

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

PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NA
INFECÇÃO PELOS HEMOPLASMAS CANINO E FELINO EM CÃES NO HOSPITAL
VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

STELLA DE FARIA VALLE

PORTO ALEGRE

2011

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

PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NA
INFECÇÃO PELOS HEMOPLASMAS CANINOS E FELINOS EM CANINOS
ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO

Autora: Stella de Faria Valle

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

Orientador: Félix Hilario Diaz González

PORTO ALEGRE

2011

CIP - Catalogação na Publicação

de Faria Valle, Stella
Prevalência, fatores de risco e alterações clínicas
e laboratoriais na infecção pelos hemoplasmas canino
e felino em cães do Hospital Veterinário da
Universidade de Passo Fundo / Stella de Faria Valle.
-- 2011.
91 f.

Orientador: Felix Hilário Diaz González.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2011.

1. micoplasmas hemotróficos . 2. reação em cadeia
da polimerase. 3. 'Candidatus Mycoplasma
haemominutum'. 4. Mycoplasma haemocanis. I. Hilário
Diaz González, Felix , orient. II. Título.

Folha de aprovação

Stella de Faria Valle

PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS NA
INFECÇÃO PELOS HEMOPLASMAS CANINOS E FELINOS EM CANINOS
ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO

Aprovada em: _____

APROVADO POR:

Prof. Dr. Felix Hilário Diaz González
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Maria Isabel Botelho Vieira – Universidade de Passo Fundo
Membro da Comissão

Profa. Dra. Nádia Almosny – Universidade Federal Fluminense
Membro da Comissão

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

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu porto seguro, que através do amor, carinho e apoio incondicionais sempre estiveram comigo na realização de todos os meus objetivos pessoais e profissionais. Amo todos vocês

Ao Geraldo, meu marido que sempre esteve ao meu lado incentivando, apoiando e auxiliando no que fosse necessário para conclusão dessa etapa. Te amo!!!

Aos meus sogros, Suzana e Sérgio que acreditaram em mim, obrigada pelo carinho.

Aos meus amigos de POA que mesmo distante estiveram comigo incentivando e entendendo as minhas aflições e angústias. A amizade verdadeira, a distância não separa queridos Luciane Giaretta, Adriane Almeida, Lisiane Brandalise e Paulo Galvão!

Ao meu grande amigo e colega Eduardo Ventura que sempre me incentivou, ponderou a minha ansiedade e apoiou nas decisões tomadas durante a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, Felix González, pela confiança, amizade e ensinamentos que foram importantes na condução desse trabalho e na minha carreira docente.

À minha orientadora Joanne B. Messick, que me acolheu e orientou na condução do presente trabalho. Também, ao exemplo de dedicação e comprometimento a medicina veterinária os quais foram especiais durante a minha temporada em Lafayette, IN.

Às queridas Andréa Pires dos Santos e Ana Márcia Sá Guimaraes que não mediram esforços para auxiliar na condução do experimento na Purdue University.

Aos meus colegas do Curso de Medicina Veterinária da UPF, em especial a amiga Heloísa Barcellos, Luiz Carlos Kreutz, Leonardo Barcellos, Leonardo Alves, Maria Isabel Vieira, Carlos Bondan, Elci Dickel, Luciana Ruschel e Maurício Brun que sempre incentivaram e apoiaram na condução do curso de doutorado. Sinto muito orgulho de fazer parte dessa equipe na construção da excelência no ensino da Medicina Veterinária.

À minha querida equipe do Laboratório de Análises Clínicas (melhor laboratório do HV) que entenderam a minha ausência e auxiliaram na rotina do laboratório com muita dedicação, responsabilidade e comprometimento. Obrigada a todos, em especial a Fabiana Lima, meu braço direito; Naila Duda e Mirian Scalon, minhas ex-estagiárias,

ex-bolsistas e agora residentes. Também a Monique Lorenson, Karen Moretti e aos estagiários Marcos Arcari e Wesley Maia.

Aos médicos veterinários técnicos e residentes do HV-UPF que indiretamente auxiliaram na obtenção das amostras e das informações para realização desse estudo.

À toda querida equipe do LACVET-UFRGS pelo carinho sempre dispensados.

