



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA UNIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE RESIDÊNCIA

**Implicações da carga bacteriana de *Mycoplasma haemofelis* nos parâmetros
hematológicos de felinos naturalmente infectados**

THAIS RODRIGUES GUERRA

Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA UNIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Implicações da carga bacteriana de *Mycoplasma haemofelis* nos parâmetros
hematológicos de felinos naturalmente infectados**

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado
ao Programa de Residência Uniprofissional em
Medicina Veterinária, como parte das exigências
para obtenção do título de Especialista em Clínica
Médica em Animais de Companhia.

Residente: Thais Rodrigues Guerra

Orientadora: Profa. Dra. Arleana do Bom Parto
Ferreira de Almeida.

Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

G934i Guerra, Thais Rodrigues.

Implicações da carga bacteriana de *Mycoplasma haemofelis* nos parâmetros hematológicos de felinos naturalmente infectados / Thais Rodrigues Guerra. -- 2021 16 f. ; 30 cm.

Orientadora: Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida.

TCC (especialização em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, Cuiabá, 2021.

Inclui bibliografia.

1. hemoplasma. 2. felinos. 3. anemia. 4. *Mycoplasma haemofelis*. 5. qPCR. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM [NOME DO PPG]

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Implicações da carga bacteriana de *Mycoplasma haemofelis* nos parâmetros hematológicos de felinos naturalmente infectados

AUTORA: Médica Veterinária Residente Thais Rodrigues Guerra

Trabalho de Conclusão de Residência defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2021.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Doutora Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida (Presidente banca/orientadora)

Ins tuição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Daphine Ariadne Jesus de Paula (Examinador Externo)

Ins tuição: Thermofissher Scien fic)

Mestra Eveline da Cruz Boa Sorte Ayres (Examinador Interno)

Ins tuição: Universidade Federal de Mato Grosso

Mestra Mariana Elisa Pereira
(Examinador Suplente) Ins
tuição: Universidade Federal de
Mato Grosso Cuiabá, 19 de
fevereiro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Daphine Ariadne Jesus de Paula, Usuário Externo**, em 19/02/2021, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Eveline da Cruz Boa Sorte Ayres, Usuário Externo**, em

file:///C:/Users/thay_/Downloads/MESTRADO___Folha_de_Aprovacao_3259030 (2).html 1/2 09/03/2021 SEI/UFMT -
3259030 - MESTRADO - Folha de Aprovação



19/02/2021, às 18:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ARLEANA DO BOM PARTO FERREIRA DE ALMEIDA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 19/02/2021, às 19:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [h p://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=3259030](http://p://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=3259030) informando o código verificador **3259030** e o código CRC **BE40C086**.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus por ter me dado saúde física e mental para enfrentar todas as dificuldades. E ao Universo por emanar energia positiva e luz nessa caminhada.

A minha mãe e irmã pelo suporte e compreensão quando estive sob pressão e estresse nesses dois anos de residência. Eu tenho muita sorte em tê-las na minha vida.

Aos meus familiares e amigos, obrigada pela torcida desde as etapas de classificação da residência e por ainda estarem do meu lado nessa jornada.

Aos meus parceiros de residência da clínica médica e de todos os outros setores, muita gratidão pela paciência e pelos ensinamentos compartilhados, pode ter parecido pouco, mas para mim foi muito importante aprender e compartilhar conhecimento.

A todos os professores que contribuíram com ensinamentos e que foram muito importantes para minha formação. Em especial, as minhas tutoras da clínica médica de pequenos animais, professora Valéria Régia Sousa e a minha orientadora Arleana Ferreira pelo voto de confiança, pela paciência e pela generosidade em compartilhar conhecimento.

A todos os meus animais de estimação, vocês são a minha maior motivação para realizar o sonho de ser médica veterinária.

Gratidão!

