sua especificidade (COLE & GIRONS, 1994; WILSON et al., 1990). Pela identificação de regiões hipervariáveis do gene, iniciadores (*primers*) espécie-específicos podem ser desenvolvidos e validados como importante ferramenta de diagnóstico com grande especificidade (GARCIA et al., 1996). Mesmo que a maioria dos micoplasmas contenham apenas 1 a 2 cópias do gene 16S rRNA (RAZIN, 1985) enquanto que as demais bactérias contém 7 a 10 cópias do gene (KISS et al., 1977; LOUGHNEY et al., 1982), gene 16S rRNA é a base para todas as técnicas por PCR para hemoplasmas até o momento.

Diversas técnicas tem sido descritas para a detecção dos hemoplasmas em felinos: Os primeiros ensaios foram desenvolvidos em 1998. Na Universidade de Illinois, Messick e colaboradores (1998) desenvolveram *primers* específicos para *M. haemofelis* (*Haemobartonella felis*) utilizando 4 gatos experimentalmente infectados e em pico de parasitemia. No mesmo ano Berent e colaboradores, usando os *primers* específicos para *H. felis* concluíram que era possível detectar o parasita no sangue dos animais experimentalmente infectados durante o pico da parasitemia e durante a maioria da fase de reservatório, porém não na fase imediata ao tratamento com doxiciclina,

corroborando com Kewish e colaboradores (2004) onde a PCR teve resultado negativo após 12 horas do início da terapia antimicrobiana e retornou a positividade após encerrado o tratamento. O limite de detecção do PCR foi de 50 a 704 organismos por mL de sangue (BERENT et al., 1998).

Na Universidade de Califórnia – Davis, Foley e colaboradores (1998) desenvolveram um ensaio pela PCR para detecção do ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, possibilitando a diferenciação entre as espécies. Em 2001, Jensen e colaboradores desenvolveram uma técnica capaz de detectar as duas espécies em uma única reação, utilizando *primers* capazes de detectar ambos *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ porém cada espécie resultando em produtos de tamanhos diferentes (170 pb e 193 pb respectivamente). Criado-Fornelio e colaboradores (2003) desenvolveram um novo protocolo baseado na PCR (PCR-RFLP) e baseado nos ensaios pré-existentes porém com algumas vantagens: utilizando enzimas de restrição que podem confirmar a identidade do agente. Neste ensaio foi utilizada a enzima *XbaI* que contém sítios conservados entre os micoplasmas, mas no PCR-RFLP gera produtos diferentes para *M. haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e trata-se de uma enzima barata e que mantém sua atividade na presença do tampão utilizado no PCR, tornando o método rápido e simples. Fujihara e colaboradores (2007), desenvolveram uma técnica por *nested-PCR* para o diagnóstico das 3 espécies de hemoplasmas em gatos.

Recentemente, técnicas utilizando a PCR em tempo real, tem sido desenvolvidas para a detecção de *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ (TASKER et al., 2003b; WILLI et al., 2006a; SYKES et al., 2008). Peters e colaboradores (2008), desenvolveram uma técnica de diagnóstico também por PCR em tempo real combinada com um controle interno adicionando *primers* específicos para o gene 28S rRNA do felino. A presença do controle interno evita falsos negativos decorrentes de erros provenientes da extração do DNA, de erros durante o preparo do ensaio e a presença de inibidores da reação (MORATA et al., 1998; AL-SOUD et al., 2001).

Mesmo com diversas técnicas disponíveis, poucos trabalhos comparam a sensibilidade e especificidade das mesmas. As técnicas desenvolvidas para a detecção do *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ desenvolvidas

antes da descoberta da nova espécie, '*Candidatus M. turicensis*', permanecem sendo específicas, exceto a técnica desenvolvida por Jensen e colaboradores (2001). As técnicas por PCR em tempo real é vantajosa pelo fato de ser quantitativa enquanto que as técnicas convencionais apenas esclarecem a presença do parasita, porém o equipamento para a PCR em tempo real ainda permanece caro e está restrito aos laboratórios de pesquisa. Até o presente trabalho, não foi descrita técnica de PCR convencional para '*Candidatus M. turicensis*'.

A aplicação das técnicas moleculares pode esclarecer o impacto desta doença na população de felinos e responder as perguntas relacionadas à prevalência, transmissão e fatores de risco da doença, bem como servirem como ferramenta para seleção de animais doadores de sangue e a serem usados em pesquisa científica.

3.3.7 Prevalência

A doença é considerada uma freqüente causa de anemia por alguns autores e uma doença incomum por outros. Estudos em prevalência estimam que o parasita na população de felinos pode variar de 0,9 a 28% (CARNEY & ENGLAND, 1993).

Durante mais de 3 anos, mais de 400 gatos foram testados nos laboratórios dos Estados Unidos tanto com o ensaio desenvolvido por Illinois e pelo da Califórnia para *M. haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' respectivamente, onde cerca de 12% dos gatos anêmicos estavam infectados por *M. haemofelis* comparado com 1,5% dos não anêmicos. No entanto, 7,2% dos anêmicos e 5,3% dos não anêmicos estavam infectados por '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (MESSICK, 2004).

Jensen e colaboradores (2001) desenvolveram uma técnica única de PCR que além de detectar, diferencia as duas espécies de hemoplasma felino. Neste trabalho, 220 gatos foram divididos em dois grupos (baseado na presença de anemia, febre ou presença do parasita no esfregaço sangüíneo): grupo controle (n=138) e "suspeito" (n=82). Do total, 28% dos gatos do grupo "suspeito" foram positivos para hemoplasmas. O agente *M. haemofelis*, sozinho ou em combinação com '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*',

foi detectado em 17,1% dos gatos deste grupo e em nenhum dos gatos do grupo controle. ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ foi detectado em 11% dos “suspeitos” e 13,7% dos controles. A prevalência total do estudo foi de 19,5%.

Existem poucos trabalhos com relatos sobre isolados de hemoplasmas fora dos Estados Unidos e sua distribuição mundial permanece pouco conhecida (TASKER et al, 2003b). Em um estudo no Reino Unido usando a mesma técnica de PCR, foi observada uma prevalência de 18,5% dos gatos infectados, porém 92% eram positivos para ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ demonstrando uma notável diferença da prevalência das espécies entre essas duas regiões (TASKER et al., 2003a). Na Espanha, Criado-Fornelio e colaboradores (2003) encontraram 66,6% de gatos positivos para *M. haemofelis* e 33,3% para ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ num total de 30 gatos sintomáticos e a análise das seqüências do gene 16S rRNA revelou que as espécies eram similares aos isolados dos Estados Unidos e Reino Unido. Tasker e colaboradores (2004), em um estudo na região de Sidney, Austrália, usando a técnica do PCR quantitativo em tempo real, encontraram a presença de *M. haemofelis* em 4,1% de 147 gatos, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ em 23,1% e um gato (0,7%) infectado com as duas espécies onde o isolado de *M. haemofelis* encontrado na Austrália era similar com a forma de Ohio (CLARCK et al, 2002). Inokuma e colaboradores (2004), usando a técnica de análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, do inglês *restriction fragment length polymorphism*) (TASKER et al., 2003a) encontraram 2 gatos apresentando *M. haemofelis* e 16 com ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ num total de 102 gatos na região de Yamaguchi, Japão. No mesmo estudo as seqüências parciais do gene 16S rRNA foram comparadas e tiveram 98,3 – 99,8% e 96,4 – 100% de similaridade com as linhagens de *M. haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ dos outros países. Também no Japão, Watanabe e colaboradores (2003) descreveram 18 casos de animais infectados com hemoplasmas onde 67% eram positivos para *M. haemofelis*, 22% positivos para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e 11% para ambas as espécies.

Essas diferenças, principalmente entre os estudos nos Estados Unidos e Reino Unido, mostram que existe uma notável diferença geográfica na

prevalência destas espécies. Não existem estudos moleculares e de prevalência para estas espécies no Brasil mesmo que a infecção por *Haemobartonella* spp. tenha sido mencionada no Rio de Janeiro, porém com o diagnóstico apenas por microscopia óptica (MENDES-DE-ALMEIDA et al., 2004). Em 2005, um caso de co-infecção com ambas as formas *M. haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ foi relatado em um felino em Curitiba/Paraná com o uso do PCR (GUIMARÃES et al., 2005), o que demonstra que ambos agentes estão presentes no país. Neste mesmo relato, o animal apresentou anemia regenerativa. Os autores sugerem que o animal parecia ser portador do *M. haemofelis* e que provavelmente o responsável pela forma aguda da doença foi o ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’.

Desde a presença da espécie ‘*Candidatus M. turicensis*’ recentes trabalhos de prevalência foram publicados, no entanto é difícil fazer uma comparação entre os trabalhos devido a diferença na metodologia e tipos de população estudada. A tabela 1 demonstra os trabalhos de prevalência incluindo a espécie ‘*Candidatus M. turicensis*’, bem como o tipo de população estudada.

Tabela 1. Prevalência da infecção pelas 3 espécies de hemoplasmas e o tipo de população estudada em diferentes países.

País	Tipo de população estudada	Número de gatos (n)	PCR + para hemoplasma	Prevalência (%)
Suíça ^a	gatos doentes e saudáveis	615	61	9.92
Reino Unido ^b	gatos doentes e saudáveis	426	82	19.25
Austrália ^b	gatos doentes e saudáveis	147	47	31.97
África do Sul ^b	gatos suspeitos de AIF	69	36	52.17
Alemanha ^c	gatos anêmicos e não anêmicos	135	21	15.56
Japão ^d	amostra submetida a laboratório	60	35	58.33
Estados Unidos ^e	gatos suspeitos de AIF	310	85	27.42
Reino Unido ^f	amostra submetido a laboratório	1585	222	14.01

^a WILLI et al., 2006a; ^b WILLI et al., 2006b; ^cJUST & PFISTER, 2007;

^dFUJIHARA et al., 2007; ^eSYKES et al., 2008; ^fPETERS et al., 2007.

3.3.8 Tratamento

O desenvolvimento das técnicas baseadas na PCR tem trazido informações adicionais sobre a significância do teste de PCR positivo e tem sido uma ferramenta útil para o monitoramento do tratamento da doença com antibióticos (TASKER et al., 2003c).

O tratamento para AIF com doxiciclina (5-10 mg/kg) ou enrofloxacin (5-10 mg/kg) oral por 3-4 semanas é recomendado para gatos com anemia clínica pode ser combinado com transfusão sanguínea e prednisolona em casos severos. Mesmo com uma resposta positiva ao tratamento, os gatos podem se tornar portadores assintomáticos (SHAW 2003). Vários autores recomendam o uso da Doxiciclina no tratamento da doença aguda por *M. haemofelis* devido a rápida diminuição dos parasitas circulantes e eliminação dos sinais clínicos e aumento do hematócrito (BERENT et al., 1998; DOWER et al, 2002). Porém a doxiciclina falhou no tratamento da infecção por ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em gatos experimentalmente infectados (SYKES et al. 2007). Pouco se sabe sobre o tratamento da infecção por

'*Candidatus M. turicensis*', porém Willi e colaboradores (2006a) utilizaram doxicilina em gatos infectados onde os parasitas foram eliminados depois de 2 semanas e permaneceram PCR negativos até um ano após o tratamento. Nenhum regime com antibióticos mostraram eliminar totalmente a infecção, porém Tasker e colaboradores (2006) recomendam o uso de doxiciclina na dose de 10mg/kg via oral, diariamente por 6 semanas ou mais na tentativa de eliminar completamente a infecção.

O uso da doxiciclina e enrofloxaxina deve ser administrado considerando a possibilidade de efeitos adversos como esofagite no tratamento com doxiciclina oral (GERMAN et al., 2005) e degeneração retinal e cegueira aguda no caso do uso da enfloxacina acima da dose de 5mg/kg por dia (HAMPSHIRE et al., 2004).

Dois recentes estudos avaliaram o efeito da marbofloxacina (2mg/kg) durante o período de 4 semanas em gatos experimentalmente infectados com *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' (TASKER et al., 2006) onde resultados negativos para *M. haemofelis* foram observados após o tratamento, porém reduzido efeito foi observado para '*Candidatus M. haemominutum*', O tratamento com este antibiótico ainda não foi testado para infecção por '*Candidatus M. turicensis*'.

O uso de corticosteróides não é recomendado no tratamento da infecção por hemoplasmas, visto que o uso de corticosteróides aumentaram a parasitemia como observado por Willi e colaboradores (2005) em gatos experimentalmente infectados com '*Candidatus M. turicensis*'.

3.3.9 Anemia Infeciosa Felina no Brasil

Vários casos de infecção por *Mycoplasma* spp. tem sido descritos pela presença do parasita no esfregaço sanguíneo, porém devido a maior utilização das técnicas moleculares a sensibilidade da detecção dos hemoplasmas no Brasil. (GUIMARAES et al., 2008). As espécies descritas no Brasil são: *M. haemofelis* '*Candidatus M. haemominutum*' (DE MORAIS et al., 2007; GUIMARÃES, 2008).

Pela utilização da PCR, 14 de 37 (38%) gatos anêmicos (Ht < 24) provenientes de um hospital veterinário em Curitiba 4 (11%) foram positivos para *M. haemofelis*, enquanto que 4 (11%) foram positivos para '*Candidatus*

M. haemominutum', e 3 (8%) co-infectados pelos dois organismos (BAUMANN et al., 2006). No mesmo estudo, ao comparar o esfregaço sanguíneo como método de diagnóstico, *Mycoplasma* spp. foi encontrado em apenas 1/3 das amostras positivas pela PCR.

Em São Paulo, hemoplasmas foram detectados em 23 (8.5%) de 270 gatos anêmicos ($Ht < 30\%$). Dos 23 gatos positivos, 11 foi para *M. haemofelis*, 4 para 'Candidatus *M. haemominutum*' e 8 co-infecções (HORA, 2008; HORA et al., 2008b). Outro estudo em gatos saudáveis ($n=80$) e doentes ($n=74$) em Botucatu/SP, 8 (10%) dos gatos saudáveis e 15 (20%) dos gatos doentes foram positivos para *M. haemofelis* e/ou 'Candidatus *M. haemominutum*' (BATISTA, 2004). No Rio de Janeiro, 149 gatos foram testados pela PCR e southern blot (MACIEIRA et al., 2008b): 15 (10%) eram positivos para 'Candidatus *M. haemominutum*', 6 (4%) para *M. haemofelis*, e 3 (2%) co-infectados (MACIEIRA et al., 2006; MACIEIRA et al., 2008a; MACIEIRA et al., 2008b). Estes resultados tiveram uma maior frequência comparado com outro trabalho também no Rio de Janeiro utilizando o esfregaço sanguíneo como meio de diagnóstico onde 5 (3.6%) de 138 gatos foram positivos para hemoplasmas (VELHO et al., 2008).

Apesar de ser difícil estabelecer uma relação direta entre as frequências dos trabalhos brasileiros, devido ao tipo de população estudada e diferentes formas de diagnóstico, parece existir uma diferença geográfica relacionada com a infecção pelos hemoplasmas. A infecção por hemoplasmas em gatos anêmicos e não anêmicos variou de 8.5% em São Paulo a 38% em Curitiba. No Rio de Janeiro a prevalência em gatos incluindo anêmicos e não anêmicos foi 16% e 15% em Botucatu.

Trabalhos brasileiros incluindo fatores de risco concluíram que os gatos infectados somente com FIV ou co-infectados com FIV e FeLV tem maior risco de serem infectados com 'Candidatus *M. haemominutum*' que gatos negativos para retrovírus. (HAGIWARA et al., 1997; HORA et al., 2007; HORA, 2008; HORA et al., 2008a; HORA et al., 2008b; MACIEIRA et al., 2008a).

O fato que a espécie 'Candidatus *M. turicensis*' não foi incluída nos trabalhos brasileiros, a interpretação de resultados pode ser equivocada e mais estudos no Brasil são necessários para avaliar o impacto da infecção por

hemoplasmas. Porém com estes estudos, pode-se concluir que a infecção por hemoplasmas é comum em gatos domésticos o sudeste e sul do Brasil.

3.4 Hemoplasmose em cães

Existem duas formas de hemoplasmas descritas em cães: *Mycoplasma haemocanis* (antigamente conhecido como *Haemobartonella canis*) e uma nova forma designada ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ (SYKES et al., 2004).

M. haemocanis foi identificado pela primeira vez em 1928 (KIKUTH, 1928), desde então vários casos foram descritos (CARR & ESSEX, 1944; BENJAMIN & LUMB, 1959; PRYOR & BRADBURY, 1975; BELLAMY et al., 1978; MIDDLETON et al., 1982; BRISON & MESSICK, 2001). A infecção com *M. haemocanis* pode causar anemia hemolítica, porém a doença aguda em cães é menos freqüente e associada a esplenectomia e imunossupressão (MESSICK, 2004). Raramente a doença é descrita em cães imunocompetentes (MCNAUGHT et al., 1935; NORTH, 1978; AUSTERMAN, 1979). Cães imunocompetentes podem ser carreadores crônicos ou assintomáticos até que uma condição como a retirada do baço ou quimioterapia aconteça, nesses casos o episódio agudo pode ocorrer (MESSICK, 2004). Os sinais clínicos da doença aguda incluem anorexia, letargia, perda de peso e febre e em casos severos a anemia hemolítica pode ser fatal (NORTH, 1978; WEST, 1979). Os sinais da doença podem se tornar evidentes em 1-2 semanas após a infecção (WRIGHT, 1971; PRYOR & BRADBURY, 1975) ou com um período de 4-9 semanas (BRISON & MESSICK, 2001; BRODEY & SHALM, 1963; KEMMING et al., 2004a).

Achados hematológicos incluem anemia severa acompanhada de leucopenia (BENJAMIN & LUMB, 1959; DONOVAN & LOEB, 1960; KEMMING et al., 2004a) ou leucocitose acompanhada de um temporário desvio à esquerda (GRETILLAT, 1981; DONOVAN & LOEB, 1960; KEMMING et al., 2003). Trombocitopenia também é um achado comum na doença (BRODEY & SHALM, 1963; HOSKINS, 1991).

A nova espécie de hemoplasmas em cães, ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’, é mais proximamente relacionada com a forma menor

'*Candidatus M. haemominutum*' dos felinos. As análises dos genes 16S rRNA e RNase P demonstraram 94% e 75% de homologia respectivamente entre as espécie e apenas 78% e 65% de homologia com *M. haemocanis* (SYKES et al., 2005).

A infecção experimental com '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', demonstrou que o organismo é capaz de causar doença em cães imunossuprimidos e esplenectomizados (SYKES et al., 2005), porém mais estudos são necessários para averiguar o impacto da doença na população canina.

A transmissão da doença em cães é semelhante a dos felinos e o carrapato *Rhipcephalus sanguineus* é considerado um vetor de particular importância (SENEVIRATN et al., 1973). A doença já foi descrita em diferentes regiões dos Estados Unidos e Europa (SYKES et al., 2003b; TASKER et al., 2003a; KENNY et al., 2004), porém o impacto da doença em países como o Brasil, onde o vetor é comumente encontrado, não foram investigados. Existem evidências que o *M. haemocanis* pode ser transmitido da mãe para o filhote via transplacentar (KRAKOWKA, 1977).

Devido a similaridade das seqüências do gene 16S rRNA entre as espécies *M. haemofelis* e *M. haemocanis*, e '*Candidatus M. haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', a detecção dos hemoplasmas em cães podem ser acessadas pelas mesmas técnicas pela PCR descritas por (Messick e colaboradores (1998) e Foley e colaboradores (1998).

De particular interesse para a comunidade científica, Kemming e colaboradores (2004a) reportaram o primeiro surto da infecção por *M. haemocanis* em cães da raça *beagle* provenientes de um reconhecido canil comercial na Alemanha fornecedor de cães para a pesquisa. No mesmo ano mesmo grupo investigou a prevalência do *M. haemocanis* em outros 3 canis comerciais, localizados no leste europeu, oeste europeu e um nos Estados Unidos. Os dados de prevalência foram comparados com um grupo controle composto por cães domésticos apresentados ao Hospital Veterinário da Universidade de Illinois. Os resultados do trabalho demonstraram que os 3 canis possuíam cães positivos para *M. haemocanis* (prevalências de 30, 35 e 87%) enquanto nenhum cão do grupo controle foi positivo (KENNING et al., 2004b). Esses resultados demonstram que possivelmente trata-se de uma

doença comum em animais de canis comerciais fornecedores de cães supostamente livres de patógenos a serem usados para diversos tipos de pesquisa. Muitas pesquisas utilizando esses animais podem possuir resultados equivocados por não considerar que a infecção por *M. haemocanis*. Além disso, pouco se sabe sobre a resposta imune aos hemoplasmas e o impacto que a infecção pode ter causado em diferentes estudos, principalmente àqueles envolvendo imunossupressão e esplenectomia, ao longo dos anos. Os resultados destes trabalhos devem ser questionados.

Para tanto, a adição da PCR para a detecção de hemoplasmas em animais a serem usados em pesquisa e um controle de rotina para laboratórios comerciais fornecedores de animais assim como para a escolha de cães doadores de sangue é recomendada.

3.5 Hemoplasmose em humanos

Relato de hemoplasmose em humanos são raros. Existem algumas evidências da infecção em humanos, mas acredita-se que os humanos possam ser carreadores assintomáticos dos organismos (RISTIC & KREIER, 1979). Os mesmos problemas relacionados aos métodos convencionais de diagnóstico para hemoplasmas referidos para os animais agravam-se para a detecção em humanos devido a sistemática automatização dos laboratórios, principalmente o uso de analisadores automáticos de sangue para o hemograma onde a contagem diferencial de leucócitos é automática e os esfregaços sanguíneos não são observados. Além disso técnicos em hospitais humanos não são habituados a identificar este tipo de organismos epieritrocíticos como os hemoplasmas.

Infecções com outros tipo de micoplasma (não hemotróficos) são comuns em pacientes imunocomprometidos. Blanchard e Montagnier (1994) sugerem que os micoplasmas atuam como um acelerador na progressão da doença em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), possivelmente pela ativação do sistema imune, produção de super antígenos e/ou pelo aumento do stress oxidativo das células. A produção de super-antígenos pelos micoplasmas também tem sido associada a pacientes com artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico (TAYLOR-ROBINSON,

1996; LO, 1992). Alguns estudos também descrevem micoplasmas como causadores de infecções oportunistas em pacientes recebendo drogas imunossupressoras para o tratamento de doenças neoplásicas e pós-transplante de órgãos ou tecidos (KOTB, 1995; COLE & ATKIN, 1991).

Alguns estudos já foram descritos sugerindo a infecção por hemoplasmas em humanos, porém nenhum trabalho utilizando técnicas moleculares foram realizados até o momento. No entanto, Kallick e colaboradores (1972) evidenciaram a presença de microorganismos semelhantes à *Haemobartonella* em pacientes com lupus eritematoso sistêmico. O mesmo foi evidenciado por Clark (1975) demonstrou a presença de um pequeno número de inclusões basofílicas semelhantes à *Haemobartonella* nos eritrócitos de um paciente apresentando anemia crônica por 7 anos. A parasitemia ficou evidente nesse paciente quando o mesmo foi diagnosticado com melanoma maligno. Em 1992, Duarte e colaboradores relataram achados semelhantes em 6 pacientes anêmicos com SIDA no Brasil.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos na China e África na tentativa de avaliar a prevalência destes organismos em humanos. Gretillat & Konarzewski (1978) demonstraram uma alta incidência (80 pacientes positivos de um total de 94) dos organismos associados aos eritrócitos em pacientes debilitados na Nigéria pela observação dos organismos no esfregaço sanguíneo. Na China, 3 estudos investigando a presença de micoplasma hemotrófico em humanos foram realizados, demonstrando diferentes prevalências dependendo da estação do ano e localidade (mais freqüente em áreas rurais e durante as estações quentes do ano) (SHANG, 1994, SHANG, 1995, YANG et al., 2000). Em um dos trabalhos as mães foram avaliadas e os organismos foram também identificados no cordão umbilical e no sangue periférico dos recém nascidos, sugerindo a transmissão vertical dos organismos (SHANG, 1995).