Implicações da carga bacteriana de *Mycoplasma haemofelis* nos parâmetros hematológicos de felinos naturalmente infectados

Thais Rodrigues Guerra, Amanda Atsumo Funakawa Otsubo, Daphine Ariadne Jesus de Paula,

Valéria Régia Franco Sousa, Valéria Dutra, Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida

Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367 – Vila do Ipase, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

+ 55 (65) 36158662 thaywar24@gmail.com

Corresponding author: arleferreira@gmail.com

Av. Fernando Corrêa da Costa, 2367 – Vila do Ipase, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. +

55 (65) 36158662. Número de fax

Resumo:

Mycoplasma haemofelis é reconhecido como o mais patogênico das espécies de hemoplasmas que acometem felinos, podendo causar uma infecção aguda que leva a anemia hemolítica. Diante disto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a presença e a quantificação da carga bacteriana, através de PCR convencional e PCR quantitativo (qPCR), nas infecções naturais por *Mycoplasma haemofelis* em felinos e suas possíveis alterações hematológicas. Dos 147 felinos amostrados aleatoriamente do atendimento clínico de um hospital veterinário universitário, 42 (28.6%) foram positivos para infecção por *M. haemofelis*. A concordância entre o PCR convencional e o qPCR foi considerada substantiva ($k = 0.6$). As fêmeas apresentaram um risco 2 vezes maior de adquirir a infecção (OR 2.31). Não foi observada associação estatisticamente significativa ($p > 0.05$) nos parâmetros hematológicos e carga bacteriana média dos felinos infectados. Conclui-se que a infecção por *M. haemofelis* esteve presente em felinos com e sem sinais, não sendo associada aos níveis da carga bacteriana sanguínea circulante. A associação de PCR convencional com o PCR quantitativo possibilitou detectar a infecção por *M. haemofelis* em um número maior de felinos.

Palavras-chave: hemoplasma; felinos; qPCR; anemia.

Introdução

Mycoplasma haemofelis é o agente causador da anemia infecciosa felina (AIF) e juntamente com *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMt)^{1 2} e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum-like*’ (Mhp-like)³ representam as espécies de micoplasma que acometem os felinos^{1 2}. Apesar da forma de transmissão não estar completamente elucidada, sugere-se a participação de vetores artrópodes, assim como a transmissão por mordidas e brigas.⁴

Após a infecção, as bactérias se aderem à superfície das hemácias ocasionando sua destruição e consequente anemia hemolítica em diversos mamíferos, dentre eles o felino doméstico⁵. No entanto, estudos demonstraram anemia com maior intensidade nas infecções agudas por *M. haemofelis*, provavelmente devido à sua maior patogenicidade, na qual uma pequena carga do agente pode acarretar grandes perdas eritrocitárias e aumento de células brancas circulantes. Adicionalmente, a remoção mediada por anticorpos é parte da senescência

eritrocitária e fenômeno considerado normal. No entanto, a anemia hemolítica induzida pelos micoplasmas, amplificam a remoção mediada por anticorpos de eritrócitos envelhecidos ou danificados. Os achados hematológicos em gatos acometidos com micoplasmoses são: anemia hemolítica com intensa regeneração, resultando numa anemia macrocítica hipocrômica, policromasia e anisocitose excessiva, presença de corpúsculos de Howell-Jolly e precursores eritróides nucleados (metarrubríctos e rubríctos) ^{6 7 4}

Pode-se observar plasma ictérico, podendo, raramente, apresentar-se avermelhado em virtude de eventual hemólise intravascular. Quando ocorre desenvolvimento da anemia hemolítica imunomediada podem observar-se esferócitos em grande quantidade, bem como eritrofagocitose. A ausência de anisocitose ou policromasia acentuada pode sugerir infecções superagudas, com um período curto para resposta inflamatória ou infecção intercorrente com o vírus da leucemia felina, Vírus da Imunodeficiência Felina ou da Peritonite Infecciosa Felina. Além da anemia, os gatos infectados podem apresentar prostração, desidratação, inapetência e perda de peso.⁸

Devido a inabilidade de crescimento da bactéria em meio de cultura, o diagnóstico era baseado apenas na citologia de esfregaço sanguíneo, com sensibilidade reduzida.⁹ Contudo, os métodos moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), e a qPCR proporcionaram a detecção mais precisa de animais positivos, pois apresentam sensibilidade e especificidade elevada, permitindo obter o diagnóstico através do sequenciamento e da quantificação das amostras analisadas.¹⁰