Existem duas fortes evidências da presença de uma nova espécie de hemoplasma em humanos ou da capacidade dos hemoplasmas de animais infectarem humanos: uma seqüência de 417 pb obtida através da PCR em um paciente com lupus eritematoso sistêmico apresentou 99% de homologia com *M. haemofelis* e *M. haemocanis* (KALLICK, 2004). Uma segunda seqüência contendo 178 pb depositada na base de dados do GenBank (numero de acesso: EU014880) também foi isolada do sangue de humanos. A segunda seqüência

no entanto é mais proximamente relacionada com *M. suis* e *M. wenyonii* (não publicado).

Várias são as evidências da presença de hemoplasmas em humanos, no entanto pode-se apenas especular se os organismos tratam-se das mesmas espécies em animais ou de novas espécies. Alguns trabalhos demonstram hemoplasmas considerados hospedeiros específicos infectando outras espécies (PITCHER & NICHOLAS, 2004) contribuindo com a hipótese de se tratar de uma zoonose. O aumento do número de pacientes humanos imunocomprometidos em contato com os animais e até mesmo causas como aquecimento global resultando no aumento da exposição dos vetores pode aumentar o risco da micoplasmose hemotrófica se tornar uma doença emergente. Porém estudos utilizando técnicas moleculares são necessários para a identificação definitiva destes agentes em humanos.

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos científicos. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um dos artigos, com sua formatação de acordo com as orientações das revistas científicas as quais foram submetidos. Os comprovantes de submissão ou aceite encontram-se em anexo.

4.1 ARTIGO 1

4.1.1 Design, Optimization and Application of a Conventional PCR Assay with an Internal Control for Detection of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ 16S rDNA in Domestic Cats from Brazil

Submetido para publicação na Veterinary Clinical Pathology (comprovante em ANEXO 1).

4.2 ARTIGO 2

4.2.1 Prevalence, Risk Factors and Hematological Findings of Haemoplasma Infection in Domestic Cats from Southern Brazil.

A ser submetido para publicação para Journal of Feline Medicine and Surgery.

4.3 ARTIGO 3

4.3.1 Haemoplasma Infection in an HIV-positive Patient in Brazil

Aceito para publicação na Emerging Infectious Diseases (aceite em ANEXO 2)

4.4 RESUMO 1

4.4.1 Detection of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’-like Organism in Dogs From Brazil

Publicado: SANTOS, A.P.; STEDILE, R.; OLIVEIRA, S.; HALIK, L.; GONZALEZ, F.; MESSICK, J. Detection of '*Candidatus* Mycoplasma turicensis'-like organism in dogs from Brazil. In: AMERICAN SOCIETY OF VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY, 2008, San Antonio, TX, USA. *Anais...*San Antonio: ACVP, 2008b. 1CD-ROM.

4.1 ARTIGO 1

4.1.1 Design, Optimization and Application of a Conventional PCR Assay with an Internal Control for Detection of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' 16S rDNA in Domestic Cats from Brazil

Running title: PCR for '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' Detection

Andrea P. Santos¹, Joanne B. Messick^{2*}, Alexander W. Biondo³, Simone T. de Oliveira¹, Viviane Pedralli¹, Camila S. Lasta¹, Luciana A. Lacerda¹, Vanessa S. Esteves¹, Regina Hofmann-Lehmann⁴, Barbara Willi⁴, Félix H. D. González¹.

¹Departamento de Patologia Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil¹. Department of Veterinary Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, Indiana, U.S.A.², Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil³, Clinical Laboratory, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Zurich, Switzerland⁴.

* Corresponding author: Mailing address: Department of Veterinary Pathobiology, Purdue University, 625 Harrison St, West Lafayette, IN 47907. Phone: +1 (765) 496-1748. Fax: +1 (765) 496-1748. Email: jmessic@purdue.edu

4.1.2 ABSTRACT

BACKGROUND: ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (CMtc) is a hemotrophic bacterial species that can, either alone or in combination, induce anemia in cats. The diagnostic test of choice for hemoplasma infections is the polymerase chain reaction (PCR). Conventional PCR assays have been developed for the detection of *M. haemofelis* and ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (CMhm) but not for CMtc. Although real-time PCR assays have been reported for all of the feline hemoplasmas, the overall expense of purchasing real-time PCR instrumentation precludes its use in Brazil and many other countries. **OBJECTIVES:** The goals of this study were: 1) to develop and optimize a conventional PCR-assay to detect CMtc; 2) to include an internal control in the assay to detect false negative results; and 3) to evaluate the occurrence of CMtc infection in domestic cats from Brazil. **MATERIAL AND METHODS:** Species-specific primers were designed and the PCR-assay was optimized in the presence or absence of an internal control. Sensitivity was determined by serial 10-fold dilutions of plasmid and DNA extracted from experimentally infected cat blood sample. EDTA-blood samples from 373 cats were collected. DNA was extracted using silica-based protocol and tested using the PCR-assay developed. **RESULTS:** Two samples negative for the internal control were excluded. Of the remaining 371 samples (117 healthy and 254 unhealthy cats) 17 (4.6%) were positive for CMtc. **CONCLUSIONS:** These results demonstrate the utility of this assay to detect CMtc in cat blood samples. This is the first report of CMtc infection in domestic cats in Brazil.

Key words: Haemobartonellosis, Mycoplasma, hemoplasma, PCR, 28S rRNA gene.

4.1.3 INTRODUCTION

Mycoplasma haemofelis (formerly known as *Haemobartonella felis* – Ohio organism or large form) and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (formerly known as *Haemobartonella felis* – California organism or small form) are hemotrophic bacterial species that parasitize feline red blood cells and can induce anemia^{1,2}. Acute infection with *M. haemofelis* is associated with severe hemolytic anemia. Cats that are naturally infected with ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ occasionally develop anemia, particularly when there is a concurrent disease³. However, healthy cats experimentally infected with CMhm developed only minimal clinical signs⁴. A new species of hemotropic mycoplasma, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (CMtc), was recently described as a potential cause of disease in cats. A naturally infected cat exhibited severe hemolytic anemia and the IV inoculation of the organism in an immunocompromised specific-pathogen free (SPF) cat also resulted in anemia⁵. The phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of CMtc showed that it is close related to *Mycoplasma coccoides* and *Mycoplasma haemomuris*, both rodent hemotropic mycoplasmal species⁶. Since its first description, CMtc infection has been reported in domestic cats in the United States⁷, Switzerland^{8,9}, Japan¹⁰, Germany¹¹, United Kingdom, Australia and South Africa⁶ and in wild felid species from Spain, France, Switzerland, Tasmania and Brazil¹². A paucity of information exists about the epidemiology of CMtc.

None of the hemoplasmas have been cultivated outside their natural hosts¹³. Historically, the diagnosis of infection has relayed on microscopic identification of bacteria attached to the red blood cells. This method is neither

sensitive nor specific. It is well recognized that artifact such as stain precipitated on red blood cells may be mistaken for parasites and that parasites rapidly detach from the host cell in EDTA collected blood^{4, 14}. The low parasite load in CMtc infection is not easily detected by light microscopy further reducing the sensitivity of this method for its diagnosis⁹. Thus, polymerase chain reaction (PCR)- based assays are the diagnostic method of choice for hemoplasma infections. The 16S rRNA gene is the basis for all hemoplasma PCR assays to date with different primers pairs and protocols reported for the three species infecting cats. Conventional PCR assays have been developed for the detection of *Mhf*^{14, 15, 16} and *CMhm*⁴, but not for *CMtc*. Real-time PCR assays also have been developed to detect and quantify each of feline hemoplasma species^{9, 17, 18}. Using the feline 28S rRNA gene as an internal control, a duplex real-time assay was recently reported for each of the hemoplasmas¹⁹. The inclusion of an internal control provides the confirmation of the presence of amplifiable DNA and/or absence of inhibitors in the sample^{20, 21}. The overall expense of purchasing real-time PCR instrumentation precludes its use in Brazil and many other countries. Therefore, the aim of this research was to develop and apply a conventional PCR assay for the diagnosis of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' infection that can be used alone or as a duplex-PCR with the feline-specific 28S rRNA gene as an endogenous control. A step-wise approach for PCR primer design and reaction optimization will be presented. In addition, 373 feline blood samples (117 healthy, 254 unhealthy cats and 2 excluded samples) from southern Brazil were tested using this protocol. To our knowledge, this is the first report of *CMtc* infection in domestic cats in Brazil.

4.1.4 MATERIAL AND METHODS

Primer design and selection. The nucleotide sequences for the 16S rRNA gene of *CMtc* (DQ157153), *Mhf* (U95297), *CMhm* (AM745338), *Mycoplasma coccoides* (AY171918), *Mycoplasma haemomuris* (U82963), *Bartonella henselae* (Z11684), *Bartonella clarridgeiae* (AB292603), *Bartonella koehlerae* (AF076237) and *Bartonella quintana* (AY84592) were downloaded from the GenBank database²² and aligned using DNASTAR Lansergene™ 7.1 (DNASTAR, Inc., Madison, WI) and CRUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)²³. Potential target sites for forward primers were manually identified; those having a length of 18-24 bp, GC content of 35%-60%, and melting temperatures between 55 - 58°C were further investigated²⁴. Two forward primers were selected that had a minimal degree of polypurine or polypyrimidine stretches or stretches composed of the same base; these primers were designated Mt1Fw and Mt2Fw, Suitable reverse primers and PCR products were selected using the Primer3 program (<http://primer3.sourceforge.net/>)²⁵. Based on the desired product size (400-500bp), melting temperatures, minimal pair complementary and minimal pair 3' complementary (to avoid primer-dimer or hairpin formation), two reverse primers were selected: the primers were designated Mt1Rv and Mt2Rv. To verify the proprieties of each primer, PCR suitability tests were done using the SMS - Sequence Manipulation Suite (<http://bioinformatics.org/sms2/index.html>)²⁶. The primers, Tm, predicted product lengths and genome positions are shown in table 1.

The specificities of the prospective primers were tested by the program Blastn²⁷ against all existing DNA sequence information stored in GenBank. The selected oligonucleotide primers were synthesized commercially by IDT[®] (Integrated DNA Technologies Coralville, IA).

Controls. Previously described plasmid containing almost the entire CMtc 16S rRNA gene (plasmid control) and the DNA extracted from 200 μ L of EDTA blood of a specific pathogen-free (SFC) cat experimentally infected with CMtc (genomic DNA control) were used as DNA templates. Both controls were previously tested by a quantitative real-time PCR⁵ and shown to have 10^5 and 1,103.18 (plasmid and genomic DNA controls respectively) copies of the organism per 5 μ L of reaction. The concentration and purity of the CMtc controls were also evaluated by UV spectrophotometry using the Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE); concentration of nucleic acids were calculated from the reading at 260nm, whereas the ratio between the reading at 260 nm and 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) and a continuous scan of UV absorbance from 220 to 320 nm provided an estimate of sample purity. Negative controls included DNA extracted from a non-infected cat and autoclaved ultra-filtered water.

Conventional PCR for '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'. Each PCR mixture consisted of 1X Green GoTaq[®] Flexi Buffer, (pH 8.5), 1.5 mM MgCl₂, deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) at a concentration of 200 μ M, group-specific primers at a concentration of 0.4 μ M, 1.25 U of GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI), template DNA (5 μ l), and autoclaved ultra-filtered water to a total volume of 25 μ L per reaction. The PCR, carried out in an Eppendorf[®] Mastercycler[®] gradient thermocycler (Eppendorf

Scientific, Inc., Westbury, NY), consisted of one cycle of 95°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 45 s, and 72°C for 45 s; and finally one cycle of 72°C for 5 min. The amplification products were subjected to gel electrophoresis in 1.5% agarose for one hour at 80 V, followed by ethidium bromide (1 µg/mL) staining and visualized under UV light. The gels were subsequently photographed using Epi Chemi II Darkroom[®] (UVP, inc., Upland, CA). A 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to compare product sizes.

Determination of the limit of detection. The lower limit of detection was defined as the smallest number of organisms in a sample that could be detected by our PCR²⁸. This was determined by 10-fold serial dilutions of the plasmid and genomic DNA controls.

Optimization. In addition to the selection of primers, three experiments were performed in order to optimize the PCR protocol: (i) Amount of primers - a concentration range of 0.08 µM to 0.6 µM for each primer was tested²⁹. (ii) Annealing temperature (Ta) - an annealing temperature gradient experiment was performed using the Eppendorf[®] Mastercycler[®] gradient thermocycler which was set at 45.3°C to 65.6°C (approximately 2°C built up across the thermoblock) based on the calculated primer annealing temperature of 55°C (estimated using the oligo - PCR T_a^{OPT} Calculator program - <http://webu.co.uk/oligo/index.php>); and (iii) Concentration of MgCl₂ - concentrations from 0.5 - 4.0 mM of MgCl₂ were tested to evaluate the yield of PCR products and fidelity of the PCR assay^{29, 30}. For all three experiments the most diluted, positive samples of the plasmid and genomic DNA templates were used as well as non-diluted samples.

Validation of primer specificity. Primer specificity was defined as the ability of a primer to amplify specifically ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. The specificities of the primers were tested against *Mhf*, *CMhm* and *Bartonella henselae* (type I, II and Huston I strains). The *B. henselae* positive controls were kindly provided by Dr Lynn Guptill at Purdue University. In order to confirm the identity of the PCR products, the purified PCR amplicons (PureLink™PCR Purification Kit - Invitrogen, Carlsbad, CA) were cloned into the pGEM®-T EasyVector (Promega, Madison, WI). To minimize the possibility of sequencing errors attributable to misincorporations by the GoTaq® Flexi DNA Polymerase, each strand of the insert was submitted for sequencing from three different clones. Plasmid DNA was purified with a QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, Valencia, CA). The sequence authenticity of the cloned amplicons was verified by dideoxy DNA sequencing (Purdue Genomics Core Facility at Purdue University, West Lafayette, IN, USA) followed by alignment with their corresponding sequences in GenBank.

Internal control using 28S rRNA gene. Except for the primers, a singleplex PCR using the same conditions, as that for the *CMtc* PCR assay were first applied to amplify the feline 28S rRNA gene. The primers used (feline 28S rDNA Fw 5’-AGC AGG AGG TGT TGG AAG AG-3’ and feline 28S rDNA Rv 5’- AGG GAG AGC CTA AAT CAA AGG – 3’) were previously described by Helps and collaborators³¹. Although the feline 28S rDNA has been used in real-time PCR assays^{19, 32}, we evaluated 371 feline samples from Brazil for 28S rDNA (DNA extracted from blood) and compared the results with the housekeeping gene target glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)³³ to validate its use in conventional the PCR assay.

The GAPDH protocol consisted of 1X Green GoTaq[®] Flexi Buffer, (pH 8.5), 1.5 mM MgCl₂, deoxynucleoside triphosphates at a concentration of 200 μM, group-specific primers at a concentration of 0.2 μM, 1.25 U of GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase, template DNA (5 μl), and autoclaved ultra-filtered water to a total volume of 25 μL per reaction. The thermocycler conditions consisted of one cycle of 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 45 s; and finally one cycle of 72°C for 5 min.

Duplex-PCR for CMtc and feline 28S rRNA gene. Using the same conditions as the singleplex CMtc protocol, a duplex-PCR was evaluated by adding the feline 28S rDNA primers to the protocol. In order to avoid the competition for reagents and loss of target sensitivity, a primer balance experiment was performed starting with equimolar amounts of the CMtc and 28S rDNA primers (0.4 μM each) and adjusting the concentration of the internal primer in the duplex assay²⁴. Also a 10-fold serial dilution using control materials was performed to check the sensitivity of the assay.

PCR assay in naturally infected cats. The PCR-assay developed in this study was evaluated by testing 373 cats for CMtc. Blood samples were obtained from pet owned cats in the local community, cats presenting to the Veterinary Hospital at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, and feral cats housed in a local shelter. Based on physical examination by a veterinarian and/or evaluation of hematology and chemistry profiles, these cats were divided into 2 groups. Group 1 consisted of 118 blood samples from healthy cats (68 pet owned, 40 hospital population; and 10 feral cats). The physical examination was unremarkable in these cats and there were no significant abnormal findings on the hematology and

chemistry panels. Group 2 consisted of 255 blood samples from cats that were unhealthy (22 pet owned, 223 hospital population; and 10 feral cats) as determined by significant abnormal physical and/or laboratory findings. DNA was extracted from whole EDTA-blood using a silica-based protocol³⁴ and stored at -20°C until PCR testing was performed. The amplification products of the positive samples for CMtc were purified from the agarose gel using the Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA), cloned into the pGEM[®]-T EasyVector and sequenced. To assess the possibility of co-infection in these cats, previously described PCR assays for the detection of *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ were also performed^{4, 14}.

Statistical evaluation. A descriptive analysis of the variable (positive/negative for CMtc infection) collected from each group was performed. The chi-squared test or Fisher's exact test was used for univariate analysis. Associations were considered statistically significant when P value was < 0.05. Data were compiled using Epi-Info 6.04 version and analyzed in SPSS 11.5 version program.

4.1.5 RESULTS

Primer choice and specificities. PCR products having the predicted sizes were obtained for CMtc 16S rRNA gene from plasmid and genomic DNA controls for all the combinations of primers (Mt1Fw-Mt1Rv, Mt1Fw-Mt2Rv, Mt2Fw-Mt1Rv and Mt2Fw-Mt2Rv) (Figure 1). However, the two sets containing the Mt2Fw primer gave rise to primer-dimer and/or hairpin formation as seen faintly on the gel and as predicted by the SMS software. A

strong band of amplified product was observed for plasmid control using the primer set, Mt2Fw-Mt2Rv, however the product yield was low or absent for the genomic DNA control. Thus, the Mt2Fw primer was excluded from further evaluation. Comparing the remaining sets of primers (Mt1Fw-Mt1Rv and Mt1Fw-Mt2Rv), non-specific bands were observed with the set Mt1Fw-Mt1Rv when tested against the genomic DNA extracted from some Brazilian cats, a finding not observed in the genomic DNA control (data not shown). The observed absence of non-specific amplification and lack of dimmers contributed to the selection of primer set Mt1Fw-Mt2Rv, for development of our conventional PCR assay. Further, when used together, Mt1Fw and Mt2Rv, based on database searches, would specifically amplify the 16S rDNA of CMtc and when tested with *Mhf*, *CMhm*, and *Bartonella* spp. positive controls, no amplified products were seen (data not shown). Thus, the primer set, Mt1Fw-Mt2Rv, was shown to be specific for amplification of the 16S rDNA of CMtc from genomic DNA and plasmid controls.

Limit of detection. The amplification of CMtc plasmid and genomic DNA controls were efficient out to 10^6 (0.02 copies/ μL) and 10^4 (22 copies/mL) dilutions of the starting template, respectively. The initial concentration of the CMtc plasmid control DNA evaluated by UV spectrophotometry was 19.51 ng/ μL , having an $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ratio of 1.76 and scan (UV absorbance from 220 to 320 nm) consistent with pure DNA.

When evaluating the genomic DNA control, the concentration was 17.04 ng/ μL , however the low $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ratio of 1.25 and UV scan indicated protein, solvent, or buffer contamination of the sample (data not shown).

Optimization. The amount of primers was tested using the range of 0.08 μM to 0.6 μM for each primer. Primer concentrations from 0.25 μM to 0.6 μM were shown to amplify both plasmid and genomic DNA control templates. However, when small amount of primers were used ($< 0.2 \mu\text{M}$) weak bands were observed. No evidence of primer accumulation were observed in the experiment even in the highest concentration of 0.6 μM . Based on this results a 0.4 μM concentration of primers was used in subsequent experiments (data not shown).

The annealing gradient experiment was performed at temperatures between 45.3°C and 65.6°C. At annealing temperatures between 45.3°C and 61.0°C, PCR product was amplified from the genomic DNA control diluted to 10^2 (Figure 2) and plasmid control diluted to 10^6 (data not shown). The relative intensities of specific PCR products amplified from the diluted genomic DNA control began to decline when the annealing temperature was $>58.5^\circ\text{C}$ (lanes 8 and 9). At temperatures higher than 63.1°C no PCR products were found in the 1.5% ethidium bromide agarose gel.

PCR products in a single band (specific amplification) were found for Ta at 53.0°C - 61.0°C. At or below annealing temperatures of 63.1°C amplification of products were found, however a pattern of non-specific product amplification appeared at or below annealing temperatures of 50.4°C. While a conclusive reason for this non-specific amplification product was not been determined, these results were reproducible. Thus, using Mt1Fw and Mt2Rv, the optimum Ta for the PCR was 53°C to 55.8°C.

The magnesium chloride experiment was designed keeping all the reagents in the PCR protocol constant (primer concentration of 0.4 mM and Ta of 55°C as

established above) and the dNTPs at standard concentrations of 200 μM each²⁴. In the presence of 200 μM each dNTP, a magnesium chloride titration series in 0.5 mM increments over the 0.5 mM-4 mM range was performed to locate the magnesium ion concentration producing the highest yield of a specific PCR product. Figure 3 shows that when using 0.5 mM of MgCl_2 , diminished band intensity was obtained (lane 2) compared to the band intensities seen in lanes 3 to 8; a non-specific product amplification appeared at MgCl_2 concentration of 4.0 mM (lane 9). Thus, we used a standard MgCl_2 concentration of 1.5 mM for the CMtc PCR protocol.

Duplex-PCR. Except for the inclusion of the feline 28S rDNA primers, the same conditions as previously described for the singleplex CMtc protocol were used. The concentration of primers used for amplifying the 16SrDNA of CMtc were maintained at 0.4 μM , while the concentration of the feline 28S rDNA primers was incrementally decreased to 0.06 μM . At a concentration of primers at 0.4 μM for the CMtc and 0.08 μM for the feline 28S rDNA, distinct bands with the predicted size for both CMtc (488 bp) and the feline 28S rDNA (100 bp) were obtained. In addition, no non-specific bands nor primer-dimer formation were observed. As with the singleplex PCR, genomic DNA of the positive control could be detected out to a 10^4 dilution of starting template in the duplex assay. Amplicons of both the 16S rRNA and feline 28S rRNA genes were still detected at this dilution (figure 4).

PCR assay in naturally infected cats. The PCR assay developed in this study was performed on extracted DNA from 373 EDTA-blood samples of cats. Two samples were negative for the feline 28S rRNA gene target and excluded to the study. Of the remaining 371 samples, 17 (4.6%) were positive for CMtc, 5 of

the 17 were co-infected with CMhm and 2 with CMhm and *Mhf*. Considering the group assignment, 4 (3.41%) of the CMtc positive cats were in the group 1 (healthy) and 13 (5.11%) in the group 2 (unhealthy). However, the unhealthy cats were not statistically more likely to have a CMt infection ($p < 0.05$).