Dentre os métodos moleculares, o PCR quantitativo permite a quantificação do DNA do hemoplasma na amostra em análise, o que pode ajudar na monitoração da resposta ao tratamento, já que o *M. haemofelis* podem estar presentes no sangue de gatos infectados por meses.¹¹ Portanto, a associação de técnicas moleculares possibilita identificar a carga infecciosa, a patogenicidade, a prevalência do agente em uma determinada população, além de ser uma ferramenta usada para avaliar a efetividade de um tratamento.^{4 12}

Diante disto, o objetivo desta pesquisa foi quantificar a carga bacteriana de *Mycoplasma haemofelis* em felinos naturalmente infectados e as possíveis implicações nos parâmetros hematológicos.

Materiais e Métodos

Gatos

No período de setembro de 2010 a setembro de 2012, felinos domésticos de diferentes raças, sexo e com idade superior a seis meses, provenientes do atendimento clínico do HOVETUFMT foram inseridos na pesquisa de forma aleatória, após prévia autorização dos tutores. O número amostral foi calculado utilizando prevalência de 12% ¹³ intervalo de confiança de 95% e erro aceitável de 5%, totalizando 147 animais, considerando população felina de 2000 gatos atendida no período de 2 anos no supracitado hospital. Informações referentes a idade, sexo, raça, suspeitas clínicas e sinais clínicos apresentados durante consulta foram obtidos do prontuário médico de cada felino.

Amostras biológicas e análise hematológica

Amostras de sangue (5mL) foram coletadas por punção da veia cefálica ou jugular e inseridos em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a 10%. A análise hematológica foi realizada no Analisador Hematológico Automático Poch – 100 iv Diff (Roche®), considerando anemia o valor de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos inferiores a 24%, 8 e 5, respectivamente.¹⁴ Adicionalmente, alíquotas de 1mL de sangue foram armazenadas em microtubos a -20°C até o momento dos testes moleculares.

Reação em Cadeia pela Polimerase convencional e quantitativo para *Mycoplasma haemofelis*.

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada pelo método fenol/clorofórmio.¹⁵ A presença de inibidores da PCR nas amostras de DNA foi testada empregando o gene GAPDH, com os oligonucleotídeos: GAPDHF (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDHR (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'), segundo protocolo de Birkenheuer et al. (2003). A quantificação de DNA foi determinada por absorvância com espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 em comprimento de onda de 260 e 280nm (luz UV), obtendo-se uma média de 77.7 ± 81.7 .

A PCR convencional e a qPCR para a detecção e quantificação do *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), foram realizadas utilizando dois oligonucleotídeos sintéticos, baseados na região 16S RNA: OH-OK (Mhf 5' ATGCCCCTCTGTGGGGGATAGCCG-3') e 00CR-r1 (5'ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTTCG-3') que amplificam uma região de 273pb.¹⁶ A PCR convencional foi realizada em um volume final de 25 µl, contendo 10ng DNA, 50mM MgCl₂, 10X Taq Buffer com 50 mM KCl, 1 mM dNTP, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 1 U de TaqDNA polimerase (Fermentas ®). A reação de PCR envolveu desnaturação inicial por 4 minutos à 94°C, 30 ciclos de 45 segundos para desnaturação à 94°C, 45 segundos de anelamento à 56,8°C e 45 segundos de extensão à 72°C, seguidos por um ciclo de extensão final por 5 minutos à 72°C em um termociclador (MyCycler-Biorad®). Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel agarose 2%, corados com gelRed (Biotium®) e observados em ChemiDoc™ XRS utilizando o software Image Lab™ Software e marcador de massa molecular de 100 pb de DNA Ladder™ (Fermentas ®).

Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e analisados pelo software EpiInfo 3.3.2 (CDC, Atlanta, EUA), empregando os testes de associação a análise do qui-quadrado ou exato de Fisher. A média das variáveis quantitativas foram analisadas pelo teste t de Student, considerando significativo $p \leq 0,05$

Resultados

Dentre os 147 felinos testados, em 42 (28.6% [IC 21.8-36.1]) foi detectado DNA de *Mycoplasma haemofelis*. A PCR convencional detectou 23 (15.6% [IC 10.2-22.4]) felinos positivos, já a detecção de DNA no qPCR ocorreu em 41 (27.9% [IC 20.4-35.4]) animais. A concorrência entre o PCR convencional e o PCR quantitativo foi considerada substantiva (k 0.6). Dezoito felinos foram positivos no qPCR e negativos no PCR convencional e apenas um animal foi positivo ao PCR convencional e negativo ao qPCR, com concordância entre.

Não foi observado correlação entre raça e idade em relação à infecção por *M. haemofelis*, no entanto as fêmeas apresentaram risco 2 vezes maior de adquirir a infecção (OR 2.31) (Tabela 1). A carga bacteriana média encontrada nos felinos infectados foi de 103.512.148 cópias/µl. Maior carga bacteriana média foi encontrada em felinos machos, sem raça definida

e na faixa etária entre sete e 24 meses (Tabela 1). Contudo, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 1. Prevalência e carga bacteriana média de *Mycoplasma haemofelis* em relação à raça, sexo e idade de felinos naturalmente infectados.

Variáveis	Positivo N (%)	Carga bacteriana cópias/ µl (média)	Negativo N (%)	P
Raça				
SRD	32 (77.2)	85.898.693	91 (86.7)	0.19
CRD	10 (23.8)	3.031.629	14 (13.3)	
Sexo				
Macho	33 (78.6)	79.293.922	53 (50.5)	0.003*
Fêmea	9 (21.4)	6.592.149	52 (49.5)	
Idade ≤ 6 meses				
	8 (19)	5.329.845	19 (18.1)	0.82
7 – 24 meses	20 (47.6)	116.885.762	43 (41)	
25 – 96 meses	10 (23.8)	29.077.846	33 (31.4)	
> 97 meses	4 (9.5)	716.564	10 (9.5)	

Quanto aos parâmetros hematológicos, anemia foi observada em apenas seis (14.3%) dos 42 felinos positivos para *Mycoplasma haemofelis*, e em 18 (17.14%) dos 105 felinos não positivos, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0.86$). A média dos parâmetros hematológicos dos felinos positivos e negativos para *M. haemofelis* estão inseridos na tabela 2.

Tabela 2. Média dos parâmetros hematológicos dos gatos com e sem infecção por *Mycoplasma haemofelis*.

Variáveis	Referência	Positivos (Média)	Negativos (Média)	P
Hematócrito (%)	24-45	31.86	32.6	0.32
Eritrócitos	5-10	6.9	7.1	0.29

Hemoglobina	8-15	10.26	10.46	0.35
Leucócitos Totais				
(x 10 ³ / µl)	5.5-19.5	16.77	18.82	0.22
Plaquetas				
(x 10 ³ / µl)	300-800	285.23	282.3	0.46
Proteínas Plasmáticas				
Totais (g/dL)	6.0-8.0	7.32	7.31	0.48
Carga bacteriana				
(cópia/ µl)	---	103.512.148		

A carga bacteriana média dos felinos positivos e anêmicos (47.139.035 cópias/µl) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos positivos não anêmicos (109.914.755 cópias/µl) (p=0.19).

Discussão

Infecções por *Mycoplasma* sp em gatos provenientes de abrigos na região do estudo já tem sido descrito, com prevalência de 8.4%¹⁷, inferior a prevalência de 28.6% encontrada nesta pesquisa analisando gatos proveniente de ambiente hospitalar com diferentes queixas clínicas. Vale ressaltar que nesta pesquisa, o enfoque foi para a espécie *M. haemofelis*, divergindo do estudo supracitado que pesquisou as três espécies de hemoplasmas que acometem gatos, *M. haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

A associação de duas técnicas moleculares, PCR convencional e PCR quantitativo propiciou detectar um maior número de gatos infectados, justificando o uso de técnicas mais sensíveis e específicas^{5 18} como a análise quantitativa pela PCR que já demonstrou ser capaz de detectar limites inferiores de 1 e 10 cópias de DNA / reação³ No entanto, um ponto que deve ser analisado na comparação de tais técnicas é o número de hemoplasmas circulante no sangue que pode levar a resultados alternados entre positivos e negativos da PCR, tal ciclismo pode ser devido ao sequestro de órgãos, mas não há evidência conclusiva para isso ainda identificada.¹⁹
²⁰Apesar disto, a concordância das duas técnicas foi considerada substantiva nesta pesquisa.