The fragments of 488 bp purified from the agarose gel from 15 of the positive samples were cloned, sequenced, analyzed and compared to the known sequences at the GenBank database. An insufficient amount of extracted DNA from the 2 samples precluded their sequencing. Eleven of the sequences were identical to each other and also showed 100% homology with 9 of 22 CMtc sequences in the GenBank database. Our sequence was called isolate Porto Alegre 1 and submitted to the GenBank database assigned accession number EU580598. Two of the sequences had a total of 10 nucleotides, which were not in common with the ten previously mentioned sequences but were 100% homologous with 3 sequences in the database (DQ464425; DQ464424; DQ464423). These sequences were called isolate Porto Alegre 2, submitted to the GenBank assigned accession number EU580599. The sequencing for 1 of the other 2 clones failed. The remaining sequence matched with CMtc, however it was not 100% homologous to either Porto Alegre 1 or 2.

4.1.6 DISCUSSION

In the present study, an internally controlled conventional PCR assay that targets the 16S rRNA gene for diagnosis of CMtc infection in cats was designed, optimized and its use in clinical samples were evaluate. Although real-time PCR-based fluorescence assays have advantages over conventional PCR, the former requires specialized instrumentation that is not readily

available in Brazil and other countries. Identification of the specific hemoplasma species is important to our understanding of the epidemiology and clinical presentation of infection in cats. While *Mhf* has been reported to cause severe hemolytic anemia in immunocompetent cats, *CMhm* infection is associated with minimal clinical signs^{4, 35}. *CMtc*, a newly recognized hemoplasma, may have a lower hemolytic capacity than *Mhf*, but the anemia may be worsened in cats that are immunocompromised or have a co-infection. Other than a single case report, the presence and clinical importance of *CMtc* infection of cats in Brazil has not been investigated to date. This is the first report of a conventional PCR for *CMtc* and occurrence of infection in domestic cats in Brazil.

Primer design is critical to the yield and fidelity of PCR. Although the nucleotide sequence in some regions of 16S rDNA is highly conserved, other regions are sufficiently divergent and can be used as targets for designing primers that will provide species specific amplification. In this study, three freely available web-based programs, Primer 3, Sequence Manipulation Suite, and Blastn were used to aid in the selection of primers for specific amplification of *CMtc*. Although the two forward primers, Mt1Fw and Mt2Fw, were manually identified in aligned sequences, suitable reverse primers, Mt1Rv and Mt2Rv, for the PCR were selected using the Primer 3 program. Properties of these primers, including melting temperature, percent GC content, and PCR suitability were verified using Sequence Manipulation Suite: PCR Primer Stats. A trial version of a commercially available program was used for multiple sequence alignments, however free software such as ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) can be

downloaded on a local computer to perform this function. Finally, Blastn was run to ascertain that the primer sequences were unique within the template sample to be amplified.

Using a temperature gradient the PCR reaction was evaluated. At low genomic DNA template concentrations, nonspecific amplification was observed when annealing temperature were below 53°C. It is likely that these non-specific products are due to amplification of cat genomic DNA since it was not observed using plasmid control.

In the presence of higher amount of DNA template the appearance of these bands and perhaps even more non-specific secondary products would be anticipated at low annealing temperatures. This experiment was not performed due to the limited amounts of template DNA (genomic DNA control). The gradient experiment also showed that the Mt1Fw-Mt2Rv primers gave specific product amplification (488 bp) for annealing temperatures of 53°C - 63°C. However, the band intensities began to decrease at annealing temperatures greater than 58.5°C. An optimum annealing temperature (T_a^{OPT}) was calculated based on thermodynamic parameters and base composition³⁶ using the oligo – PCR T_a^{OPT} Calculator Program. The T_a^{OPT} for the CMtc protocol was 55.22°C and for the feline 28S rDNA protocol was 54.83°C. On the basis of the combined experimental and calculation results, it was determined that an annealing temperature of 55°C should be used for our PCR assays.

DNA polymerase activity requires an optimal concentration of free Mg^{2+} . Since Mg^{2+} is bound by dNTPs and nucleotide template, the CMtc PCR with low and high amounts of template was optimized by gradually increasing $MgCl_2$ from 0.5 to 4 mM while keeping the concentration of dNTPs at 200 μ M

each²⁹. It was not surprising that non-specific amplification products appeared at high concentrations of MgCl₂, whereas lower concentrations improved the specificity of the PCR³⁰. Magnesium ion concentrations in this experiment producing the highest yield of a specific PCR product were located between 1.0 mM to 3.5 mM. Thus, based on these results and convention, we decided to use the concentration of 1.5 mM for the reaction.

Both the singleplex and duplex PCR-assays were used to test for CMtc DNA in cat-blood samples from Southern Brazil. In order to evaluate the duplex assay, all samples that were positive in the singleplex PCR and 52 negative samples were tested. The remainder of the samples that were negative by singleplex PCR was not tested because of limited sample volume. Nonetheless, the same results were observed when comparing the single and duplex assays for all these samples.

The prevalence of CMtc infection depends on the population of cats that are included in the study group. The cat populations sampled in the study herein consisted of healthy and sick cats from a hospital population, pet-owned cats, and cats in a public shelter. In this study group, a total of 17 cats (4.6%) tested positive by PCR for CMtc. This occurrence of CMtc infection was somewhat higher than that reported by authors sampling a similar, mixed population of healthy and sick cats in Switzerland (1%)⁸, Germany (2.25%)¹¹ and United Kingdom (2.3%)⁶. The high seasonal prevalence of potential vectors in Porto Alegre, a subtropical location, might in part be an explanation for these results. However, the occurrence of CMtc infection in unhealthy cats was lower in this study (5.11%) than that reported by others using a population of cats suspect to be infected and/or sick cats presented to a veterinary hospital: 6.5% in United

States⁷ and 26% in South Africa⁶. The majority of the cats sampled (139/147) in a study done in Australia were sick; the occurrence of 10% in this population was also greater than what we report herein⁶.

Nonetheless, we can conclude that CMtc infection is present in the Brazilian domestic cat population per se, however unhealthy cats were not more likely to be infected.

Two different CMtc strains, Porto Alegre 1 (EU580598) and Porto Alegre 2 (EU580599) were identified in this study and submitted to the GenBank database. Eleven of the 448 bp fragments from the 16S rDNA sequenced in this study were identical to each other and homologous to 9 of 22 sequences found in Genbank, including the sequence of an experimentally infected cat from Switzerland used as our positive control. This was the most common isolate found in our study and corresponded to the major cluster previously described by Willi and collaborators⁶. Two sequences (Porto Alegre 2 - EU580599) were completely identical to each other but exhibited 10 nucleotide differences when compared to Porto Alegre 1. It has recently been shown by 16S rDNA sequence analysis that some Australian (DQ464425; DQ464423) and South African (DQ464424) CMtc isolates branched away from the remaining isolates at the GenBank⁶. The isolate Porto Alegre 2 showed 100% homology with these divergent sequences suggesting that at least two strains of CMtc exist.

In summary, the conventional PCR assay described herein is a reliable tool for diagnosis of CMtc infection in cats. Detection sensitivity of the conventional PCR developed is similar to that previously demonstrated by real-time PCR-assay⁵. When duplexed in the same tube with an internal control, the assay

provides a sensitive, specific, and rapid method that can be easily implemented in diagnostic and research laboratories. This is especially important in countries where the expense of real-time PCR instrumentation precludes its use. In Brazil, the infection of domestic cats with *CMtc* was common. Our laboratory is currently using the assay to investigate the prevalence, clinical importance and risk factors of *CMtc* and the other hemoplasma infection of cats in Brazil.

4.1.7 REFERENCES

1. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis,' 'Candidatus Mycoplasma haemomuris,' 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii'. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51:891-899.
2. Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet Clin Pathol. 2004;33:2-13.
3. De Lorimier LP, Messick JB. Anemia associated with 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a feline leukemia virus-positive cat with lymphoma. J Am Anim. 2004;40(5):423-427.
4. Foley JE, Harrus S, Poland A, Chomel B, Pedersen NC. Molecular, clinical and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. Am J Vet Res. 1998;59:1581-1588.
5. Willi B, Boretti FS, Cattori V et al. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. J Clin Microbiol. 2005;43(6):2581-2585.
6. Willi B, Tasker S, Boretti FS et al. Phylogenetic analysis of "Candidatus Mycoplasma turicensis" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. J Clin Microbiol. 2006;44(12):4430-4435.

7. Sykes JE, Terry JC, Lindsay LL, Owens SD. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 2008;1:232(3):372-379.
8. Willi B, Boretti FS, Baumgartner C et al. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):961-969.
9. Willi B, Boretti FS, Baumgartner C et al. Feline hemoplasmas in Switzerland: identification of a novel species, diagnosis, prevalence, and clinical importance. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2006;148(3):139-144.
10. Fujihara M, Watanabe M, Yamada T, Harasawa R. Occurrence of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' infection in domestic cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 2007;69(10):1061-1063.
11. Just F, Pfister K. Frequency of haemoplasma infections of the domestic cat in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2007;120(5-6):197-201.
12. Willi B, Filoni C, Catao-Dias JL et al. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45:1159–1166.
13. Harvey JW. Hemotropic mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: Greene C. E. ed. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd ed. Saint Louis, MO: Elsevier Inc, Elsevier Inc; 2006;252-260.
14. Berent LM, Messick JB, Cooper SK. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections,

- using a polymerase chain reaction assay. *Am j Vet Res.* 1998;59:1215-1220.
15. Messick JB, Berent LM, Cooper SK. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by Restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1998;36:462-466.
 16. Jensen WA, Lappin MR, Kamkar S, Reagan WJ. Use of a Polymerase Chain Reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am J Vet Res.* 2001;62(4):604-608.
 17. Tasker S, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' DNA. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):439-441
 18. Sykes JE, Drazenovich NL, Ball LM, Leutenegger CM. Use of Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction to Determine the Epidemiology of Hemoplasma Infections in Anemic and Nonanemic Cats. *J Vet Intern Med.* 2007;21:685–693.
 19. Peters IR, Helps CR, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Tasker S. The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Vet Microbiol.* 2008;1:126(1-3):142-50.
 20. Morata PM, Queipo-Ortuno I, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2443–

- 2446.
21. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001;39:485–493.
 22. Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 1998;26:1-7.
 23. Thompson JD, Plewniak F, Poch O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(13):2682-9260.
 24. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques.* 1997;23(3):504-511.
 25. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Totowa, NJ: Humana Press; 2000: 365-386.
 26. Stothard P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques.* 2000;28:1102-1104.
 27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-410.
 28. Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11): 2674–2678.

29. White BA. Polymerase Chain Reaction (PCR): Design and Optimization of Reactions. Encyclopedia of Life Science. USA. doi: 10.1038/npg.els.0005340. 2005.
30. Blanchard MM, Tailon-Miller P, Nowotny P, Nowotny V. PCR buffer optimization with a uniform temperature regimen to facilitate automation. PCR Methods Applic. 1993;2:234-240.
31. Helps CR, Lait P, Damhuis A et al. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydomphila felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. Vet Rec. 2005;21:156(21):669-673.
32. Helps C, Reeves N, Egan K, Howard P, Harbour D. Detection of *Chlamydomphila felis* and feline herpesvirus by multiplex real-time PCR analysis. J Clin Microbiol. 2003;41(6):2734-2736.
33. Birkenheuer AJ, Levy MG., Breitschwerdt EB. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol. 2003;41(9):4172-4177.
34. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J Clin Microbiol. 1990;28(3): 495-503.
35. Tasker S, Binns SH, Day MJ 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. Vet Rec. 2003;152:193-198.
36. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads R. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucleic Acids Res.

1990;11:18(21):6409-6412. Erratum in: Nucleic Acids Res.
1991;11:19(3):698.

4.1.8 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support for this study and for Dr Andrea Santos's personal research fellowship, Dr Ana Paula Ravazollo and Dr Cláudio W. Canal at Universidade Federal do Rio Grande do Sul and the Department of Comparative Pathobiology, School of Veterinary Medicine at Purdue University, USA for mentoring and laboratory support.

Table 1.

Set of primers for CMtc amplification used in this study.

	Name	Sequence 5' implies 3'	Size	Tm	Genome position ^a	product length
1	Mt1 Fw	GTATCCTCCATCAGACAGAA	20 bp	50,8	203 - 644	442 bp
	Mt1 Rv	AGTATTCGGCACAACAACACT	20 bp	52,3		
2	Mt2 Fw	AACTGTCCAAAAGGCAGTTA	20 bp	50,2	102 - 690	587 bp
	Mt2 Rv	CGCTCCATATTTAATTCCAA	20 bp	48,0		
3	Mt1 Fw	GTATCCTCCATCAGACAGAA	20 bp	50,8	203 - 690	488 bp
	Mt2 Rv	CGCTCCATATTTAATTCCAA	20 bp	48,0		
4	Mt2 Fw	AACTGTCCAAAAGGCAGTTA	20 bp	50,2	102 - 644	543 bp
	Mt1 Rv	AGTATTCGGCACAACAACACT	20 bp	52,3		

^a Genome position according to CMtc 16S rDNA sequence (Accession #:

DQ157153)

Figure 1.

PCR products using 4 different sets of primers to amplify CMtc. Lane 1, 100 bp DNA ladder. Lanes 2 and 3, plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt1Fw and Mt1Rv (expected product size of 442 bp). Lanes 4 and 5, plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt1Fw and Mt2Rv (expected product size of 488 bp). Lanes 6 and 7, plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt2Fw and Mt1Rv (expected product size of 543 bp). Lanes 8 and 9, plasmid and genomic DNA controls, respectively using primer set, Mt2Fw and Mt2Rv (expected product size of 587 bp). Lanes 10 and 11 negative controls using water as template.

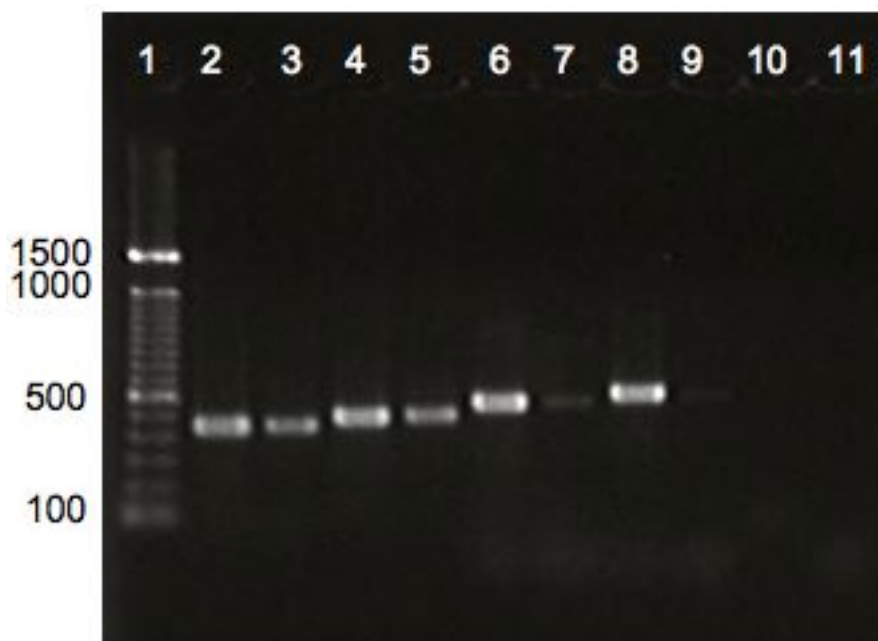


Figure 2.

Annealing gradient experiment. Singleplex PCR assay for *CMtc* using Mt1Fw and Mt2Rv primers in 1.5% ethidium bromide stained agarose gel. Lane 1, 100 bp DNA ladder. Lanes 2 to 12, respective annealing temperatures 45.3°C, 46.4°C, 48.2°C, 50.4°C, 53.0°C, 55.8°C, 58.5°C, 61.0°C, 63.1°C, 64.7°C and 65.6°C.

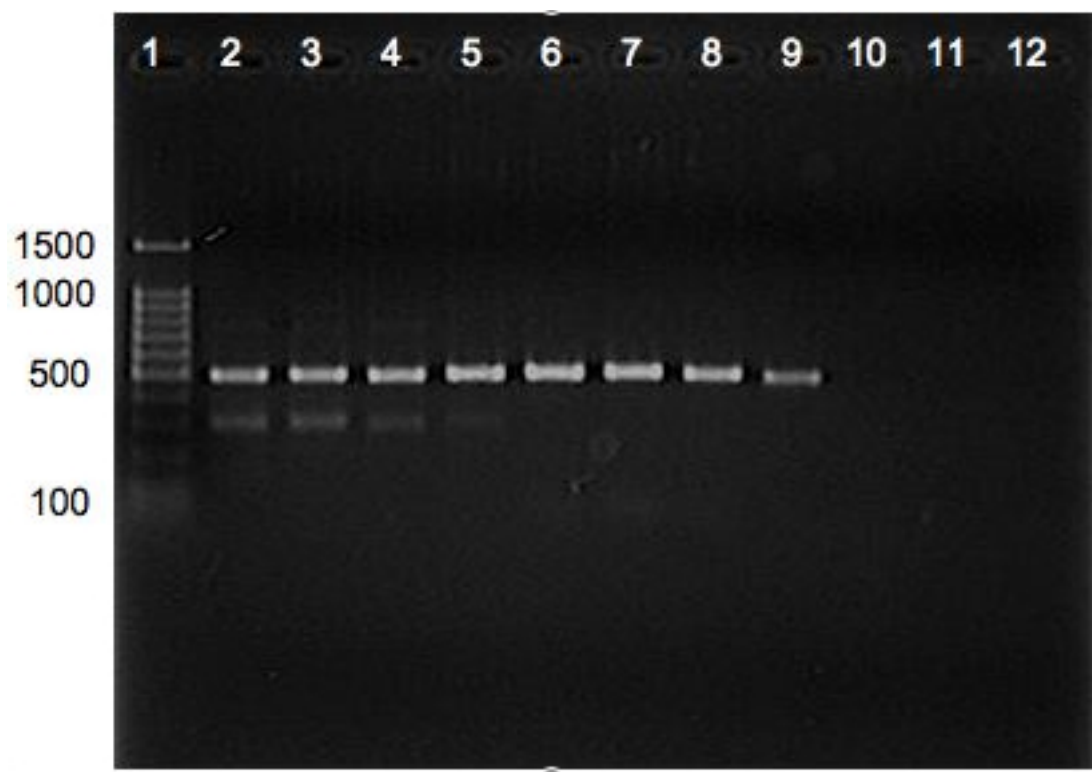


Figure 3.

MgCl₂ experiment in 1.5% ethidium bromide stained agarose gel using Mt1Fw and Mt2Rv primers and genomic DNA diluted to 10² templates. Lane 1, 100 bp DNA ladder. Lanes 2 to 9, respective MgCl₂ concentrations of 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM and 4.0 mM. Lane 10, negative control (1.5 mM MgCl₂ concentration using water as template).

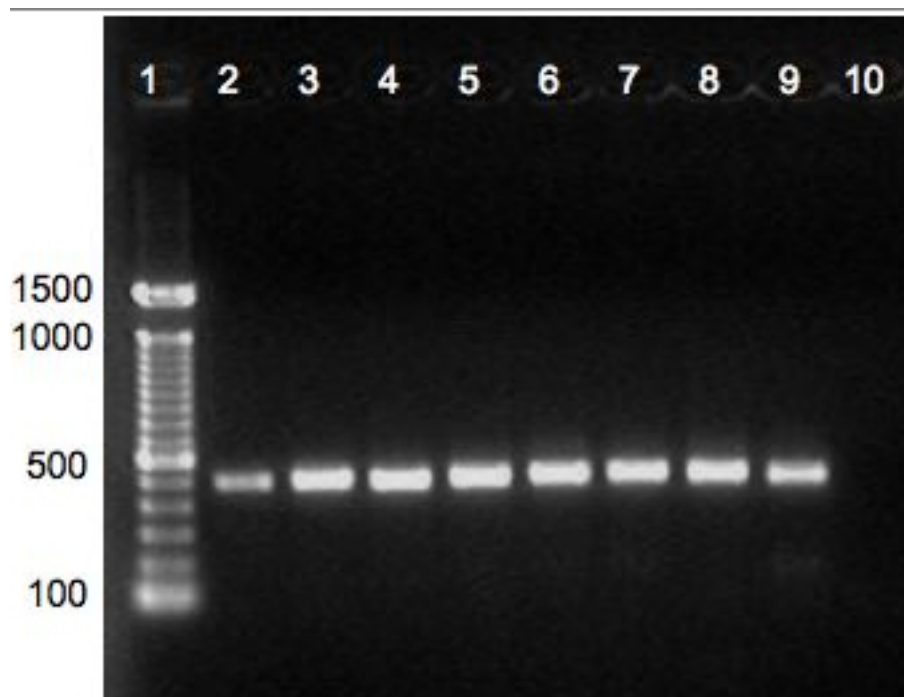
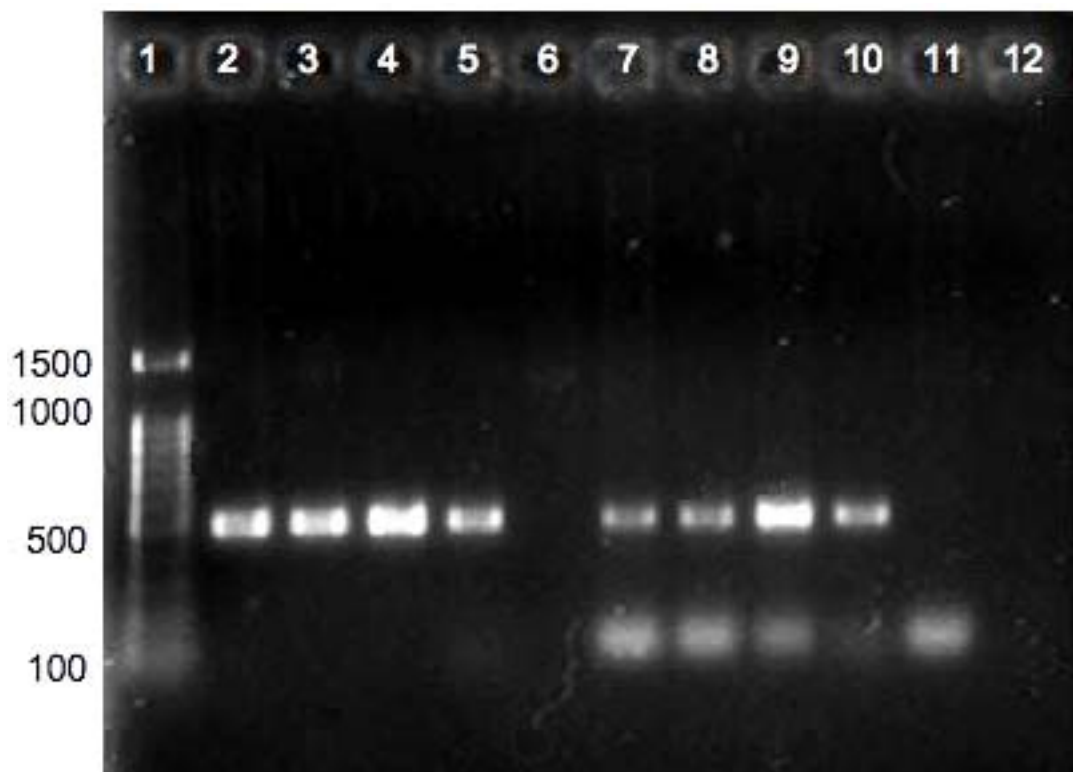


Figure 4.