O não encontro de alterações significativas nas contagens de células brancas, plaquetas e proteínas plasmáticas totais tem sido descrita na infecção por hemoplasmas.²¹ Quando presentes cursam com leucopenia, por neutropenia ou linfopenia associadas a doenças

secundária que induzem a imunossupressão, estresse, como as retrovíroses^{3 5 9 22 23} predispondo a manifestação clínica da infecção por hemoplasmas em gatos. A infecção por retrovíroses foi descrita em apenas cinco felinos amostrados nesta pesquisa, três co-infectado com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e dois com o vírus da leucemia felina (FeLV).

O encontro de felinos fêmeas com um risco de adquirir a infecção duas vezes maior que os machos contradizem outros estudos^{3 21 23 24 25} que encontraram maior prevalência em gatos machos associando ao estilo de vida livre e comportamento mais agressivo desse gênero resultando em aumento da exposição e transmissão. Apesar de não significativo, vale ressaltar que maior porcentagem de gatos positivos eram adultos jovens de até 24 meses, contrapondo à associação já encontrada de maior prevalência em animais em idade adulta e idosos^{18 23}. Apesar de não encontrada uma associação estatisticamente significativa, a maior carga bacteriana encontrado em felinos machos, sem raça definida e na faixa etária entre sete e 24 meses explicase pelo maior número de animais nesses grupos, apesar da amostragem ter sido obtida de forma aleatória.

A anemia é a principal alteração clínica e laboratorial associada a infecção por hemoplasmas.¹⁸ O *M. haemofelis* possui como característica aderir-se nos glóbulos vermelhos, desta forma, causando lise dos eritrócitos e proporcionando um quadro clínico de anemia leve a grave e icterícia. O grau de anemia está associado a intensidade da infecção e também ao sistema imunológico do paciente.⁶ Contudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa na ocorrência de anemia e infecção por *M. haemofelis* nos felinos desta pesquisa. Este resultado já tem sido descrito na literatura.^{18 26 23 27 28} Apesar da infecção por *M. haemofelis* ter sido descrita como mais severa em comparação às outras espécies de hemoplasmas que acometem felinos^{29 21} tal afirmação não foi encontrada neste estudo, apesar da média de hematócrito ter sido inferior aos dos felinos não infectados. Adicionalmente, não foi encontrada associação entre níveis elevados de carga bacteriana e a presença de anemia. Pesquisas tem demonstrado infecção cíclica dos hemoplasmas, no qual o maior número de cópias atinge o pico circulante em 18 dias pós-infecção.¹⁹ Porém, a infecção natural dos felinos pesquisados impossibilita inferir a fase de infecção e sua associação com os níveis dos parâmetros hematológicos.

Conclusão

Conclui-se que a infecção por *M. haemofelis* esteve presente em felinos com e sem anemia, e embora a anemia seja uma das principais implicações da infecção por *M. haemofelis*,

neste trabalho não foi evidenciada essa associação aos níveis da carga bacteriana sanguínea circulante. A associação de PCR convencional com o PCR quantitativo possibilitou detectar a infecção por *M. haemofelis* em um número maior de felinos.

Agradecimentos: A Comissão Nacional Residência Multiprofissional em Saúde (CNRMS) pela bolsa de estudo de Thais Rodrigues Guerra.