Comparison between the singleplex PCR assay for *CMtc* and duplex-assay for *CMtc* and feline 28S rDNA in different dilutions. Lane 1, 100 bp DNA ladder. For the singleplex PCR, lane 2, genomic DNA control sample extracted from blood; lane 3 to 5 genomic DNA control in respective dilutions 10^2 , 10^3 and 10^4 ; lane 6, genomic DNA from non-infected cat; and lanes 7 to 12 are the same samples as described for lanes 2 through 6, however the duplex-PCR assay was used.



4.2 ARTIGO 2

4.2.1 Prevalence, Risk Factors and Hematological Findings of Haemoplasma Infection in Domestic Cats from Southern Brazil.

Prevalence, Risk Factors and Hematological Findings of Haemoplasma Infection in Domestic Cats from Southern Brazil.

Running title: Haemoplasmas in cats from Southern Brazil

Andrea P. Santos, DMV^{1,2*}, Joanne B. Messick, VMD, PhD, Dip ACVCP², Alexander W. Biondo, DMV, PhD³, Simone T. de Oliveira, DMV¹, Annete L. Litster, BVSc, PhD, FACVSc (Feline Medicine), MMedSci (Clinical Epidemiology)⁴, Viviane Pedralli¹, Camila S. Lasta, DMV¹, Luciana A. Lacerda, DMV¹, Vanessa S. Esteves, DMV¹, Félix H. D. González, DMV, PhD¹.

Departamento de Patologia Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil¹. Department of Veterinary Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, Indiana, U.S.A.², Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil and University of Illinois, Urbana, Illinois, USA³. Department of Veterinary Clinical Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana, U.S.A.⁴

*Corresponding author: Mailing address: Department of Veterinary Pathobiology, Purdue University, 625 Harrison St, West Lafayette, IN 47907. Phone: +1 (765) 494-2628. Fax: +1 (765) 494-9830. Email: santos1@purdue.edu

4.2.2 ABSTRACT

Three haemoplasmas are recognized in domestic cats: *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’. We report herein the prevalence of haemoplasma infections in domestic cats in southern Brazil. DNA extracted from 373 cat blood samples was tested by conventional PCR-assays for each of the feline haemoplasmas and the risk factors were evaluated. Two samples negative for the feline 28S rRNA gene used as a DNA extraction control were excluded. Of the remaining 371 cat samples, 79 (21.3%) were PCR-positive for at least one species of haemoplasma. The most prevalent species was ‘*Candidatus M. haemominutum*’ with 50 out of 371 (13.48%) positive cats, ‘*Candidatus M. turicensis*’ and *M. haemofelis* DNA were found in 10/371 (2.69%) and 8/371 (2.16%) of the cats respectively. Coinfection with *M. haemofelis*-‘*Candidatus M. haemominutum*’ was found in 4/371 (1.08%) with ‘*Candidatus M. haemominutum*’-‘*Candidatus M. turicensis*’ in 5/371 (1.35%) and infection with all 3 haemoplasmas in 2/371 (0.54%). Male cats, younger age and outdoor access were risk factors for haemoplasma infection, whereas breed, presence of fleas and/or ticks and coinfection of haemoplasmas with FIV and/or FeLV were not. Although anemia was a risk factor for *M. haemofelis* and ‘*Candidatus M. haemominutum*’, it was not for ‘*Candidatus M. turicensis*’. This study documents for the first time the prevalence and risk factors for haemoplasma infections in domestic cats from Brazil.

Key words: Haemotrophic *Mycoplasma*, haemoplasma, PCR, 28S rRNA gene.

4.2.3 INTRODUCTION

Haemotrophic mycoplasmas (haemoplasmas) are obligate red cell parasites that infect a wide range of vertebrate animals and have not been grown successfully in culture. These organisms were recently transferred from the order Rickettsiales to the family Mycoplasmataceae within the genus *Mycoplasma* based on 16S rRNA gene sequences (Neimark et al 2001, Neimark et al 2002). Haemoplasmas are pleomorphic and may be rod-shaped; spherical, or ring-shaped and found individually or in chains across the red cell surface. These parasites may induce anemia in an infected host (Messick 2004). Three haemoplasmas are recognized in domestic and wild cats: *Mycoplasma haemofelis* (formerly known as *Haemobartonella felis* – Ohio organism or large form), ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (formerly known as *Haemobartonella felis* – California organism or small form), and the recently described species, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (Willi et al 2005). Acute infection with *M. haemofelis* is associated with severe hemolytic anemia. However, healthy cats experimentally infected with ‘*Candidatus M. haemominutum*’ developed only minimal clinical signs (De Lorimier & Messick 2004). Cats that are naturally infected with ‘*Candidatus M. haemominutum*’ occasionally develop anemia, particularly when a concurrent disease is present (Foley et al 1998). The new species, ‘*Candidatus M. turicensis*’, might be a potential cause of anemia in cats. A naturally ‘*Candidatus M. turicensis*’-infected cat exhibited severe hemolytic anemia and the IV inoculation of the organism in an immunocompromised specific-pathogen free (SPF) cat also resulted in anemia (Willi et al 2005).

Since none of the hemoplasmas have been cultivated outside their natural hosts (Harvey 2006), the diagnosis of infection has relayed on microscopic identification of bacteria attached to the red blood cells. This method is neither sensitive nor specific. Thus, polymerase chain reaction (PCR)-based assays are the diagnostic method of choice for hemoplasma infections. Thus, conventional and real-time PCR assays for each of the three feline haemoplasmas have been developed (Foley et al 1998, Berent et al 1998, Messick et al 1988, Jensen et al 2001, Tasker et al 2003, Willi et al 2006a, Fujihara et al 2007, Sykes et al 2007, Peters et al 2008).

M. haemofelis, 'Candidatus *M. haemominutum*', and 'Candidatus *M. turicensis*' infections in domestic cats have been diagnosed on every continent except Antarctica (Jensen et al 2001, Criado-Fornelio et al 2003, Tasker et al 2003, Watanabe et al 2003, Tasker et al 2004, Willi et al 2006a, Willi et al 2006b, Fujihara et al 2007, Just and Pfister 2007, Sykes et al 2008, Santos et al 2008). However there are no prevalence and risk factors studies of the three hemoplasmas in domestic cats in South America.

Therefore, the aim of this study was to apply PCR-based assays for the detection of hemoplasma infections in domestic cats from southern Brazil and to evaluate its prevalence, risk factors and hematological findings. To our knowledge, this is the first report of the prevalence of hemoplasmas infection in domestic cats in Brazil.

4.2.4 MATERIAL AND METHODS

Samples. A total of 373 domestic cats were evaluated. Blood samples were obtained from pet owned cats in the local community, cats presenting to the

Veterinary Hospital at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, and feral cats housed in a local shelter. Based on physical examination by a veterinarian and/or evaluation of hematology and chemistry profiles, these cats were divided into 2 groups. Group 1 consisted of 118 blood samples from healthy cats (68 pet owned, 40 hospital population; and 10 feral cats). The physical examination was unremarkable in these cats and there were no significant abnormal findings on the hematology and chemistry panels. Group 2 consisted of 255 blood samples from cats that were unhealthy (22 pet owned, 223 hospital population; and 10 feral cats) as determined by significant abnormal physical and/or laboratory findings. DNA was extracted from whole EDTA-blood using a silica-based protocol (Boom et al, 1990) and stored at -20°C until PCR testing was performed.

For the pet owned cats, a CBC count and biochemistry evaluation (Creatinine, Urea, Alanine amino transferase, gamma glutamyl transferase and Alkaline phosphatase) was performed before the DNA extraction. For the hospital population of cats, an epidemiologic questionnaire was given to the clinicians at the veterinary hospital and data was also collected from the cat's medical records when the questionnaire was not applied. Since antimicrobial therapy can result in falsely negative result by PCR (Berent et al 1998), we intend to exclude these samples: the failure to find the information about antimicrobial therapy in the medical files was used as criteria to include the cats on the study. In addition, the clinicians were instructed to not treat the cats before the blood collection, however we can not be certain that all the cats were not in

antimicrobial treatment. For the feral cats, samples were collected and a clinical evaluation and CBC was performed previous the DNA extraction.

PCR for the detection of the haemoplasmas. Previously described PCR assays for the detection of *M. haemofelis* and ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (Berent et al, 1998; Foley et al, 1998), and a conventional PCR for the detection of ‘*Candidatus M. turicensis*’ developed in our laboratory (Santos et al, 2008) were performed. Positive controls included DNA extracted from blood of naturally infected cats with *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ and ‘*Candidatus M. turicensis*’. Negative controls included DNA extracted from a non-infected cat and autoclaved ultra-filtered water. The amplification products were subjected to gel electrophoresis in 1.5% agarose for one hour at 80 V, followed by ethidium bromide (1 µg/mL) staining and visualized under UV light. The gels were subsequently photographed using Epi Chemi II Darkroom[®] (UVP Inc., Upland, CA, USA). A 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to compare product sizes.

In order to confirm the identity of the positive controls, the nearly entire sequences of the 16S rRNA gene was obtained from positive clinical samples using specific primers designed in our laboratory for *M. haemofelis* (DEAMHF F1 5’ – ATG CAA GTC GAA CGG ATC TT - 3’ and DEAMHF R2 5’ TCC AAT CAG AAT GTT CAC TC - 3’); ‘*Candidatus M. turicensis*’ (DEAMTC F1 5’ - CTG TCC AAA AGG CAG TTA GC 3’ and DEAMTC R1 5’ TGC CCC TTC CTC TCA TAG TTT 3’) and the forward primer for ‘*Candidatus M. haemominutum*’ DEAMHM F1 (5’ - ATG CAA GTC GAA CGA AGA GG – 3’) in combination with the primer CALI R2 designed by Foley and

collaborators (1998). The reactions consisted in a PCR mixture of 1X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 2.0 mM MgCl₂, deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) at a concentration of 200 μM, primers at a concentration of 0.4 μM, 1.25 U of GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase, template DNA (5 μl), and autoclaved ultra-filtered water to a total volume of 25 μL per reaction. The PCR, carried out in an Eppendorf[®] Mastercycler[®] gradient thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA), consisted of one cycle of 95°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 53°C for 45 s, and 72°C for 1:30 min; and finally one cycle of 72°C for 5 min. The purified PCR amplicons (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit - Zymo Research, Orange, CA, USA) were cloned into the pGEM[®]-T EasyVector (Promega, Madison, WI, USA). Plasmids were purified with a QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and submitted for sequencing at Purdue Genomics Core Facility at Purdue University, West Lafayette, IN, USA). The sequences were submitted to the GenBank database (Benson et al, 1998) under the accession numbers EU930823, FJ004275, EU861063 to *M. haemofelis*, '*Candidatus M. haemominutum*' and '*Candidatus M. turicensis*' respectively.

PCR-assay for the feline 28S rRNA gene. A singleplex PCR assay was applied to amplify the feline 28S rRNA gene (Santos et al, 2008) in order to verify the presence of amplifiable DNA in all the samples.

Statistical evaluation.

Reference ranges for hematological parameters were obtained using a control group of 107 clinically normal cats using two times the value of standard deviations above and below the mean. Prevalence was calculated by dividing

the number of occurrences of the infection during the specified time period by the size of the population in which the infection occurred. The 95% confidence intervals (CI) of the observed prevalences and statistical comparison of prevalences between studies were calculated. A descriptive analysis of all the variables collected from each group was performed. The chi-squared test or Fisher's exact test (when observations were equal or less than 5) was used for univariate analysis of selected variables. Data were compiled and analyzed in the SAS version 9.1 program. The variables included: anemia (n=262), gender (n=317), breed (n=203), outdoor access (n=99), presence of fleas and/or ticks (n=61). The difference between intact and neutered males (n=76) were also evaluated. The variable age (n=107) were evaluated dividing the cats in 3 groups: <5, 6 to 10 and > 11 age years old. FIV and FeLV co-infection with mycoplasmas were assessed. Sixty-four cats had been tested for FIV and FeLV: 11 were positive for FIV, 3 to FeLV and 6 were coinfecting with FIV and FeLV. Risk factors associated with hematological findings were evaluated using ANOVA one-way and Tukey's multiple comparison tests. Associations were considered statistically significant when *P* value was < 0.05. PCV values (n=363), hemoglobin concentration (n=359), RBC counts (n=359), total leukocyte count (n=358) and total plasma protein (n=357) were analyzed.

4.2.5 RESULTS

Polymerase chain reaction. Two of the cats of a total of 373 were negative for the housekeeping gene (feline 28S rRNA gene) and were excluded from this study.

PCR amplification products in the predicted sizes were obtained for *Mycoplasma haemofelis* (393 bp), 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' (192 bp) and 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' (488 bp) for 13/371, 60/371, and 17/371 of the remaining cat samples respectively. Four of the cats were coinfecting with *M. haemofelis* and 'Candidatus *M. haemominutum*', 5 with 'Candidatus *M. haemominutum*' and 'Candidatus *M. turicensis*', and 2 co-infected with the 3 species of hemoplasmas. All negative controls were PCR-negatives.

Group characteristics. The groups 1 (healthy) and 2 (unhealthy) characteristics are shown in tables 1 and 2. Unhealthy cats were significantly older and had more males than group 1; no significant differences were found considering breed and outdoor access between the groups. Group 2 showed significant low RBC count, hemoglobin concentration and PCV level, and high leukocytes count. Total plasma proteins were not significantly different between the groups.

The mean \pm standard deviations for hematological parameters in the clinically normal cats used as reference range were: erythrocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$) 8.41 ± 1.37 , PCV (%) 38.17 ± 5.67 , leukocytes ($/\mu\text{L}$) $12,719.29 \pm 4,359.64$, and total plasma proteins (g/L) 73.87 ± 7.44 .

Prevalence.

In total, 371 cats (excluding 2 samples PCR negative for the feline 28S rDNA gene) were evaluated; 79 (21.3%) were PCR-positive for at least one species of hemoplasmas. Figure 1 shows the prevalence of each species in the cat population from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Risk factors.

The haemoplasma infection status was not significantly different between healthy and unhealthy cats (table 3). However, cats with anemia were more likely to have a haemoplasma infection (P value = 0.0066). RBCs count, hemoglobin concentration and PCV values were lower in cats positives for *M. haemofelis* and ‘*Candidatus M. haemominutum*’ compared with non-infected cats (figure 2). Total leukocyte count, bands, neutrophils, basophils, eosinophils, monocytes, lymphocytes and total plasma proteins concentrations were not significant different considering the infection status. The infection status was associated with gender, age and outdoor access. Haemoplasma-infected cats were more likely to be male, and older than non-infected cats, and to have outdoor access. In addition, intact males were more likely to be infected than neutered males ($P= 0.0025$). Pedigree and presence of fleas and/or ticks ($P=0.6286$) were not significantly different between infected and non-infected cats. The variables age and outdoor access were not significantly different for ‘*Candidatus M. haemominutum*’ infection alone. Table 4 shows the risk factors and P values for haemoplasma and ‘*Candidatus M. haemominutum*’ infection in the cats in this study.

4.2.6 DISCUSSION

The prevalence of the three haemoplasma species infecting cats in South America is unknown. The present study revealed haemoplasma infection in 79 (21.3%) out of 371 domestic cats in southern Brazil. This result is in agreement with a study in the United Kingdom showing a prevalence of 19.25% ($P=0.5271$) and Germany, prevalence of 15.56% ($P=0.191$), using a similar population of healthy and unhealthy cats (Willi et al 2006b; Just and

Pfister 2007). Our results were also similar ($P=0.0764$) to a study in the United States (US) using anemic cats ($PCV<29\%$) presenting acute anemia and/or regenerative anemia and cats suspected to be infected by cytology to haemoplasma infections; the prevalence in this study was 27% (Sykes et al 2008). Although our prevalence was similar to this study the population tested was different. In another study in the US using anemic ($PCV<26$) and non-anemic cats the prevalence was lower (18%) than the one using suspected cats (Sykes et al 2007). Although, the prevalence of the two studies in the US were significantly different ($P=0.0092$), no significant difference was found when comparing the prevalence in both studies in the US with the study herein, independent of the population tested ($P>0.05$). The prevalence reported herein was higher ($P=0.0006$) than another study in the United Kingdom (14%) using blood samples submitted to a diagnostic laboratory (Peters et al 2007); and was also higher ($P<0.0001$) than the prevalence in Swiss cats (9.92%) when using a population of healthy and unhealthy cats (Willi et al 2006a). Geographical variations as the high seasonal prevalence of potential vectors in Porto Alegre, a subtropical location, might in part be an explanation for higher prevalence herein, as described in two different regions in Switzerland (Willi et al 2006a). On the other hand, the prevalence in our study was lower ($P<0.05$) than that reported for cats in Australia (32%), South Africa (52%) (Willi et al 2006b), and Japan (58%) (Fujihara et al 2007). Sykes et al (2007) reported a 99.5% specificity and 87% sensitivity correlation between conventional and real-time PCR, therefore it is unlikely that methodological differences are responsible for these disparate findings. A most likely explanation for the higher prevalence in these studies is that the cat populations are dissimilar; the samples in the study

in Japan were blood taken for diagnostic purposes in animal hospitals from different locations and the majority of Australian cats tested were ill (139/147). In South Africa, all of the cats evaluated were suspected to have haemoplasma infection based on blood smear evaluation.

The most prevalent species was '*Candidatus M. haemominutum*' (13.48%) in agreement with all the prevalence studies cited above. It implies that this is the most common specie of haemoplasma infecting cats in Brazil as well as many other countries. "*Candidatus M. turicensis*" alone was slightly higher than *M. haemofelis* (2.69% and 2.16% respectively).

The present study found that 1.08% of the cats were co-infected with *M. haemofelis* and '*Candidatus M. haemominutum*', 1.35% with '*Candidatus M. haemominutum*' and '*Candidatus M. turicensis*', and 0.54% with the 3 species of feline haemoplasmas. Concurrent infection with more than one haemoplasma has also been reported (Jensen et al 2001, Tasker et al 2003, Tasker et al 2004, Lobetti & Tasker 2006, Luria et al 2004, Willi et al 2006a, Willi et al 2006b, De Morais et al 2007). Associations between *M. haemofelis* - '*Candidatus M. haemominutum*' (Westfall et al 2001), '*Candidatus M. turicensis*' - *M. haemofelis* (Willi et al 2006b) and '*Candidatus M. turicensis*' - '*Candidatus M. haemominutum*' (Willi et al 2006a, Willi et al 2006b) have been reported. Coinfection with '*Candidatus M. haemominutum*' - *M. haemofelis* and '*Candidatus M. haemominutum*' - '*Candidatus M. turicensis*' was observed herein, whereas no co-infection with *M. haemofelis* and '*Candidatus M. turicensis*' was found.

There was no significant difference in haemoplasma prevalence between healthy and unhealthy cats even with the group of unhealthy cats having

significantly more males and older cats than the group of healthy cats. This finding is in line with a similar study in cats in Switzerland (Willi et al 2006a) and could imply that the pathogenic potential of the parasites is not related to the presence of concurrent diseases.

Several studies indicate that anemia is a risk factor for haemoplasma infection (Grindem et al 1990, Jensen et al 2001, Harrus et al 2002, Tasker et al 2003, Kenish et al 2004). The present study showed that anemic cats were more likely to be infected with haemoplasmas. This find is in line with several studies (Grindem et al 1990, Jensen et al 2001, Harrus et al 2002, Tasker et al 2003, Kenish et al 2004), however some studies did not found this association (Willi et al 2006a, Macieira et al 2007), whereas it can be explained by the presence of PCR-positive cats that are chronic carriers, with the red cell parameters in the reference ranges, in the sample population. Significant difference was observed when comparing the RBC count, hemoglobin concentration and PCV of the PCR-negative cats and cats infected with *M. haemofelis* and 'Candidatus *M. haemominutum*' (figure 2). The association between anemia and 'Candidatus *M. haemominutum*' infection was somewhat surprising since 'Candidatus *M. haemominutum*' is not associated with the development of anemia (Foley et al 1998, Westfall et al 2001, Sykes et al 2007); however, a recent study also reported a decrease in PCV values in cats infected only with 'Candidatus *M. haemominutum*' (Tasker et al 2006). According to these findings, we can hypothesize that it may be a different strain infecting cats in Brazil, differences in the host-parasite relationship caused by seasonal and/or geographic conditions, and/or that the cats in this study may be co-infected with another parasite not detected herein. There was

no association between anemia and '*Candidatus M. turicensis*' infection in this study in agreement with another study that naturally '*Candidatus M. turicensis*'-infected cats had no significant decrease PCV values compared with the PCR-negative cats for haemoplasmas (Willi et al 2006b). Whereas, '*Candidatus M. turicensis*' induced mild to marked anemia in two experimental infected cats (Willi et al 2005). Interestingly, cats coinfecting with more than one species of haemoplasmas did not show association with anemia; however, the low number of observations could have affected these results.

In the present study, risk factors for haemoplasma infection in cats were shown to be male gender, younger age and outdoor access in agreement with several epidemiologic studies (Grindem et al 1990, Luria et al 2004, Tasker et al 2003, Willi et al 2006a, Willi et al 2006b). Male cats were more likely to be infected with haemoplasmas. In addition, intact males were more likely to be infected with haemoplasmas than neutered males. A significant difference was observed between cats that have outdoor access and those living indoors. However, the presence of fleas and/or ticks was not identified as a risk factor for infection. The higher prevalence in intact male cats with outdoor access endorses the hypothesis of direct transmission between cats, since haemoplasma DNA was found in saliva and feces of cats, suggesting that aggressive interactions as fights may lead to transmission of the organism (Willi et al 2007b). In addition, Grindem and collaborators (1990) found an association between presence of abscesses caused by bites and haemoplasma infection.

The present study did not find significant difference between the haemoplasma infection in pedigree and non-pedigree cats. These findings contrast with other studies reporting that mixed breed or non-pedigree cats are more likely to have a haemoplasma infection (Hayes and Priester 1973, Tasker et al 2004). '*Candidatus M. haemominutum*' infection alone did not show significant difference between indoor cats and cats with outdoor access as well as no significant difference between ages. The infections with the other feline mycoplasmas alone and co-infections were not analyzed due to the low prevalence in the cat population of this study.

FIV and FeLV infections were assessed because it has been suggested that cats having a pre-existent retrovirus infection may be at a greater risk of haemoplasma infection (Grindem et al 1990, Lappin 1995, Harrus et al 2002, Inokuma et al 2004, Luria et al 2004). This was not confirmed in the present study; whereas, it can be due to the low prevalence of FIV and FeLV infection in the population tested herein, affecting the study results.

In conclusion, haemoplasma infection is common in domestic cats in Southern Brazil. '*Candidatus M. haemominutum*' infection shown to be the most prevalent and was associated with anemia. Younger age, male gender and outdoor exposure were associated with haemoplasma infection. This study is the first report of prevalence in domestic cats in Brazil.

4.2.7 REFERENCES

1. Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF (1998) GenBank. *Nucleic Acids Res.* 26:1-7.
2. Berent LM, Messick JB, Cooper SK (1998) Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *Am j Vet Res.* 59:1215-1220.
3. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-Van Dillen PME, Van Der Noordaa J (1990) Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol.* 28(3): 495-503.
4. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC (2003) Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, v. 93, p.301-317.
5. De Lorimier LP, Messick JB (2004) Anemia associated with '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in a feline leukemia virus-positive cat with lymphoma. *J Am Anim.* 40(5):423-427.
6. De Morais HA, Guimarães AM, Vidotto O, Baumann A, Biondo AW, Messick JB (2007) Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and

- '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in three cats from Brazil. *J Feline Med Surg.* 9(6):518-20.
7. Foley JE, Harrus S, Poland A, Chomel B, Pedersen NC (1998) Molecular, clinical and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J Vet Res.* 59:1581-1588.
 8. Fujihara M, Watanabe M, Yamada T, Harasawa R (2007) Occurrence of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' infection in domestic cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 69(10):1061-1063.
 9. Grindem CB, Corbett WT, Tomkins MT (1990) Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. *J Am Vet Med Assoc*, v. 196, p. 96-99.
 10. Hayes HM, Priester WA (1973) Feline infectious anaemia. Risk by age, sex and breed; prior disease; seasonal occurrence; mortality. *J. Small Anim. Pract.* 14:797-804.
 11. Harrus S, Klement E, Aroch I, Stein T, Bark H, Lavy E, Mazaki-Tovi M, Baneth G (2002) Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *Vet Rec*, v. 151, p. 82-85.

12. Harvey JW (2006) Hemotrophic mycoplasmosis (Hemobartonellosis), p. 252-260. *In*: Greene CE (ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd ed. Elsevier Inc, Saint Louis, MO.
13. Inokuma H, Taroura S, Okuda M, Hisasue M, Itamoto K, Une S, Nakaichi M, Taura Y (2004) Molecular Survey of *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma Haemominutum*' infection in cats in Yamaguchi and surrounding Areas. *J Vet Med Sci*, v. 66, n. 8, p. 1017-1020.
14. Jensen WA, Lappin MR, Kamkar S, Reagan WJ (2001) Use of a Polymerase Chain Reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am J Vet Res*. 62(4):604-608.
15. Just F, Pfister K (2007) Frequency of haemoplasma infections of the domestic cat in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 120(5-6):197-201.
16. Kewish KE, Appleyard GD, Myers SL, Kidney BA, Jackson ML (2004) *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. *Can Vet J*, v. 45, p. 749-752, 2004.

17. Lappin MR (1995) Opportunistic infections associated with retroviral infections in cats. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, v. 10, p. 244-250.
18. Lobetti RG, Tasker S. (2004) Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *Journal of the South African Veterinary Association*. 75, 94-99.
19. Luria BJ, Levy JK, Lappin MR, Breitschwerdt EB, Legendre AM, Hernandez JA, Gorman SP, Lee IT (2004) Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 6, p. 287-296.
20. Macieira DB, de Menezes Rde C, Damico CB, Almosny NR, McLane HL, Daggy JK, Messick JB (2008) Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 10, n. 2, p. 120-129.
21. Messick JB, Berent LM, Cooper SK (1998) Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by Restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 36:462-466.

22. Messick JB (2004) Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol.* 33:2-13.

23. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully G (2001) Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*,’ ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*,’ ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*.’ *Int J Syst Evol Microbiol.* 51:891-899.

24. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG (2002) Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 52, p. 683.

25. Peters I R, Helps CR, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Tasker S (2008) The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays. *Vet Microbiol.* 1:126(1-3):142-50.

26. Sykes JE, Drazenovich NL, Ball LM, Leutenegger CM (2007) Use of Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction to Determine the Epidemiology of Hemoplasma Infections in Anemic and Nonanemic Cats. *J Vet Intern Med.* 21:685–693.

27. Sykes JE, Terry JC, Lindsay LL, Owens SD (2008) Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc.* 1:232(3):372-379.
28. Tasker S, Binns SH, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Helps CR, Jensen WA, Olver CS, Lappin MR (2003) 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. *Vet Rec.* 152:193-198.
29. Tasker S, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, and Harbour DA (2003) Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' DNA. *J Clin Microbiol.* 41(1):439-441.
30. Tasker S, Braddock JA, Baral R, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Malik R (2004) Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *J Feline Med Surg.* 6(6):345-54.
31. Tasker S, Caney SM, Day MJ, Dean RS, Helps CR, Knowles TG, Lait PJ, Pinches MD, Gruffydd-Jones TJ. (2006) Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' infection. *Microbes Infect.* 8(3):653-61.

32. Watanabe M, Hisasue M, Hashizaki K, Furuichi M, Ogata M, Hisamatsu S, Ogi E, Hasegawa M, Tsuchiya R, Yamada T (2003) Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific polymerase chain reaction (SS-PCR). J Vet Med Sci, v. 65, p. 1111-1114.
33. Westfall DS, Jensen WA, Reagan WJ, Radecki SV, Lappin MR (2001) Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. Am J Vet Res, v. 62, n. 5, p.687-691.
34. Willi B, Boretti FS, Cattori V, Tasker S, Meli ML, Reusch C, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2005) Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. J Clin Microbiol. 43(6):2581-2585.
35. Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, Meli ML, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2006a). Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. J Clin Microbiol 44(3):961-969.

36. Willi B, Tasker S, Boretti FS, Doherr MG, Cattori V, Meli ML, Lobetti RG, Malik R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2006b) Phylogenetic analysis of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. *J Clin Microbiol.* 44(12):4430-4435.
37. Willi B, Filoni C, Catao-Dias JL, Cattori V, Meli ML, Vargas A, Martinez F, Roelke ME, Ryser-Degiorgis MP, Leutenegger CM, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2007a) Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *J. Clin. Microbiol.* 45:1159–1166.
38. Willi B, Boretti FS, Meli ML, Bernasconi MV, Casati S, Hegglin D, Puorger M, Neimark H, Cattori V, Wengi N, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2007b) Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Appl Environ Microbiol.* 73(12):3798-802.

4.2.8 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support for this study and for Dr Andrea Santos's research fellowship, Ching-Yun Chang and Ahmed Mohamed at Purdue University for statistical analysis support, Dr Ana Paula Ravazollo and Dr Cláudio W. Canal at Universidade Federal do Rio Grande do Sul and the Department of Comparative Pathobiology, School of Veterinary Medicine at Purdue University, USA for laboratory support.

Figure 1. Prevalence of the hemoplasma species in 371 domestic cats from southern Brazil. *Mhf* = *Mycoplasma haemofelis*, CMhm = ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’; CMtc = ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’.

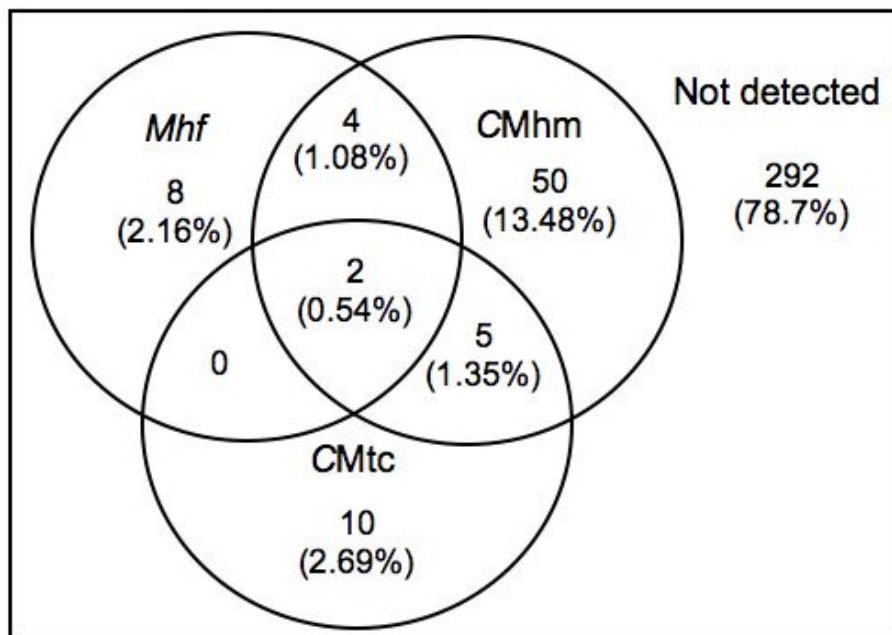


Figure 2. PCV values (Mean \pm SE) of cats grouped by haemoplasma infection status. *Mhf* = *Mycoplasma haemofelis*, *CMhm* = ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’; *CMtc* = ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, *Mhf-CMhm* = co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, *CMhm-CMtc* = co-infection with ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, *Mhf-CMhm-CMtc* = co-infection with the three haemoplasmas, Not detected = cats tested negative for all three haemoplasmas.

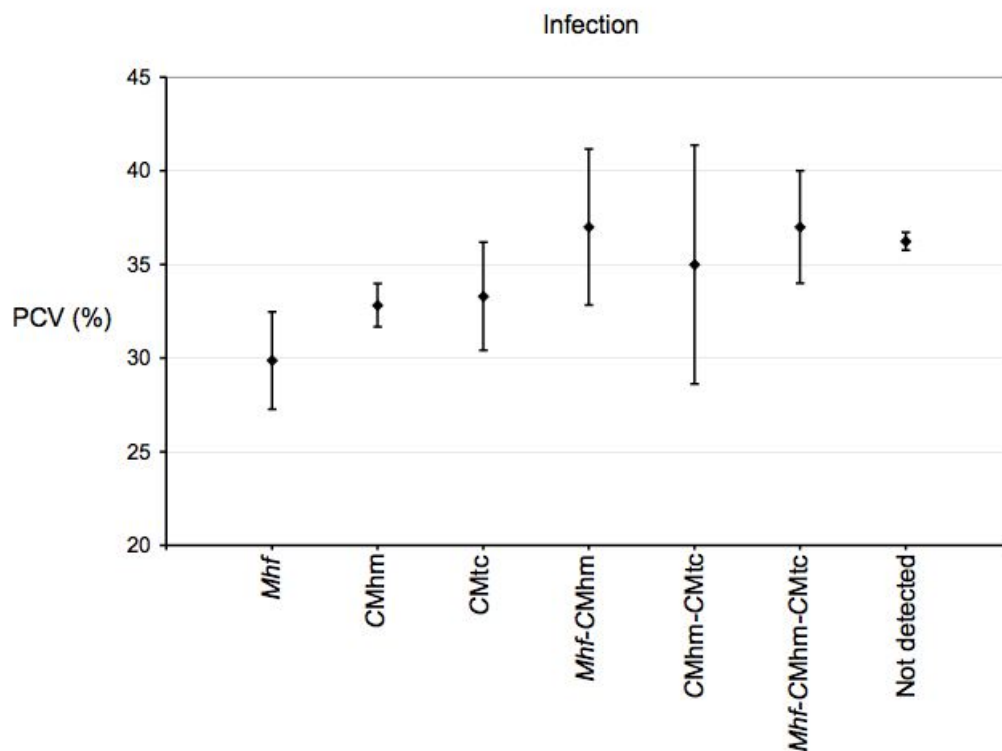


Table 1. Comparison of source, gender, breed, age and outdoor access of healthy and unhealthy cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Variable	Number of cats (%)		<i>P</i> value
	Healthy	Unhealthy	
Source (n=371)			
Pet owned	68 (58.1)	22 (8.7)	< 0.0001
Hospital	39 (33.4)	222 (87.4)	
Shelter	10 (8.5)	10 (3.9)	
Gender (n=317)			
Male	51 (45.5)	123 (60)	0.0134
Female	61 (54.5)	82 (40)	
Breed (n=203)			
Pedigree	15 (13.6)	16 (17.2)	0.4813
Nonpedigree	95 (86.4))	77 (82.8)	
Age (n=107)			
< 5 years	35 ()	38 (35.5)	0.0033
6 - 10 years	6 (5.6)	16 (14.9)	
> 11 years	0 (0)	12 (11.2)	
Outdoor access (n=99)			
No	23 (47.9)	33 (64.7)	0.0921
Yes	25 (52.1))	18 (35.3)	

Table 2. Blood parameters of healthy and unhealthy cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Variable	Healthy cats			Unhealthy cats			Reference range	P value
	No. of cats	Mean	95% CI	No. of cats	Mean	95% CI		
RBC [†] (10 ⁶ /μL)	114	8.42	8.16- 8.41	245	7.4	7.14- 7.67	5.66- 11.16	< 0.0001
Hb [‡] (mg/dL)	113	12.87	12.5- 13.24	246	11.43	11.06- 11.81	8.83- 16.91	< 0.0001
PCV [§] (%)	115	38.17	37.12- 39.22	248	34.315	33.2- 35.43	27-50	< 0.0001
Leukocytes (/μL)	114	12,719	11,910- 13,528	246	16,126	14668- 17584	4,000- 21,500	< 0.0001
TPP [¶] (g/L)	115	73.87	72.5- 75.25	242	73.4	71.97- 74.82	27-50	0.6339

[†]erythrocyte count

[‡]hemoglobin concentration

[§]packed cell volume

[¶]total plasma proteins

Table 3. Prevalence estimates and *P* values for hemoplasma infection by Polymerase Chain Reaction (PCR+) among healthy and unhealthy cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Feline hemoplasma	No. of cats PCR+ (%)		<i>P</i> value
	Healthy (n=117)	Unhealthy (n=254)	
Hemoplasmas [†]	23 (19.65)	56 (22.04)	0.6015
<i>Mhf</i>	2 (1.7)	6 (2.36)	1
CMhm	15 (12.82)	35 (13.7)	0.9203
CMtc	4 (3.41)	6 (2.36)	0.5146
<i>Mhf</i> /CMh [‡]	1 (0.85)	3 (1.18)	0.624
CMhm/CMtc [§]	1 (0.85)	4 (1.57)	1
<i>Mhf</i> /CMhm/CMtc [¶]	0 (0)	2 (0.78)	1

[†] positive for at least one hemoplasma DNA, double or triple infected counted only once.

[‡] co-infected with *M. haemofelis* and ‘*Candidatus M. haemominutum*’.

[§] co-infected with ‘*Candidatus M. haemominutum*’ and ‘*Candidatus M. turicensis*’.

[¶] co-infected with *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ and ‘*Candidatus M. turicensis*’.

Table 4. Risk factors and *P* values for the haemoplasma infection and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ infection alone in domestic cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Variable	Number of cats (%)		<i>P</i> value
	PCR-positive	PCR-negative	
Haemoplasmas[†]			
Gender (n=317)			
Male	53 (16.7)	121 (38.2)	0.0015
Female	21 (6.6)	122 (38.5)	
Breed (n=203)			
Pedigree	9 (4.5)	22 (10.8)	0.8625
Non-pedigree	56 (27.6)	116 (57.1)	
Age (n=107)			
< 5 years	24 (22.4)	49 (45.8)	0.018
6 - 10 years	14 (13.1)	8 (7.5)	
> 11 years	7 (6.5)	5 (4.7)	
Outdoor access (n=99)			
No	9 (9.1)	34 (34.3)	0.0245
Yes	25 (25.3)	31 (31.3)	
‘<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>’			
Gender (n=291)			
male	35 (12)	121 (41.6)	0.0055
female	13 (4.5)	122 (41.9)	
Breed (n=181)			
Pedigree	6 (3.3)	22 (12.2)	0.9203
Non-pedigree	37 (20.5)	116 (64)	
Age (n=103)			
< 5 years	35 (33.9)	49 (47.6)	0.1755
6 - 10 years	6 (5.8)	8 (7.8)	
> 11 years	0 (0)	5 (4.9)	
Outdoor access (n=86)			
No	6 (7)	34 (39.6)	0.1003
Yes	15 (17.4)	31 (36)	

[†]positive for at least one hemoplasma DNA, double or triple infected counted only once.

4.3 ARTIGO 3

4.3.1 Haemoplasma Infection in an HIV-positive Patient in Brazil

Running title: Haemoplasma in HIV-positive Patient

Andrea Pires dos Santos, DVM^{1*}, Rodrigo Pires dos Santos, MD^{2*}, Alexander Welker Biondo, DVM, PhD³, José Miguel Dora, MD², Luciano Zubaran Goldani, MD, PhD², Simone Tostes de Oliveira, DVM¹, Ana Márcia de Sá Guimarães, DVM⁴, Jorge Timenetsky, PhD⁴, Helio Autran de Moraes, DVM, PhD⁵, Félix Hilário Díaz González, DVM, PhD¹, Joanne Belle Messick, VMD, PhD^{6†}.

¹Departamento de Patologia Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, ²Section of Infectious Diseases, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil, ³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil and University of Illinois, Urbana, Illinois, USA, ⁴Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵Department of Medical Sciences, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA, ⁶Department of Veterinary Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.

*These authors contributed equally to this article.

4.3.2 ABSTRACT

Haemotrophic mycoplasmas have been shown to infect a wide variety of mammals. Although the infection in humans is rarely reported, an association with an immunocompromised state has been suggested. We document the first case of a *Mycoplasma haemofelis*-like infection in an HIV-positive patient co-infected with *Bartonella henselae*.

Key words: AIDS, *Bartonella*, *Haemobartonella*, HIV, *Mycoplasma*.

Article Summary Line

We describe a haemotrophic mycoplasma infection in an HIV-positive patient.

4.3.3 THE STUDY

A 34-year-old HIV-positive male patient sought medical attention in September 2006 with a 30 day history of night sweats, loss of appetite, productive cough, muscle pain, and cervical, axillary and inguinal lymphadenomegaly. Pulmonary, cardiovascular and abdominal examinations were unremarkable. The abnormal lymphnodes were about 2 cm in diameter, firm, and non-tender. The patient owned 5 cats and at presentation had signs of multiple cat scratches and bites on his hands and arms. He was diagnosed with HIV five years previously. At admission, his CD4 cell count was 286 cells/mm³ (reference range 500-1,500 cells/mm³), and the viral load was 38,100 copies/mL. The patient denied using drug and alcohol.

Additional laboratory findings included anemia (PCV 29 %; reference range 38-50 %, hemoglobin 9.8 mg/dL; reference range 13-18 mg/dL, and erythrocyte count $3.38 \times 10^6/\mu\text{L}$; reference range $4.4\text{-}5.6 \times 10^6/\mu\text{L}$), leukopenia (leukocytes 3,300 cells/ μL ; reference range 4,300-10,000 cells/ μL), thrombocytopenia (platelet count 108,000 cells/ μL ; reference range 150,000-450,000 cells/ μL). There was increased activity of aspartate aminotransferase (66 U/L; reference range 15-40 U/L), alanine aminotransferase (79 U/L; reference range 10-40 U/L), and lactic dehydrogenase (657 U/L; reference range 240-480 U/L). Urea and creatinine concentrations were within reference range. Blood cultures yield no bacterial growth and sputum cultures were negative for acid-fast bacilli (AFB), bacteria and fungi. The patient also tested negative for hepatitis B and C, human T lymphotropic virus type 1 (HTLV1), syphilis, chlamydia, and cryptococcus infection. Bone marrow and lymph node

biopsies and culture were negative for the presence of mycobacterial or fungal infection .

Abdominal computerized tomography (CT) revealed hepatomegaly, splenomegaly and hypoechoic lesions on the spleen. There were no lesions compatible with infective endocarditis on transesophageal echocardiography. An inguinal node biopsy revealed granuloma with necrosis suggesting cat scratch disease, and no signs of AFB or fungi. Many bacilli suggestive of *Bartonella* spp. were observed with Warthin-Starry stain and antibodies against *Bartonella henselae* (1:256) were detected in the patient's serum. Treatment was begun with doxycycline and the symptoms subsequently subsided. He was discharged on antiretroviral therapy and oral doxycycline.

In June 2007, the patient returned to the hospital because of fever, malaise, weight loss and lymphadenomegaly. He had a past history of rheumatic fever and severe mitral stenosis. Echocardiography revealed mitral vegetations and multiple hepatic hypoechoic lesions were found on abdominal CT. Lymph node biopsy revealed multiple tiny bacilli on Warthin-Starry stain. The patient had prematurely discontinued antiretroviral and antibiotic treatment, which may have predisposed to the endocarditis and peliosis hepatic found at presentation. Therapy was again started with doxycycline and gentamicin for *Bartonella* spp. infection. The patient's symptoms improved and an echocardiogram 17 days later showed resolution of the mitral vegetations. He was discharged with antiretroviral therapy and continued on oral doxycycline for *Bartonella* spp. infection. Ten months after this discharge the patient returned for a follow-up visit while taking the recommended therapy. He had no clinical signs and his laboratory findings were improved (PCV 37.5 %,

hemoglobin 12.5 mg/dL, erythrocyte count $3.77 \times 10^6/\mu\text{L}$, leukocytes 4,330 cells/ μL , platelet count 133,000 cells/ μL , aspartate aminotransferase 19 U/L, and alanine aminotransferase 24 U/L).

During the first hospitalization (2006), EDTA-blood was collected from the patient and two aliquots of DNA were extracted (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. The patient's DNA was tested by PCR for *Bartonella* spp. infection (1) and additional PCR protocols for the feline haemoplasmas including *Mycoplasma haemofelis* (2), '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (3) and '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (unpublished data) were performed. These bacteria commonly infect cats and thus the possibility of infection in this patient was investigated.

The positive controls for *M. haemofelis* included DNA extracted from naturally (Genbank accession number: EU930823) and experimentally infected cats (2). Three positive controls for *B. henselae* (Type 1, Type 2 and Houston strain) were kindly provided by Dr. Lynn Guptill at Purdue University. Negative controls included ultra pure water and DNA extracted from blood from a healthy person and a non-infected cat. For all the reactions the negative controls were PCR-negatives.

Amplicons of the expected size were obtained in the *Bartonella* sp. and *M. haemofelis* reactions. The PCR product of 393 bp for the *M. haemofelis* result (figure 1) was purified from gel (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research, Orange, CA), cloned (pGEM[®]-T EasyVector Promega, Madison, WI) and sequenced (Purdue Genomics Core Facility at Purdue University, West Lafayette, IN, USA). The fragment was 100% homologous with the *M.*

haemofelis 16S rDNA gene sequences in the GenBank database. To assess the nearly complete sequence of the 16S rRNA gene, we designed species-specific primers based on the *M. haemofelis* sequence (forward primer, 5' – ATG CAA GTC GAA CGG ATC TT – 3' and reverse primer, 5' – TCC AAT CAG AAT GTT CAC TC – 3'). The PCR product amplified from the patient's blood was purified and sequenced. A 1214 bp sequence (isolate Mh.1-BR) was submitted to GenBank database (accession number: EU888930); it was 99% homologous with the *M. haemofelis*.

The possibility that the patient's cats might be involved in zoonotic transmission was also investigated. Two weeks after the patient's first blood collection, EDTA-blood was collected from the 5 cats, and DNA was extracted at the Veterinary Hospital of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Two of the cats were positive by PCR for *M. haemofelis* and all 5 cats were positive for *Bartonella* sp. The cats were not tested for other infectious agents.

The patient's DNA was extracted in a different location than the cats; neither of these locations were the site for amplification of the haemoplasmas. The PCR-assays for the haemoplasmas were performed in duplicate at two different laboratories using split-aliquots (Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, Brazil and Purdue University, West Lafayette, IN). The PCR results were reproducible.