Referências

1. BERENT L. M.; MESSICK, J. B.; COOPER, S K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res*, 1998 Oct;59(10):1215-20.
2. NEIMARK, H.; JOHANSSON, K. E.; RIKIHISA, Y.; TRULLY, J. G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51:891–899.
3. WILLI B, Boretti FS, Baumgartner C, et al. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up infections caused by three feline haemoplasma species in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* 2006, Mar;44(3):961-9.
4. JENSEN, W. A.; LAPPIN, M. R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W. J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, Apr;62(4):604-8
5. BAKER, E. N. et. al. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. *Veterinary Microbiology*, 2010, Jan 6; 140(1-2): 167–170.
6. FERRAZ A, BARWALDT ET, PIRES BS, et al.. Micoplasmose em felino doméstico, FeLV (+), Relato de caso. *Vet. e Zootec.* 2020; 27: 001-007.
7. FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N. C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *American Journal of Veterinary Research*, 1998, Dec;59(12):1581-8.
8. WESTFALL, D. S.; JENSEN, W. A.; REAGAN, W. J.; LAPPIN, M. R. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and response to treatment with azithromycin. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, May;62(5):687-91.

9. GARDEN, Oliver A. KIDD, Linda, MEXAS, Angela M. CHANG, Yu-Mei, et. al. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2019, Mar;33(2):313-334.
10. SYKES, J. E.; TERRY, J. C.; LINDSAY, L. L.; OWENS, S. D. Prevalence of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2008, Feb 1;232(3):372-9.
11. BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J Clin Microbiol.*, 2003. Sep;41(9):4172-7.
12. TASKER, S.; HOFFMANN-LEHMANN, R.; BELÁK, S. et al. Haemoplasmosis in cats: European guidelines from the ABCD on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2018, Mar;20(3):256-261.
13. TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. *In Practice*, 2006, 28(3).
14. MACIEIRA, D. B.; DE MENEZES, R. D.; 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. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2007, Apr;10(2):120-9.
15. JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
16. SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
17. WATANABE, M.; HISASUE, M.; HASHIZAKI, K.; et. al. Molecular Detection of *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ Infection in Cats by Direct PCR Using Whole Blood without DNA Extraction. *J. Vet. Med. Sci.* 70(10): 1095–1099, 2008.
18. MICELI, N G. GAVIOLI, F. A. GONÇALVES, L R. et al. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, 2013, v. 22, n. 3, p. 385-390.
19. GEORGES, K.; EZEOKOLI, C.; AUGUSTE, T.; SEEPERSAD, N.; POTTINGER, A.; SPARAGANO, O.; TASKER, S. A comparison of real-time PCR and reverse line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. *BMC Veterinary Research*, 2012, 8, p.

103.

20. TASKER, S.; BINNS, S. H.; DAY, M. J.; GRUFFYDD, T. J.; HARBOUR, D. A.; HELPS, C. R.; JENSEN, W. A.; OLIVER, C. S.; LAPPIN, M. R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factor for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. *Veterinary Records*, 2003.
21. DEAN, R.; Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2008, Aug;10(4):413-7.
22. BAUMANN, J.; NOVACCO, M.; RIOND, et al. Establishment and characterization of a low-dose *Mycoplasma haemofelis* infection model. *Veterinary Microbiology*, 2013, Dec 27;167(3-4):410-6.
23. MARTINEZ-DIAZ, V. L.; SILVESTRE-FERREIRA, A. C.; VILHENA, H.; PASTOR, J.; FRANCINO, O.; ALTET, L. Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2013, Oct;15(10):879-85.
24. BERGMANN, M.; ENGLERT, T.; STUERTZER, B.; HAWLEY, J. R.; LAPPIN, M. R.; HARTMANN, K.; Risk factors of different hemoplasma species infections in cats. *BMC Veterinary Research*, 2017, 13, 52.
25. DUARTE, A.; MARQUES, V.; Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2015, Jun;17(6):516-22.
26. FIRMINO, F. P.; AQUINO, L. C.; MARÇOLA, T. G.; et al. Frequency and hematological alterations of different hemoplasma infection with retrovirus co-infections in domestic cats from Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 2016, 36(8): 731-736.
27. WEINGART, C. TASKER, S.; KOHN, Barbara. Infection with haemoplasma species in 22 cats with anaemia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2016, Feb;18(2):129-36.
28. DIAZ-REGANON, D.; VILLAESCUSA, A.; AYLLON, T. et al. Epidemiological study of hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in cats from central Spain. *Parasites & Vectors*, v. 11, p. 1-9, 2018.

29. GENTILINI, F.; NOVACCO, M.; TURBA, M. E.; et al. Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. 2009, Apr;11(4):277-85.