During the patient's second hospitalization, EDTA-blood was again collected and DNA extracted. The same PCR tests were applied and the patient was positive for *Bartonella* sp., but negative for haemoplasmas.

4.3.4 CONCLUSIONS

We report herein the first case of *Mycoplasma haemofelis*-like infection in an HIV-positive patient with disseminated *Bartonella henselae* infection.

Haemoplasma are a group of bacteria that primarily infect animals. These organisms target red blood cells and were recently been reclassified within the genus *Mycoplasma*. Like most other mycoplasmas, haemoplasma are small epicyellular parasites that lack a cell wall and are susceptible to tetracyclines. Diseases caused by haemoplasma in animals range from acute hemolytic anemia to subtle chronic anemia, and may even be asymptomatic. The organisms may also contribute to the progression of retroviral, neoplastic, and development immune-mediated diseases in cats (4).

It is generally thought that most species of *Mycoplasma* are host specific, however there are occasional reports of infection in an animal species not perceived as the primary host. These infections may have a pathological impact particularly when predisposing conditions are present such as immunodeficiency (5). Reports of infections in humans with haemoplasmas are rare; it has been suggested that such infections may be seen in immunocompromised patients and patients following splenectomy (6-8). Whether or not these authors have identified a putative haemoplasma or another red cell parasite is unclear. Nonetheless, microorganisms with an ultrastructure similar to that of haemoplasmas were previously identified in AIDS patients (6). This organism has not been molecularly characterized.

Haemoplasma infections may occur more frequently than is generally recognized given that these organisms fail to grow in culture and only a few laboratories are equipped to detect and identify haemoplasmas (5). Disease

associations with latent mycoplasma infections in both immunocompromised and non-immunocompromised patients are now emerging. The growing numbers of human patients with compromised immune systems living in close association with cats raises the possibility that haemoplasma infections may also emerge in this population.

There are no molecular studies documenting haemoplasma infection in humans to date. However, a haemotrophic mycoplasma infection was previously reported in a patient with systemic lupus erythematosus (SLE). The 417 bp sequence detected in this patient also showed 99% sequence homology with *M. haemofelis* (9). Sequence data from another haemotrophic mycoplasma infection in an anemic human patient were reported in GenBank. However, the sequence of 178 bp of the 16S rRNA gene (accession number: EU014880) was more closely related to *M. suis* and *M. wenyonii* (96–100 %) and only 75% homologous to *M. haemofelis* (unpublished).

Epidemiologic studies have linked cat bites and scratches as well as flea-infested cats with transmission of *B. henselae* to humans (10). Both *B. henselae* and *B. quintana* are recognized as causative agents of bacillary angiomatosis (BA), bacillary peliosis and cat scratch disease (CSD) in humans. Peliosis hepatis and lymph node angiomatosis, as seen in this patient, have been associated with *B. henselae* infection (11). *Mycoplasma haemofelis* DNA also has been detected in cat fleas (*Ctenocephalides felis*), and *C. felis* may be involved in the transmission of *M. haemofelis* among cats (12). Additional studies have documented the experimental transmission via administration of infected blood IV, IP, and orally. Haemoplasma DNA is present in saliva and feces of cats, suggesting that aggressive interactions among cats involving

biting may lead to transmission of the organism (13). To our knowledge, using PCR there is only one other report that cats can be coinfectd with *M. haemofelis* and *B. henselae* (14).

As with other *Mycoplasma* species, haemoplasma might act as a cofactor in HIV infection, contributing to the acceleration of the course of the disease (15). Further studies are needed to establish the role and prevalence of haemoplasma infection in AIDS patients, as well as the zoonotic potential of *M. haemofelis*.

4.3.5 ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support for this study and for granting Dr Andrea Santos a research fellowship; to the Department of Comparative Pathobiology, School of Veterinary Medicine at Purdue University, USA for laboratory support.

4.3.6 BIOGRAPHICAL SKETCHES

Dr Andrea Santos is a PhD student at the Veterinary School at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and a visiting scholar at Purdue University, West Lafayette, IN, USA. Her research interests include infectious diseases and hemoparasites, particularly the haemoplasma.

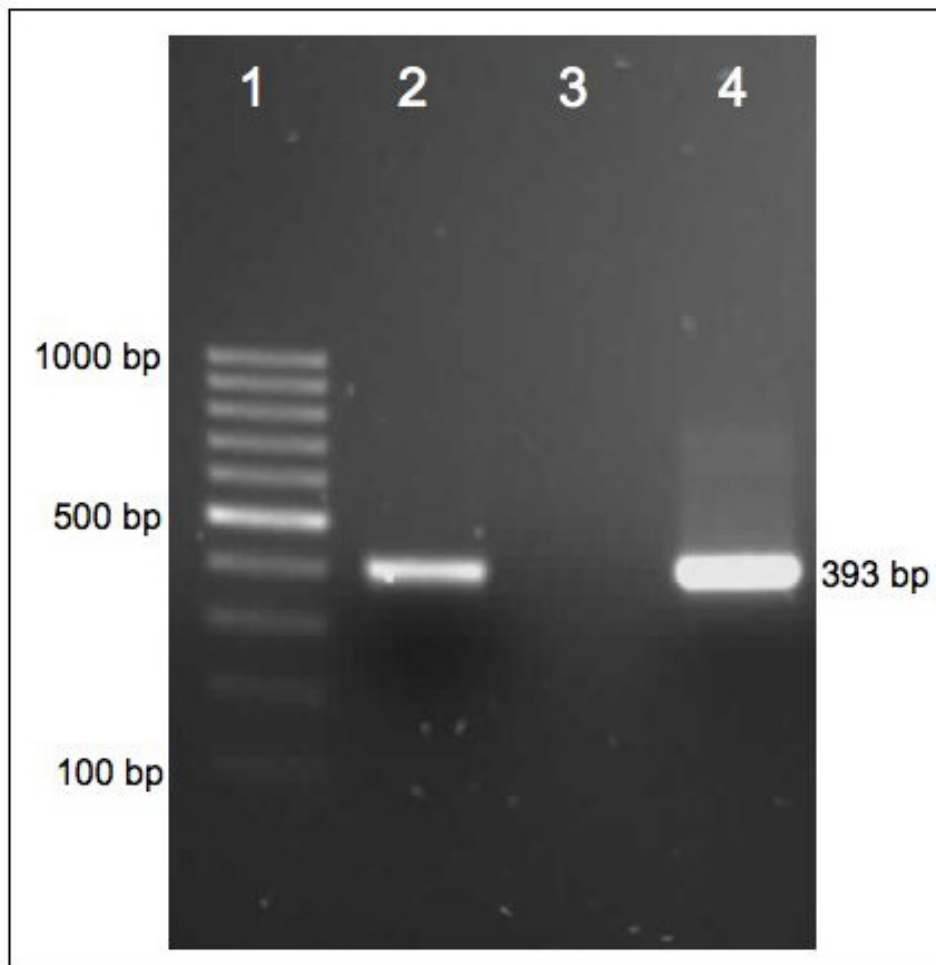
Dr Rodrigo Santos is a physician at the Infectious Disease Unit and Infection Control Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil and a PhD student at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. His main research interests are HIV-related opportunistic diseases and hospital acquired infections.

4.3.7 REFERENCES

1. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med.* 1990;323:1573–1580.
2. Messick JB, Berent LM, Cooper SK. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by Restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1998;36:462-466.
3. Foley JE, Harrus S, Poland A, Chomel B, Pedersen NC. Molecular, clinical and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J Vet Res.* 1998;59:1581-1588..
4. Messick JB. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Pathol.* 2004;33,2-13.
5. Pitcher DG, Nicholas RAJ. Mycoplasma host specificity: Fact or fiction? *The Veterinary Journal.* 2004;170:300-306.
6. Duarte MI, Oliveira MS, Shikanai-Yasuda MA, Mariani ON, Takakura CF, Pagliari C et al. *Haemobartonella*-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. *J Infect Dis.* 1992;165:976-977.
7. Kallick CA, Levin S, Reddi KT, Landau WL. Systemic lupus erythematosus associated with *Haemobartonella*-like organisms. *Nat New Biol.* 1972;236:145-146.

8. Mettler, NE. Isolation of a microtubercle from patients with hemolytic-uremic syndrome and thrombocytopenic purpura and from mites in the United States. *New Eng J Med.* 1969;281:1023-1027.
9. Kallick CA. Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus, 2005 Available from <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2005098045> (unpublished).
10. Greub G, Raoult D. *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J Med Microbiol.* 2002;51:915-23.
11. Gasquet S, Maurin M, Brouqui P, Lepidi H, Raoult D. Bacillary angiomatosis in immunocompromised patients. *AIDS.* 1998;12:1793-803.
12. Woods JE, Brewer MM, Hawley JR, Wisnewski N, Lappin MR. Evaluation of experimental transmission of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *AJVR.* 2005;66(6):1008-1012.
13. Willi B, Boretti FS, Meli ML, Bernasconi MV, Casati S, Hegglin D et al. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(12):3798-802.
14. Eberhardt JM, Neal K, Shackelford T, Lappin MR. Prevalence of selected infectious disease agents in cats from Arizona. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2006;8:164-168.
15. Blanchard A, Montagnier L. AIDS-associated mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:687-712.

Figure 1. PCR result for the detection of the *Mycoplasma haemofelis*-like organism in an HIV-positive patient. Lane 1, 100 bp marker. Lane 2, positive control: DNA extracted from the blood of a *Mycoplasma haemofelis*-positive cat. Lane 3, Negative control: water. Lane 4, DNA extracted from the blood of the patient in this study.



4.4 ABSTRACT 1

4.4.1 Detection of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'-like Organism in Dogs From Brazil

A conventional polymerase chain reaction (PCR) assay recently developed in our laboratory for the detection of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' in cats was successfully used for the detection of a novel hemoplasma in dogs. Ten dogs from southern Brazil used in an unrelated research project involving splenectomy were evaluated. Samples were collected before the splenectomy and 3, 15 and 30 days after the surgery. PCR products of 488 bp were amplified from seven of the dogs tested. Clinical and hematological abnormalities as well as co-infection with another hemoplasmas were evaluated. Co-infection was present in all the 7 positive dogs; clinical and hematological abnormalities including anemia and leukocytosis were also present, however it cannot be concluded that these findings were a direct result of the novel hemoplasma infection. Sequence analysis of the PCR fragment of 448 bp (without the primers) of the 16S ribosomal RNA gene revealed that the organism infecting dogs is closely related to the recently described feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (nucleotide sequence identity was 98 - 100%). The present study suggests the likelihood there is another specie of hemoplasma infecting dogs besides *Mycoplasma haemocanis* and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', however further studies are required. As with other hemoplasma infections, the PCR assay for this novel organism is needed for its detection in dogs, especially prior to blood donation, splenectomy, or treatment with immunosuppressive drugs.

5 DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho trouxe informações importantes sobre a infecção dos hemoplasmas no Brasil.

O diagnóstico dos hemoplasmas, como discutido anteriormente, é um ponto crítico para o entendimento e avaliação da infecção. O fato de que os organismos não se multiplicam em cultura como as demais bactérias, faz-se difícil o diagnóstico e estudos para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico. Até 1998 o diagnóstico da doença estava limitado a observação dos parasitas no esfregaço sanguíneo. Após os trabalhos de Foley e colaboradores (1998) e Messick e colaboradores (1998) utilizando técnicas moleculares baseadas na PCR que a doença passou a ser diagnosticada. Duas formas foram identificadas e com patogenias diferentes e terceira espécie ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ foi descoberta apenas em 2005 (WILLI et al., 2005). O alto custo e a necessidade de pessoal especializado para o uso da PCR em tempo real, fez com que trabalhos com esta espécie não fossem desenvolvidos no Brasil e outros países. Este foi o principal objetivo do primeiro artigo: desenvolver uma técnica de diagnóstico que fosse acessível para que países como o Brasil possam utilizar como ferramenta de diagnóstico. O trabalho não só desenvolveu e otimizou a técnica de PCR convencional como aplicou em amostras coletadas para o diagnóstico das demais espécies de hemoplasmas em felinos (a espécie ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ foi descoberta no decorrer deste estudo) demonstrando pela primeira vez que a espécie ‘*Candidatus M. turicensis*’ é prevalente em gatos domésticos no Brasil. O primeiro artigo trouxe a preocupação de utilizar *softwares* disponíveis na internet, visando trazer uma alternativa aos softwares de alto custo disponíveis no mercado, o método utilizado para projetar os *primers* e o protocolo foi utilizado com sucesso também para a otimização de protocolos previamente publicados e desenvolvimento de protocolos mais eficientes para a detecção dos hemoplasmas.

Utilizando a técnica desenvolvida no primeiro artigo, cães foram testados com o objetivo de verificar a presença de espécie semelhante em caninos (Resumo 1). Os cães escolhidos para tal foram cães que estavam sendo utilizados em uma pesquisa não relacionada que envolvia esplenectomia. Os

cães também apresentavam pulgas e carrapatos e era provenientes do Centro de Controle de Zoonose da cidade de Porto Alegre/RS. O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a infecção de uma espécie semelhante ao ‘*Candidatus M. turicensis*’ em caninos. As mesmas questões relacionadas a possibilidade de uma nova espécie semelhante ou a transmissão inter espécies são mantidas neste caso e maiores estudos moleculares são necessários para responde-las.

O segundo artigo traz os dados de prevalência no sul do Brasil. Até o presente trabalho casos já haviam sido relatados no Brasil porém muito pouco se sabia da importância da doença. Visto a diferença climática e condições dos vetores no Brasil, a dúvida quanto a prevalência das espécies permanecia. O estudo da prevalência demonstrou que a infecção com as 3 espécies de hemoplasmas de felinos são comuns e importantes no Brasil, assim como em outros países. Porém a comparação com os dados de prevalência deste trabalho com os dados de outros trabalhos em diferentes países se fez difícil devido a diferença das populações estudadas e métodos utilizados por diferentes autores. Um dado interessante obtido neste trabalho foi a associação da espécie ‘*Candidatus M. haemominutum*’ com anemia. Visto que esta espécie não é considerada patogênica por outros autores. Com esses resultados podemos especular que é possível existir uma diferente forma, mais patogênica, infectando gatos no Brasil.

O terceiro artigo foi o primeiro relato da infecção por micoplasma hemotrófico em um paciente humano. Várias evidências de que a infecção por hemoplasmas era possível em humanos, principalmente imunocomprometidos, apontavam para a necessidade de um estudo investigativo na tentativa de verificar a presença da infecção por hemoplasmas. O paciente do caso apresentado possuía todos os fatores que consideramos de risco para a infecção: apresentava-se imunocomprometido, convivia com 5 gatos com a presença de pulgas e ele havia sido mordido e arranhado por um dos gatos a ponto de ser infectado por *B. hanselae*. Quanto a possibilidade de transmissão do gato para o humano, podemos apenas especular, porém não podemos concluir que tenha ocorrido, visto que não foi possível um estudo comparativo das seqüências dos animais e do paciente e o estudo de outro gene do isolado humano, como o gene RNase P. A análise do gene RNase P não foi possível,

principalmente pela co-infecção por *Bartonella* sp., visto que os *primers* disponíveis não são específicos. O paciente em questão apresentava anemia, porém também não podemos concluir que a anemia foi causada pela infecção, visto que o paciente possuía outras doenças concomitantes. No entanto podemos apenas concluir que pacientes imunocomprometidos podem ser infectados com hemoplasmas, porém mais estudos devem ser conduzidos para investigar a importância e o agente etiológico da infecção em humanos.

Muitas são as questões a serem respondidas em relação aos hemoplasmas. Visto a importância e a alta prevalência da infecção em animais de companhia e a possibilidade de se tornar uma doença emergente em humanos, maiores estudos devem ser conduzidos. As perspectivas para futuros estudos são:

- Avaliar a divergência evolutiva das espécies de hemoplasmas com as outras espécies da família *Mycoplasmataceae*.
- Definir um mínimo de genes requeridos para diferenciar e avaliar funcionalmente as espécies de hemoplasmas.
- Identificar genes que possam ser especificamente requeridos para a sobrevivência, adaptação e virulência dos organismos, especialmente aqueles responsáveis pelo parasitismo no eritrócito.
- Identificar deficiências metabólicas específicas no genoma dos hemoplasmas a fim de desenvolver um método de cultura *in vitro*.
- Identificar domínios que responsáveis por gerar o reconhecimento pelos anticorpos do hospedeiro a fim de desenvolver uma técnica sorológica de diagnóstico e no futuro uma vacina contra os hemoplasmas.
- Investigar o papel zoonótico dos hemoplasmas.

Vários destes trabalhos estão em desenvolvimento na Universidade de Purdue e foram acompanhados durante o estágio no exterior. Dentre as técnicas acompanhadas estão:

Desenvolvimento do mapa ótico para *Mycoplasma haemofelis*.

O tamanho do genoma completo do *Mycoplasma haemofelis* foi identificado através da construção de uma biblioteca genômica utilizando

cromossomo bacteriano artificial (BAC) e o mapa físico utilizando *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) que revelou o tamanho do genoma de 1199 kb (desvio padrão de 13.5 kb) (MESSICK & BERENT, 2003). No entanto, os demais hemoplasmas ainda possuem o genoma desconhecido e as análises filogenéticas são baseadas apenas nos genes 16S rRNA e RNase P. Apesar de trabalhos serem desenvolvidos com infecção experimental de sangue de felino infectado com hemoplasmas e inoculado em cães e vice-versa sem o desenvolvimento da doença, especula-se que o gato pode agir como reservatório para infecção em cães bem como a transmissão inter-espécies é possível. Trabalhos também foram realizados na tentativa de se provar que as espécies *M. haemofelis* e *M. haemocanis* são espécies distintas. Neste trabalho o gene RNase P foi utilizado por se tratar de um gene apresentando maior diversidade que o gene 16S rDNA que é conservado entre as espécies. Uma diferença de 5% na seqüência suporta a hipótese de que *M. haemofelis* e *M. haemocanis* são espécies distintas porém, segundo Olsen & Woese (1999) mais moléculas e genes diferentes devem ser comparados para determinar e diferenciar uma espécie de outra. Durante o período na Universidade de Purdue, West Lafayette, U.S.A, um mapa ótico para *M. haemofelis* a partir de um felino experimentalmente infectado e utilizando a enzima de restrição *NcoI* foi desenvolvido (figura 1) (ASTON et al., 1999). O mapa ótico demonstrou que o genoma completo do *M. haemofelis* consta de 1207 Kb (110 fragmentos quando utilizada digestão total pela enzima de restrição *NcoI*) em tamanho, concordando com o trabalho realizado por Berent & Messick (2003). O desenvolvimento de mapas óticos para as outras espécies de hemoplasmas é uma alternativa na tentativa de responder a questão de que as espécies filogeneticamente relacionadas como *M. haemofelis* e *M. haemocanis* tratam-se de espécies distintas. Ao contrário das técnicas convencionais, o mapa ótico utiliza moléculas únicas de DNA linearizadas digeridas por enzimas de restrição e marcadas com fluorescência em uma lâmina de vidro cuja observação se dá por microscopia, independentemente do uso de sequenciamento e eletroforese. A técnica permite a utilização de moléculas de tamanhos variados e o resultado é a soma de milhares de fragmentos redundantes, resultado da restrição enzimática total e parcial, analisados por um software (ASTON et al., 1999). A utilização de mapas óticos é uma

alternativa para o acesso de genomas completos, principalmente para organismos que não se multiplicam em cultura (SAMAD et al., 1995).

Além do uso do mapa ótico como alternativa na comparação das espécies de hemoplasmas, o objetivo de sua construção é acelerar os processos de sequenciamento e verificar a presença ou ausência de regiões quiméricas nos clones BAC previamente descritos por Berent & Messick (2003). Os resultados dos trabalhos de construção de uma biblioteca completa do *M. haemofelis* poderá trazer um grande impacto em se tratando de taxonomia e evolução dos micoplasmas, visto que há a hipótese de que genes dos hemoplasmas podem ter sido retidos ou adquiridos durante o processo de evolução reductiva dos micoplasmas. O melhor entendimento sobre o parasitismo no eritrócito também podem ser esclarecido.

Um segundo projeto em andamento na Universidade de Purdue, e acompanhado durante o estágio no exterior, utiliza a construção de uma biblioteca genômica de expressão utilizando o vetor ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e combinada com a técnica utilizando o equipamento Luminex[®] System (Luminex corporation, Austin, Texas, USA), com o objetivo de identificar domínios responsáveis pela resposta imune do felino ao *Mycoplasma haemofelis* (este estudo é financiado pela *Morris Animal Foundation*).

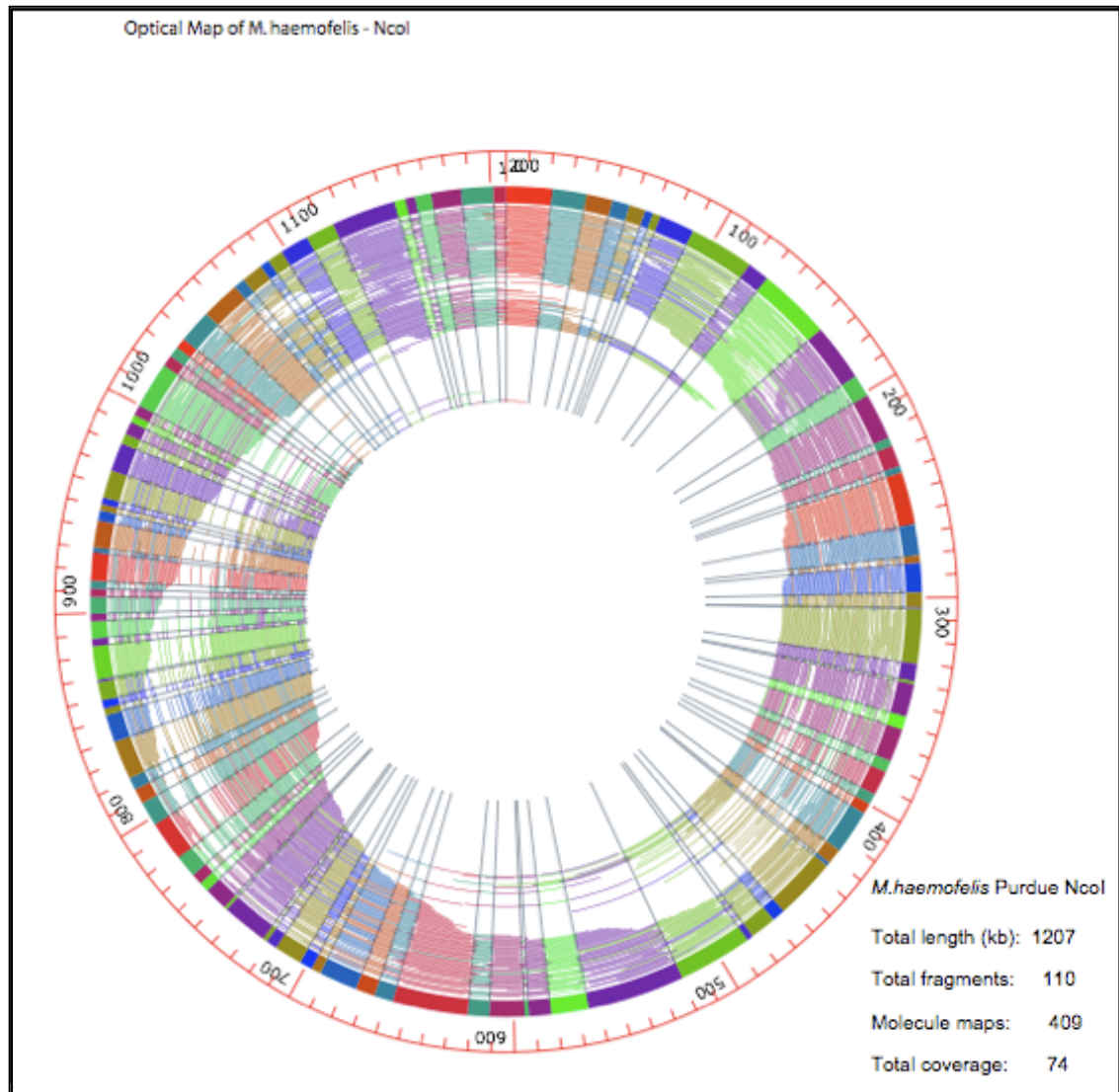


Figura 1. Mapa ótico do *Mycoplasma haemofelis* utilizando a enzima de restrição *NcoI*. (OpGen, Inc.)

Durante o estágio no exterior os seguintes protocolos foram desenvolvidos e/ou otimizados:

Diagnóstico pela PCR para hemoplasmas

Várias técnicas baseadas na PCR são disponíveis para a detecção dos hemoplasmas. No entanto algumas técnicas foram desenvolvidas previamente a disponibilização de *softwares* para a escolha de *primers*, verificação de formação e *primer-dimer* ou *hairpin* e para a otimização dos protocolos. Mesmo com as técnicas por PCR em tempo real disponíveis, o alto custo de

equipamentos e necessidade de pessoal especializado traz a necessidade do uso de técnicas convencionais em países como o Brasil e outros países. Por essas razões, um protocolo para a nova espécie '*Candidatus M. turicensis*' (Artigo 1) e os protocolos para *M. haemofelis* que pode ser também utilizado para *M. haemocanis* (MESSICK et al., 1998) foram otimizados, um novo protocolo para '*Candidatus M. haemominutum*' foi desenvolvido e adicionalmente um protocolo específico para hemoplasmas e que no caso dos felinos, detecta as 3 espécies de hemoplasmas em uma única reação, também foi desenvolvido.

Devido ao alto custo dos *softwares* especializados, foi utilizada uma combinação de programas disponíveis na internet. Para projetar os *primers* (para os novos protocolos) e otimização dos ensaios, os seguintes passos foram seguidos:

Iniciadores (*primers*)

A escolha de *primers* adequados é fundamental para o sucesso da PCR. Os *primers* projetados para os protocolos desenvolvidos e otimizados neste estudo foram baseados no gene 16S rRNA dos hemoplasmas.

Seqüência de consenso para hemoplasmas.

Para projetar os *primers*, o primeiro passo utilizado foi a obtenção das seqüências dos hemoplasmas na base de dados do GenBank e a construção de seqüências de consenso para cada hemoplasma em questão, com a finalidade de evitar utilizar uma seqüência modelo contendo possíveis erros que não representam a seqüência real do organismo como erros decorrentes da falha da polimerase durante as reações da PCR. Para a construção das seqüências de consenso foi utilizado o programa CLUSTAL W, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html> (THOMPSON et al., 1999). As seqüências consenso foram obtidas e salvas em arquivos tipo FASTA para sua utilização nos passos seguintes.

Escolha dos *primers*

As seqüências de consenso foram então utilizadas para a realização de múltiplos alinhamentos utilizando o mesmo programa (CLUSTAL W) com a finalidade de se selecionar visualmente regiões do gene 16S RNA específicas

para a espécie alvo, ou no caso do protocolo comum para as 3 espécies de hemoplasmas de felinos, regiões consenso para os hemoplasmas porém distintas para outros micoplasmas e outros parasitas como *Bartonella* sp. que podem estar presente no sangue de felinos.

Com base nas análises comparativas das seqüências utilizadas no presente estudo, foram avaliadas as regiões conservadas e não conservadas do gene 16S rRNA de cada protocolo selecionada para a escolha dos primeiro *primer* (*upstream*).

As seguintes regras foram seguidas para a escolha dos primers: a) tamanho entre 18 e 24 pb; b) porcentagem de GC entre 35 e 60%; c) temperatura de hibridização entre 55 e 58% (HENEGARIU et al., 1997).

O segundo *primer* (*downstream*) foi obtido com auxílio do programa Primer3, disponível em <http://primer3.sourceforge.net/> (ROZEN & SKALETSKY, 2000). O programa Primer3 fornece *downstream primers* compatíveis com o *upstream* selecionado manualmente e de acordo com o tamanho do produto desejado. Dentre os *primers* fornecidos, foram selecionados *downstream primers* baseados em Tm similares, mínimo *score* para complementaridade entre os dois *primers* (formação de hetero-dímero) e mínimo *score* para complementaridade na extremidade 3' (formação de homo-dímero e/ou *hairpin*).

Adicionalmente dois programas foram utilizados para testar as propriedades individuais de cada primer: a) o programa SMS - Sequence Manipulation Suite disponível em <http://bioinformatics.org/sms2/index.html> (STOTHARD, 2000) que confere as propriedades individuais de cada *primer* separadamente e: b) IDT science tools, Oligo Analyser 3.1 (© Copyright 2008 Integrated DNA Technologies, Inc) disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> que também confere propriedades individuais dos primers e adicionalmente confere para a formação de hetero-dímeros.

Especificidade dos primers

A especificidade dos *primers* foram testadas primeiramente virtualmente utilizando-se a ferramenta BLASTn, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. O utilizar a ferramenta BLASTn

(ALTSCHUL et al., 1990) para seqüências pequenas como *primers*, alguns cuidados devem ser tomados para evitar falsos resultados. O programa não reconhece seqüências menores que 30 pb, no entanto, o próprio programa recomenda a utilização de pelo menos 30 Ns entre as duas seqüências dos *primers*, ambos na direção 5' – 3'. Adicionalmente deve-se modificar os parâmetros “word size” para 7, “expected value” para 1000 e não utilizar o filtro “low complexity”(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Os *primers* então foram alinhados considerando primeiramente a coleção completa de seqüências de nucleotídeos disponíveis na base de dados e posteriormente considerando o gênero *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp. É importante ressaltar que devido a grande quantidade de seqüências na base de dados os resultados quando testados considerando a coleção completa de seqüências pode não revelar importantes alinhamentos, por essa razão a pesquisa também foi realizada limitado-se aos organismos de interesse para o protocolo em questão.

Os oligonucleotídeos selecionados para cada protocolo foram sintetizados (IDT[®] - Integrated DNA Technologies Coralville, IA, USA) e testados utilizando-se controles para hemoplasmas e *Bartonella* spp. para confirmar a especificidade.

Otimização.

Protocolo inicial

Como ponto inicial de cada protocolo, foi utilizado o *website* Oligo – PCR T_a ^{OPT} Calculator Program, disponível em <http://webu.co.uk/oligo/index.php>, que calcula a temperatura de hibridização (T_a) ótima para cada protocolo baseada nos *primers* e produto a ser amplificado assim como condições da reação em baseadas em diferentes técnicas baseadas na PCR. Para a otimização foi utilizado o protocolo básico sugerido pelo programa. As condições iniciais referentes às concentrações dos reagentes foram as seguintes: tampão 1X, concentração de $MgCl_2$ 1.5 mM, concentração de dNTPs 200 μ M, concentração de cada *primer* 0,04 pmol e 1 U/ μ L de Taq polimerase (WHITE, 2005). Após o ponto inicial alguns parâmetros foram otimizados de acordo com a necessidade de cada protocolo.

Os gerais para a otimização estão resumidos a seguir.

Gradiente (Ta)

Para otimizar a temperatura de hibridização um experimento utilizando gradiente de temperatura foi realizado com o termociclador Eppendorf® Mastercycler® gradient thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA). A temperatura de hibridização é diretamente relacionada com o tamanho e composição dos *primers*. Baixas temperaturas de hibridização podem resultar na presença de pareamentos inespecíficos enquanto que altas temperaturas aumentam a especificidade porém pode reduzir a sensibilidade do teste. Fato particularmente importante em se tratando de hemoplasmas pela presença do estado de portador com baixa parasitemia. Previamente ao experimento, diluições (10^1 até 10^6) das amostras utilizadas como controle foram efetuadas e a menor concentração positiva pela PCR inicial assim como uma amostra com alta concentração de DNA foram utilizadas simultaneamente para o gradiente que foi realizado utilizando-se pelo menos 5°C abaixo e 5°C acima da Ta calculada pelo programa Oligo – PCR T_a^{OPT} Calculator.

Concentração de *primers*

Para avaliar a ótima concentração dos *primers* experimentos contendo diferentes concentrações foram realizados. As concentrações variaram de 0,08 a 1 µM para cada *primer*.

Concentração do tampão

O componente crítico do tampão é o KCl na concentração de 50 mM que pode afetar a estabilidade dos pareamentos. No entanto maiores concentrações do tampão são requeridas para aquelas seqüências ricas em CGs, aumentando a eficiência da reação (SARKAR et al., 1990). Pelo fato do gene alvo para os protocolos (16S rDNA) ser rico em ATs (aproximadamente 55%), experimentos com diferentes concentrações do tampão não foram realizados.

Concentração de MgCl₂

A concentração de cloreto de magnésio é crítica para a PCR. O cloreto de magnésio atua como um co-fator da atividade da Polimerase. Considerando

que a eficiência da atividade da Taq polimerase e o hibridização dos *primers* dependem da concentração de MgCl₂, a sua amplitude de variação deve ser muito estreita, uma vez que concentrações incorretas podem resultar em baixa eficiência de amplificação (baixas concentrações) ou na produção de produtos não específicos (altas concentrações) (WOLFF et al. 1993), experimentos mantendo todos os demais parâmetros constantes e variando a concentração de MgCl₂ de 0,5 a 4 mM foram realizados.

Deoxinucleotídeos (dNTPs)

Os dNTPs são a maior fonte de grupos fosfato na reação, mudanças na sua concentração afetam a disponibilidade de magnésio (HENEGARIU et al 1997). Diferentes concentrações também foram testadas para a otimização da concentração de dNTPs. As concentrações variaram de 50 a 200 µM.

Otimização do protocolo para *M. haemofelis*

No presente trabalho o protocolo para a detecção do *M. haemofelis* foi otimizado a partir do protocolo proposto por Messick e colaboradores (1998). Para tanto os parâmetros: Ta, concentração de magnésio, tempo de desnaturação, tempo de hibridização, tempo de extensão e número de ciclos foram otimizados como descrito acima.

Os primers utilizados mantiveram-se os mesmos descritos por Messick e colaboradores (1998), gerando um produto de 392 pb. São eles:

H felis F1 – 5' – GAC TTT GGT TTC GGC CAA GG – 3'

H felis R3 – 5' CGA AGT ACT ATC ATA ATT ATC CCT C – 3'

A otimização foi conduzida utilizando-se o *kit* GoTaq[®] *flexi* DNA Polymerase (Promega, Madison, WI). O termociclador utilizado foi Eppendorf[®] Mastercycler[®] gradient thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY). As condições da reação se encontram na tabela 1 e 2

Tabela 1. Condições da reação para o protocolo de PCR convencional otimizado para o diagnóstico do *Mycoplasma haemofelis*.

Reagente	Concentração	Concentração para cada amostra	Volume em μL
H ₂ O			9,75
Tampão (green)	5x	1	5
MgCl ₂	25 mM	2	2
dNTPs	2.5 mM	0,2	2
<i>H felis</i> F1	10 pmol	0,2	0.5
<i>H felis</i> R3	10 pmol	0,2	0.5
Taq Polimerase	5 U/ μL	0,25	0,25
Amostra de DNA			5
Total da reação		20	25

Tabela 2. Condições do termociclador para o protocolo de PCR convencional otimizado para o diagnóstico de *Mycoplasma haemofelis*.

Atividade	Temperatura e tempo
Denaturação inicial	95°C por 2'
Denaturação	94°C por 45"
Hibridização	53°C por 30''
Extensão	72°C por 30"
Número de ciclos	34
Extensão final	72°C por 5'
Espera	4°C

Otimização do protocolo para '*Candidatus M. haemominutum*'

O protocolo para a detecção do '*Candidatus M. haemominutum*' foi otimizado a partir do protocolo proposto por Foley e colaboradores (1998). Durante o trabalho foi observado que o protocolo favorecia a formação de *primer-dimer*, para tanto, um novo protocolo para a detecção do '*Candidatus M. haemominutum*' foi desenvolvido. Os *primers* utilizados foram os seguintes, gerando um produto de 454 pb:

LH F1 5' – AGC GTT CTG GGA AAC TAG AG – 3'
 LH R1 5' – GAC AAA CGA TAT CTA TCA CA – 3'

A otimização foi conduzida utilizando-se os mesmos reagentes e equipamentos. As condições da reação se encontram na tabela 3 e 4:

Tabela 3. Condições da reação para o protocolo de PCR convencional desenvolvido para o diagnóstico do ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’.

Reagente	Concentração	Concentração para cada amostra	Volume em μL
H ₂ O			9,25
Tampão (green)	5x	1	5
MgCl ₂	25 mM	1,5	1,5
dNTPs	2,5 mM	0,2	2
LH F1	10 pmol	0,2	0,5
LH R1	10 pmol	0,2	0,5
Taq Polimerase	5 U/ μL	0,25	0,25
Amostra de DNA			5
Total da reação		20	25

Tabela 4. Condições do termociclador para o protocolo de PCR convencional desenvolvido para o diagnóstico de ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’.

Atividade	Temperatura e tempo
Denaturação inicial	95°C por 2'
Denaturação	94°C por 1'
Hibridização	55°C por 30''
Extensão	72°C por 30''
Número de ciclos	34
Extensão final	72°C por 5'
Espera	4°C

Protocolo específico para a detecção de micoplasmas hemotróficos

O desenvolvimento de um protocolo específico para os hemoplasmas veio da necessidade de se ter uma ferramenta de baixo custo, que sirva de triagem de animais para doação de sangue e para selecionar animais para pesquisa e triagem clínica para infecção por hemoplasmas. Outra utilidade para o protocolo é a procura de novas espécies, independente do hospedeiro a ser testado. Para tanto o protocolo foi desenvolvido utilizando primers projetados para uma região do gene 16S rRNA comum aos hemoplasmas porém divergentes aos demais micoplasmas e hemoparasitas.

Os *primers* utilizados geram um produto de 465 a 469 pb dependendo da

espécie. O protocolo foi otimizado seguindo os mesmos passos descritos acima. As figuras 2 e 3 demonstram parte da otimização do protocolo.

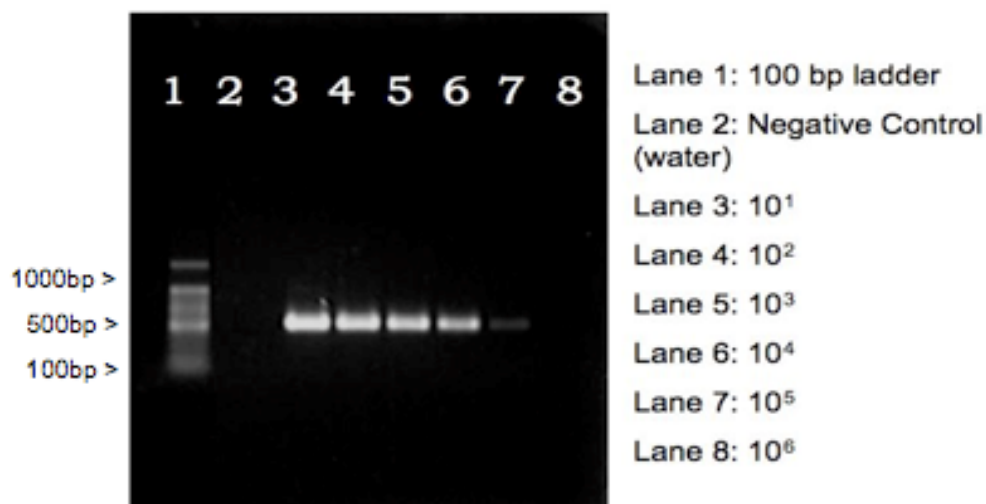


Figura 2. PCR convencional desenvolvido para a detecção de micoplasmas hemotróficos. Diluições seriadas utilizando amostra controle positiva para *Mycoplasma suis* para determinar o limite e detecção.



Figura 3. Gradiente de temperatura aplicado ao PCR convencional desenvolvido para a detecção de micoplasmas hemotróficos utilizando amostra controle positiva para *Mycoplasma suis* em alta e baixa concentrações. Canaleta 2-8: Amostra diluída 1/10, linha 10 a 15 amostra diluída 1/100000. Canaleta 1 – marcador de peso molecular de 100 pb. Canaleta 9 – controle negativo.

Baseando nos resultados laboratoriais combinados com os softwares, concluiu-se que o protocolo desenvolvido apresenta alta sensibilidade nas temperaturas de 51,6 a 58,8 °C.

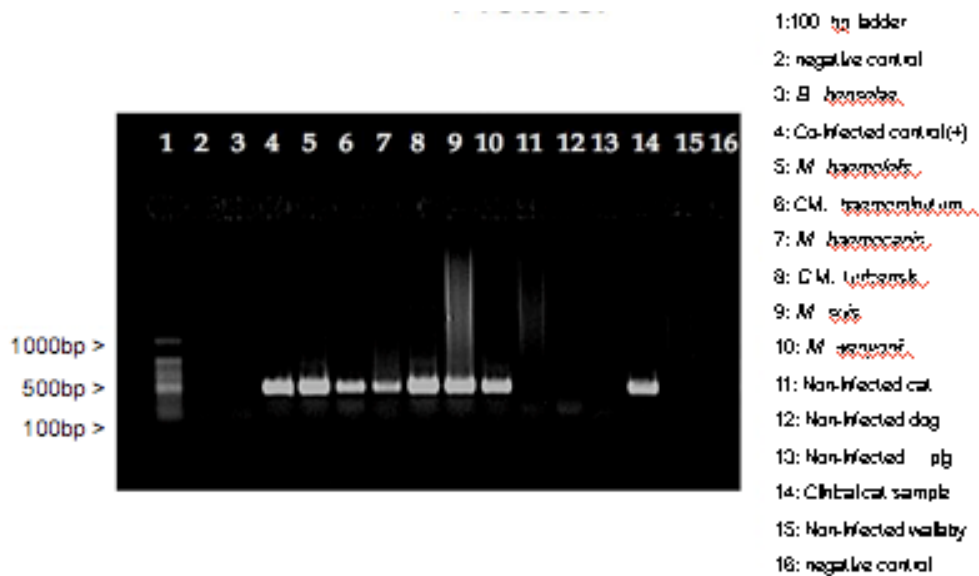


Figura 4. PCR convencional desenvolvido para a detecção de micoplasmas hemotróficos utilizando amostras de diferentes espécies.

Em conclusão, uma nova ferramenta de diagnóstico para a detecção de hemoplasmas foi desenvolvida. A utilização deste protocolo é eficiente para reduzir os custos na pesquisa, principalmente estudos de prevalência, utilizando-se o protocolo como triagem. O *American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM) já recomenda o diagnóstico de hemoplasmas em cães e gatos para doação de sangue (WARDROP et al., 2005). No caso de triagem para doadores de sangue, o tempo e custo também podem ser reduzidos, pois o resultado negativo para este protocolo significa a ausência de qualquer espécie de hemoplasmas. A utilização para triagem de animais para pesquisa científica é também de extrema importância, visto o caso dos canis de beagles infectados por *M. haemocanis* utilizados para pesquisa nos Estados Unidos e Europa e podendo estar interferindo em resultados de diversos trabalhos utilizando o cão como modelo, inclusive para medicina humana.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho trouxe elucidacões sobre a infecção por hemoplasmas em animais de companhia no Brasil e permitiu concluir-se que:

- A espécie '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' está presente na população de felinos domésticos na região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- As três espécies de hemoplasmas são prevalentes em gatos domésticos na região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- A espécie mais comum infectando gatos é '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'.
- Anemia é associada à infecção por *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'.
- Os principais fatores de risco da infecção em felinos são associados a animais com acesso a rua, e do sexo masculino.
- Técnicas convencionais pela PCR foram desenvolvidas e otimizadas e estão disponíveis para o diagnóstico das 3 espécies de hemoplasmas em felinos.
- Um técnica de triagem clínica, pesquisa ou doadores de sangue para os hemoplasmas foi desenvolvida e otimizada.
- O diagnóstico para hemoplasmas em animais a serem usados para pesquisa científica é recomendado.
- A detecção de hemoplasmas para a triagem de animais doadores de sangue é recomendada.
- Cães podem ser infectados com uma nova espécie de hemoplasma semelhante ao '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'.
- Humanos podem ser infectados por micoplasma hemotrófico semelhante ao *Mycoplasma haemofelis*.
- A importância da infecção por hemoplasmas em humanos, principalmente imunocomprometidos, deve ser investigada.
- Estudos moleculares dos hemoplasmas devem ser realizados para melhor compreender a patogenia da doença.
- O desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico baseada em

sorologia é crucial para monitorar a doença e a resposta do hospedeiro.

- Mais estudos moleculares devem ser realizados para melhor entender a patogenia, rotas metabólicas, e a própria natureza dos hemoplasmas.

7 REFERÊNCIAS ADICIONAIS

ALLEMAN, A.R. et al. Western Immunoblot Analysis of the Antigens of *Haemobartonella felis* with sera from Experimentally Infected Cats. **J Clin Microbiol.** v. 37, n. 5, p. 1474-1479, 1999.

ALTSCHUL. S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, p. 403-410, 1990.

AUSTERMAN, J. W. Haemobartonellosis in a nonsplenectomized dog. **Vet Med Small Anim Clin**, v. 74, p. 954, 1979.

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

BAUMANN, A et al. *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: A Preliminary Study. **Vet Clin Path**, v. 35, n. 3, p. 370, 2006.

BELLAMY, J. E., et al. Cold-agglutinin hemolytic anaemia and *Haemobartonella canis* infection in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 173, p. 397-401, 1978.

BENJAMIN, M. M. & LUMB, W. V. *Haemobartonella canis* infection in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 135, p. 388-390, 1959.

BERENT, L.M. et al. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **Am j Vet Res**, v. 59, p. 1215-1220, 1998.

BERENT, L.M. et al. Specific in situ hybridization of *Haemobartonella felis* with DNA probe and tyramine signal amplification. **Vet Pathol**, v. 37, p. 47-53, 2000.

BERENT, L. M. *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*): Molecular Diagnostics and Genomic Studies. Urbana, Illinois – 2002. 124f. **Thesis** (PhD) – University of Illinois, Urbana-Champaign, USA, 2002.

BERENT, L.M. & MESSICK, J.B. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infect Immun**, v. 71, p. 3657-3662, 2003.

BLANCHARD, A. & MONTAGNIER, L. AIDS-associated mycoplasmas. **Annu Rev Microbiol**, v. 48, p. 687-712, 1994.

BOBADE, P.A. & NASH, A.S. A comparative study of the efficiency of acridine orange and Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. **Vet Parasitol**, v. 26, p. 169-172, 1987.

BOBADE, P.A. et al. Feline Haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship with feline leukemia virus. **Vet Record**, v. 122, n. 2, p. 32-36, 1988.

BRISON, J. J. & MESSICK, J. B. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 218, p. 1943–1945, 2001.

BRODEY, R. S. & SHALM, O. W.: Hemobartonellosis and thrombocytopenic purpura in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 143, p. 1231-1236, 1963.

CARNEY, H.C. & ENGLAND, J.J. Feline hemobartonellosis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 23, p. 79-90, 1993.

CARR, D. T. & ESSEX H. E. Bartonellosis: a cause of severe anaemia in splenectomised dogs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 57, p. 44-45, 1944.

CITTI, C. & WISE, K.S. *Mycoplasma hyorhinis* vlp gene transcription: critical role in phase variation and expression of surface lipoproteins. **Mol. Microbiol**, v. 18, p. 649–660, 1995.

CHENG, Z.F. et al. The vacB gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase **R. J. Biol. Chem**, v. 273, p. 14077–14080, 1998.

CLARK, K.G.A A basophilic micro-organism infecting human red cells. **Brit Jof Hematology** v. 29, p. 301-304, 1975.

CLARK, P. et al. Detection of *Haemobartonella felis* (*Candidatus Mycoplasma Haemofelis*) in Australia that is similar to the 'Ohio' strain. **Aust Vet J**, v. 80, n. 11, p. 703-704, 2002.

COLE, S.T. & GIRONS, I.S. Bacterial genomics. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 14, p.139–160, 1994.

COLE, B.C. & ATKIN, C.L. The *Mycoplasma arthritidis* T-cell mitogen, MAM: A model superantigen. **Immunol Today**, v. 12, p. 271-276. 1991.

CRIADO-FORNELIO, A. et al. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasids in cats from southern Europe: a molecular study. **Vet Microbiol**, v. 93, p.301-317, 2003.

DADDOW, K. N. The transmission of a sheep strain of Eperythrozoon ovis to goats and the development of a carrier state in the goats. **Aust Vet J**, v. 55, p. 605, 1979

DALLO, S.F. et al. DNA and protein sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. **Infect. Immun**, v. 57, p. 1059–1065, 1989.

DEAN, R. et al. 2005. Use of real-time PCR to detect *M. haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats, p. 554. In **BSAVA 2005 Proceedings**. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, United Kingdom.

DE MORAIS, H.A. et al. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in three cats from Brazil. **J of Fel Med and Surg**, v. 9, n. 6, p. 518-520, 2007.

DONOVAN, E. F. & LOEB, W. F. Hemobartonellosis in the dog. **Vet Med**, v. 55, p. 57-62, 1960.

DUARTE, M.I.S. et al. *Haemobartonella*-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. **J Infect Dis**, v.165, p.976-977, 1992.

FLINT, J.C. & MOSS, L.D. Infectious anemia in cats. **J Am Vet Med Assoc**, v. 122, p. 45-48, 1953.

FLINT, J.C. et al. Feline infectious anemia. I. Clinical aspects. **Am J Vet Res**, v. 20, p. 33-40, 1958.

FLINT, J. C. et al. Feline Infectious anemia. II. Experimental cases. **Am J Vet Res**, v. 20, p. 33-40, 1959.

FOLEY, J. E. et al. Molecular, clinical and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **Am J Vet Res**, v.59, p.1581-1588, 1998.

FOLEY, J.E. Hemobartonellosis. IN: **Consultations in Feline Internal Medicine 4**. W.B. Saunders Company. p 12-17, 2001.

FUJIHARA, M. et al. Occurrence of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' infection in domestic cats in Japan. **J Vet Med Sci**, v. 69, n. 10, p. 1061-1063, 2007.

GARCIA, M. et al. Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplification products. **J. Vet. Diagn. Invest**, v. 8, p. 56–63, 1996.

GEORGE, J.W. et al. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. **Am J Vet Res**, v.63, p. 1172-1178, 2002.

GRETILLAT, S. *Haemobartonellosis canis* (Kikueth, 1928) in the blood of dogs with parvovirus disease. **J Small Anim Pract**, v. 22, p. 647-653, 1981.

GRETILLAT, S. & KONARZEWSKI, B. Presence of a prokaryote of the genus *Haemobartonella* (Tyzzer and Weinman, 1939), in the blood of Nigerians in the Niamey region. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v. 71, p. 421-416, 1978.

GRINDEM, C.B. et al. Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. **J Am Vet Med Assoc**, v. 196, p. 96-99, 1990.

GUIMARAES, A.M.S. et al. *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ co-infection in a domestic cat (*Felis catus*) in Brazil. **Vet Clin Path**, v. 34, Suppl. , p. 6, 2005.

GUIMARAES, A.M.S. Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu – 2008. 129 f. **Dissertação** (mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GUIMARAES, A.M.S. et al. Comparison between two diagnostic methods for *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” detection in blood from anemic domestic cats. In: XV **CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA**, 2008, Curitiba. *Anais...Curitiba: CBPV, 2008. 1CD-ROM.*

HAGIWARA, M.K.; RECHE JÚNIOR, A.; LUCAS, S.R.R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em Sao Paulo. **Rev Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 1, p. 35-38, 1997.

HAMPSHIRE, V.A. et al. Adverse drug event reports at the United States Food And Drug Administration Center for Veterinary Medicine. **J Am Vet Med Assoc**, v. 15, n. 225(4), p. 533-536, 2004.

HARBUTT, P.R. A clinical appraisal of feline infectious anaemia and its transmission under natural conditions. **Australian Vet J**, v. 39, p. 401-404, 1963

HARRUS, S. et al. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. **Vet Rec**, v. 151, p. 82-85, 2002.

HARVEY, J.W. & GASKIN, J.M. Experimental feline haemobartonellosis. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 13, p. 28-38, 1977.

HARVEY, J.W. & GASKIN, J.M. Feline haemobartonellosis: attempts to induce relapses of clinical disease in chronically infected cats. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 14, p. 453-456, 1978.

HARVEY, J.W. Hemobartonellosis. In: GREENE CE (ed.). **Infectious diseases in dogs and cats**. The WB Saunders Co., Philadelphia, PA, 1990. p. 434-442.

HARVEY, J.W. Hemotropic mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: Greene CE (ed), **Infectious Diseases of the Dog and Cat** (3rd edn). Saint Louis: Elsevier Inc, 2006, pp. 252-260.

HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.

HORA, A.S. et al. Associação da infecção por micoplasmas hemotrópicos e pelos retrovírus em felinos domésticos anêmicos. In: **CONGRESSO PAULISTA DE FELINOS 2007**, Guarujá, 2007.

HORA, A.S. Associação da infecção por *Mycoplasma haemofelis* e os vírus da leucemia e imunodeficiência em felinos anêmicos. – 2008. 115 f. **Dissertação** (mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HORA, A.S. et al. Associação da infecção por *Mycoplasma haemofelis* e os vírus da leucemia e imunodeficiência em felinos anêmicos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CLINICOS DE PEQUENOS ANIMAIS**, 2008, Maceió. *Anais...* Maceió: ANCLIVEPA, 2008a.

HORA, A.S et al. Ocorrência de *Mycoplasma haemofelis* em felinos anêmicos. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CLINICOS DE PEQUENOS ANIMAIS**, 2008, Maceió. *Anais...* Maceió: ANCLIVEPA, 2008b.

HOSKINS, J. D. Canine haemobartonellosis, canine hepatozoonosis, and feline cytauxzoonosis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 21, p. 129-140, 1991.

GERMAN, A. et al. Oesophageal strictures in cats associated with doxycycline therapy. **J Fel Med Surg**, v. 7, n. 1, p 33-41, 2005.

INOKUMA, H. et al. Molecular Survey of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma Haemominutum*' infection in cats in Yamaguchi and surrounding Areas. **J Vet Med Sci**, v. 66, n. 8, p. 1017-1020, 2004.

JENSEN, W.A. et al. Use of a Polymerase Chain Reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **Am J Vet Res**, v. 62, n. 4, p. 604-608, 2001.

JOHANSSON, K.E. et al. *Mycoplasma caviopharyngis* and *Mycoplasma fastidiosum*, the closest relatives to *Eperythozoon* spp. and *Haemobartonella* spp. **FEMS Microbiol Lett**, v. 174, p. 321-326, 1999.

JUST, F, PFISTER, K. Frequency of haemoplasma infections of the domestic cat in Germany. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.120, n.5-6, p. 197-201, 2007. [abstract]

KALLICK, C.A. et al. Systemic lupus erythematosus associated with *Haemobartonella*-like organisms. **Nat New Biol**, v. 236, p. 45-146, 1972.

KALLICK, C.A. Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus, 2005 Acessado em <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2005098045>.

KEMMING, G.I. et al. Can We Continue Research in Splenectomized Dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old Problem - New Insight. **Eur Surg Res**, v. 36, p. 198-205, 2004.

KEMMING, G.I. et al. *Mycoplasma haemocanis* infection--a kennel disease? **Comp Med**, v. 54, n. 4, p. 404-409, 2004a.

KENNY, M. J. et al. Demonstration of Two Distinct Hemotropic Mycoplasmas in French Dogs. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 11, p. 5397-5399, 2004.

KEWISH, K.E. et al. *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. **Can Vet J**, v. 45, p. 749-752, 2004.

KIKUTH, W. A new cause of anaemia, *Bartonella canis* nov. sp. **Klin Wochschr**, v. 7, p. 1729, 1928.

KISS, A. et al. The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. **FEBS Lett**, v. 39, p. 77-79, 1977.

KOTB, M. Bacterial Pyrogenic Exotoxins as Superantigens. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, p. 411-426, 1995.

KRAKOWKA, S. Transplacentally acquired microbial and parasitic diseases of dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 171, p. 750-753, 1977.

LAPPIN MR. Opportunistic infections associated with retroviral infections in cats. **Semin Vet Med Surg (Small Anim)**, v. 10, p. 244-250, 1995.

LEUTENEGGER, C. et al. Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using TaqMan fluorogenic real-time detection system. **J Virol. Methods** , v. 78, p. 105-116, 1999.

LO S.C. Mycoplasmas and AIDS. In: MANILOFF J, MCELHANEY RN, FINCH LR, BASEMAN JB, eds. **Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington, DC: American Society for Microbiology. p. 525-545, 1992.

LOUGHNEY, K et al. Ribosomal RNA precursors of *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Res**, v. 11, n. 19, p. 6709–6721, 1983.

LUMB, W. V. Canine haemobartonellosis and its feline counterpart. **Calif Vet**, v. 14, p. 24, 1961.

LURIA, B.L. et al. Prevalence of infectious disease in feral cats in Northern Florida. **J Fel Med Surg**, v. 6, p. 287-296, 2004.

MACIEIRA, D.B et al. Hemoplasmas in domestic cats and possible assoassociation to feline immunodeficiency virus (FIV) and/or feline leukaemia virus (FELV) in naturally infected animals. **Vet Clin Path**, v. 35, n. 3, p.368, 2006.

MACIEIRA, D.B.; DE MENEZES, R.C.; DAMICO, C.B.; ALMOSNY, N.R.; MCLANE, H.L.; DAGGY, J.K.; MESSICK, J.B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro, Brazil. **J Fel Med Surg**, v. 10, n. 2, p. 120-129, 2008a.

MACIEIRA, D.B.; MENEZES, R.C.A.A.; DAMICO, C.B.; ALMOSNY, N.R.P.; MESSICK, J.B. Uso das técnicas de southern blot/hibridização em associação à reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico das infecções pelos hemoplasmas felinos (*Mycoplasma haemofelis* e ‘*Mycoplasma haemominutum*’) em gatos domésticos. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 2008, Curitiba. *Anais...Curitiba: CBPV*, 2008b. 1CD-ROM.

MAEDE, Y. Studies on feline Haemobartonellosis. V. Role of the spleen in cats infected with *Haemobartonella felis*. **Jpn J Vet Sci**, v. 40, p. 141-146, 1978.

MAURIN, M. et al. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. **J. Clin. Microbiol**, v. 32, p. 1166–1171, 1994.

MCNAUGHT, J. B., WOODS, F. M., SCOTT, V. Bartonella bodies in the blood of a nonsplenectomized dog. **J Exp Med**, v. 62, p. 353–358, 1935.

MENDES-DE-ALMEIDA, F. et al. Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus*, Linnaeus, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 46, n.5, p. 269-274, 2004.

MESSICK, J.B. et al. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by Restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol**. v. 36, p. 462-466, 1998.

MESSICK, J.B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Vet Clin Pathol**, v. 33, p. 2-13, 2004.

MIDDLETON, D. J., MOORE, A. S., MEDHURST, C. L. Haemobartonellosis in a dog. **Aust Vet J**, v. 59, p. 29-31, 1982.

MILES, R.J. Cell nutrition and growth. In: MANILOFF J, MCELHANEY RN, FINCH LR, BASEMAN JB, eds. *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1992, p. 23-40.

MIYAZAWA, T. & JARRET, O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenemic but non-viremic ('discordant') cats. **Arch. Virol**, v. 142, p. 323-332, 1997.

MOULDER, J.W. Order I. Rickettsiales. In: BUCHANAN RE, GIBBONS NE, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore, MD: The Williams & Wilkins Co; 1974. p 882-890.

NEIMARK, H. & KOCAN, K.M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a Mycoplasma. **FEMS microbial Lett**, v. 156, p. 287-291, 1997.

NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus Mycoplasma haemofelis,' 'Candidatus Mycoplasma haemomuris,' 'Candidatus Mycoplasma haemosuis' and 'Candidatus Mycoplasma wenyonii.' **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, p. 891-899, 2001.

NEIMARK, H. et al. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, p. 683, 2002.

NORTH, D. C. Fatal haemobartonellosis in a non-splenectomized dog – a case report. **J Small Anim Pract**, v. 19, p. 769–773, 1978.

OLSEN, G. J., WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB J**. v. 7, n. 1, p. 113-23, 1993.

PITCHER, D.G. & NICHOLAS, R.A.J. Mycoplasma host specificity: Fact or fiction? **Vet J**, v. 170, p. 300-306, 2004.

PRYOR, W. H. Jr. & BRADBURY, R. P. *Haemobartonella canis* infection in research dogs. **Lab Anim Sci**, v. 25, p. 566-569, 1975.

RAZIN S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). **Microbiol Rev**, v. 49, n. 4, p. 419-55, 1985.

REGNERY, R.L. et al. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, Human immunodeficiency virus-positive patient. **J Clin Microbiol**, v. 30, p. 265–274, 1992.

RELMAN, D.A. et al. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. **N. Engl. J. Med**, v. 323, p. 1573–1580, 1990.

RIKIHISA, Y. et al. Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and Comparison of 16S rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **J Clin Microbio**, v. 35, p. 823-829, 1997.

RISTIC, M. & KREIER, J.P. Hemotropic bacteria [editorial]. **N Engl J Med**, v. 301, p. 937-939, 1979.

ROZEN, S. & SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, p. 365-386. In S. Krawetz, S. Misener (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ. 2000

SARKAR, G. et al. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 7465, 1990.

SHANG, Advances in the study of eperythrozoonosis. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 15, n. 4, p. 234-40, 1994

SHANG, D.Q. An epidemiological investigation of eperythrozoon infection in human and animals. A Collaborative Research Group on Eperythrozoonosis. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v. 16, n. 3, p. 143-146, 1995.

SHAW, S.E. Haemobartonella and Bartonella : Two Very Different Diseases!. 28TH world congress of the world small animal veterinary association, Bangkok, Thailand, October 24 – 27, 2003. Disponível em <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6699&O=Generic> Acesso em 01 de março de 2006.

SCHOEMAN, T. et al. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. **J. S. Afr. Vet. Assoc**, v. 72, p. 4-11, 2001.

SHELTON, G.H. & LINENBERGER, M.L. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. **Semin Vet Med Surg (Small Anim)**, v. 10, p. 220-233, 1995.

SIMECKA, J.W. et al. Mycoplasma diseases of animals. In: MANILOFF J, MCELHANEY RN, FINCH LR, BASEMAN JB, eds. **Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 391-415, 1992.

SPLITTER, E.J. et al. Feline infectious anemia. **Vet Med**, v. 51, p. 17-22, 1956.

STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **Biotech**, v. 28, p. 1102-1104, 2000.

SYKES, J. E. Feline Hemotropic Mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)**, v. 33, n. 4, p. 773-787, 2003a.

SYKES, J. E., et al. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. **J Vet Int Med**, v. 17, p. 423, 2003b.

SYKES, J. E. et al. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. **J Am Vet Med Assoc**, v. 224, p. 1946–1951, 2004.

SYKES, J. E. et al. '*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 55, n. 1, p. 27-30, 2005.

SYKES, J. E. et al. Use of Conventional and Real-Time Polymerase Chain Reaction to Determine the Epidemiology of Hemoplasma Infections in Anemic and Nonanemic Cats. **J Vet Intern Med**, v. 21, p. 685–693, 2007.

SYKES, J. E. et al. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **J Am Vet Med Assoc**. v. 232, n. 3, p. 372-379, 2008.

TANAKA, H. et al. Fine structure of *Haemobartonella muris* as compared with *Eperythrozoon coccoides* and *Mycoplasma pulmonis*. **J. Bacteriol.**,v. 90, p. 1735–1749, 1965.

TAROURA, S. et al. Detection of DNA of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** v. 67, p. 1277-1279, 2005.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mycoplasmas in rheumatoid arthritis and other human arthritides. **J Clin Pathol**, v. 49, p. 781-782, 1996.

TASKER, S. et al. 16S rRNA comparison demonstrates near identity between an United Kingdom *Haemobartonella felis* strain and the American California strain. **Vet Microbiol**, v. 81, p. 73-78, 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. **Vet Rec**, v. 152, p. 193-198, 2003a.

TASKER, S. et al. Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: a International study. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3877-3880, 2003b.

TASKER, S. et al. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in cats in the United Kingdom. **Vet Rec**, v. 41, p. 439-441, 2003c.

TASKER, S. et al. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using real-time PCR assay. **J Fel Med Surg**, v. 6, n. 6, p. 345-354, 2004.

TASKER, S. et al. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. **Vet Microbiol**, v. 117, p. 169-17, 2006.

TIMENETSKY, J. et al. Identification of mycoplasma samples isolated from cell cultures by the growth inhibition test. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 1, 1992.

THOMPSON, J.D. et al. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 13, p. 2682-9260, 1999.

VANSTEENHOUSE, J.L. *Haemobartonella felis* infection with atypical haematological abnormalities. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 31, p. 157-159, 1995.

VELHO, P.B et al. Ocorrência de *Mycoplasma* sp. em felinos naturalmente infectados, pela avaliação esfregaços sangüíneos, em Niterói, RJ. In: **XV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA**, 2008, Curitiba. *Anais...*Curitiba: CBPV, 2008. 1CD-ROM.

WARDROP, K. J. et al. Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious Disease. **J Vet Intern Med**, v. 19, p. 135–142, 2005.

WATANABE, M. et al. Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific polymerase chain reaction (SS-PCR). **J Vet Med Sci**, v. 65, p. 1111-1114, 2003.

WEST, H.J. Haemobartonellosis in the dog. **J Small Anim Pract**, v. 20, p. 543-549, 1979.

WESTFALL, D.S. et al. Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **Am J Vet Res**, v. 62, n. 5, p.687-691, 2001.

WILLI, B. et al. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. **J Clin Microbiol**, v. 3, n. 6, p. 2581-2585, 2005.

WILLI, B. et al. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 961-969, 2006a.

WILLI, B. et al. Phylogenetic analysis of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **J Clin Microbiol**, v.44, n. 12, p. 4430-4435, 2006b.

WILLI, B. et al. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **J. Clin. Microbiol**, v. 45, p. 1159–1166, 2007a.

WILLI, B. et al. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 12, p. 3798-802, 2007b.

WILSON, K.H. et al. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol**, v. 28, p. 1942–1946, 1990.

WOODS, J. E., et al. Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **AJVR**, v. 66, p. 1008-1012, 2005.

WOODS, J. E. Attempted transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. **Am. J. Vet. Res**, v. 67, p. 494-497, 2006.

WOLF, M. et al. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma* (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 4, p. 871-875, 2004.

WOLFF, K. et al. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. **Theor Appl Genet**, v. 86, p. 1033-1037, 1993.

WRIGHT, I. G. The isolation of *Haemobartonella canis* in association with *Babesia canis* in a splenectomized dog. **Aust Vet J**, v. 47, p. 157-159, 1971.

YANG, D. et al., Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiol Infect**, v. 125, p. 421-426, 2000

YOGEV, D. & NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, p. 1084-1156, 1998.

ZULTY, J.C. & KOCIBA, G.J. Cold agglutinins in cats with haemobartonellosis. **J Am Vet Med Assoc**, v. 196, n. 6, p. 907-910, 1990.

ANEXO 1 – Comprovante de submissão do artigo 1 em revista científica

http://mc.manuscriptcentral.com/LongRequest/vcp?TAG_ACTION...

Below is a list of the files that were uploaded as well as a summary / cover page. Click on a file name to view the proof of that file. Files are listed in the order specified by the author.

Files Uploaded

[PDF#513760-54976472](#)

Other

[Cover & Metadata](#)

[Close Window](#)

Veterinary Clinical Pathology

An International Journal of Laboratory Medicine

Design, Optimization and Application of a Conventional PCR Assay with an Internal Control for Detection of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' 16S rDNA in Domestic Cats from Brazil

Journal:	Veterinary Clinical Pathology
Manuscript ID:	VCP-08-1132
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	09-Jul-2008
Complete List of Authors:	Santos, Andrea; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária Messaick, Joanne; Purdue University, Comparative Pathobiology Biondo, Alexander; Universidade Federal do Paraná, Departamento de Medicina Veterinária Oliveira, Simone; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária Pedrelli, Viviane; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária Lenta, Camilla; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária Lacerda, Luciana; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária Esteves, Vanessa; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária Hofmann-Lehmann, Regina; University of Zurich, Clinical Laboratory Wili, Barbara; University of Zurich, Clinical Laboratory González, Félix; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Patologia Clínica Veterinária
Key Words:	28S rRNA gene, Haemobartonellosis, Hemoplasma, Mycoplasma, PCR

 scholarONE™
Manuscript Central

ANEXO 2 – Comprovante de aceitação do artigo 3 em revista científica**Decision Letter (EID-08-0964.R1)****From:** eidchief@cdc.gov**To:** santos1@purdue.edu, deavet@gmail.com**Cc:****Subject:** Disposition for Manuscript # EID-08-0964.R1**Body:** 22-Aug-2008

Dear Dr. Santos:

We are pleased to inform you that your article "Haemoplasma Infection in an HIV-positive Patient in Brazil" has been accepted for publication in Emerging Infectious Diseases. The article will undergo substantive editing for length (our 1200 word length limit for dispatch papers has no flexibility), grammatical correctness, and journal style. The galleys will be sent to you for approval.

Thank you for sending us your article. We look forward to working with you in the months to come.

Dr. D. Peter Drotman
Editor-in-Chief
Emerging Infectious Diseases
eidchief@cdc.gov
404-639-1960 (phone)
404-639-1954 (fax)

<http://mc.manuscriptcentral.com/eid>

EID Editorial Board Comments to the Author:

EID readers place very low value on claims of primacy ("First case..."). We routinely delete all such claims in peer review or copyediting. EID readers are interested in disease emergence into new areas or populations and factors that influence emergence. We will instruct our copyeditors to edit this revision accordingly, without using the word "first."

Date Sent: 22-Aug-2008