Aos meus alunos do Curso de Medicina Veterinária, em especial a XXI turma de Medicina Veterinária da UPF que carinhosamente acreditaram na minha capacidade profissional propiciando auto-estima e confiança na minha carreira docente. Obrigada pela homenagem!

EPÍGRAFE

“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam mas há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre.”

Cecília Meireles

**PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS
NA INFECÇÃO PELOS HEMOPLASMAS CANINOS E FELINOS EM
CANINOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE
DE PASSO FUNDO**

Autora: Stella de Faria Valle

Orientador: Félix Hilario Diaz González

RESUMO

Os micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas) são organismos pleomórficos, epicelulares, gram negativos que infectam a superfície dos eritrócitos de diversas espécies. Devido ao fato de ser incultivável em meios de cultura tradicionais, o diagnóstico é baseado em técnicas moleculares. Em cães, a infecção pelos hemoplasmas pode causar anemia hemolítica na fase aguda, enquanto na doença crônica os sinais são inaparentes, sendo que a imunodepressão e a esplenectomia podem desencadear a doença aguda. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a prevalência dos hemoplasmas em cães submetidos a atendimento clínico e cirúrgico no Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (HV-UPF), identificar os fatores de risco para infecção pelos hemoplasmas e as condições clínicas na infecção natural. Para isso, foram selecionadas amostras de sangue com EDTA submetidas com propósito diagnóstico ao Laboratório de Análises Clínicas do HV-UPF. Após a verificação do controle da extração (PCR para o gene GAPDH), as amostras foram encaminhadas ao Department of Comparative Pathobiology, Purdue University (IN, USA) para as análises moleculares. Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) para os hemoplasmas felinos (*'Candidatus Mycoplasma turicensis'*, *'Candidatus Mycoplasma haemominutum'*) e caninos (*Mycoplasma haemocanis* e *'Candidatus Mycoplasma haematoparvum'*). Ao total, foram analisadas 347 amostras, sendo que 16 foram negativas para o controle GAPDH e excluídas do estudo. A prevalência para hemoplasma foi de 6,4% (21/331) sendo 5,1% (17/331) para *Mycoplasma haemocanis* e 1,8% (6/331) para um organismo geneticamente semelhante ao hemoplasma felino *'Candidatus Mycoplasma haemominutum'*. Não foram encontradas amostras positivas para *'Candidatus Mycoplasma turicensis'* e *'Candidatus Mycoplasma haematoparvum'*. Os cães positivos para hemoplasmas tinham como fatores de risco a presença de ectoparasitas (carrapatos e/ou pulgas), idade avançada e habitavam em casa. Embora tenha sido identificada a presença de correlação entre as neoplasias e feridas causadas por brigas com outros cães e a infecção pelos hemoplasmas, tais resultados foram atribuídos a uma influência da idade e a presença de ectoparasitas. Não houve variações hematológicas e bioquímicas em decorrência da infecção pelo *Mycoplasma haemocanis*. Refere-se, no presente estudo, o primeiro estudo relacionando a frequência da infecção pelos hemoplasmas em cães no Brasil.

Palavras-chave: micoplasmas hemotróficos, reação em cadeia da polimerase,

'Candidatus Mycoplasma haemominutum', *Mycoplasma haemocanis*

Prevalence, risk factors, laboratorials findings on canine and feline hemoplasma infection in dogs from Veterinary Teaching Hospital at Universidade de Passo Fundo

Author: Stella de Faria Valle

Advisor: Félix Hilário Diaz González

ABSTRACT

The hemotropic mycoplasmas (haemoplasmas) are pleomorphic, epicellular and gram-negative organisms that do not grow in conventional culture media. The organisms infect the red blood cell surface of several species and nowadays the diagnosis is based on molecular techniques. In dogs, the acute infection causes severe hemolytic anemia, while in the chronic disease the clinical signs are unapparent. In addition splenectomy or immunosuppression may result in the acute disease. The aims of the present study were to evaluate the prevalence of haemoplasmas in dogs that were submitted to clinical or surgical procedures at the Veterinary Teaching Hospital of the University of Passo Fundo (UPF-HV), to identify the risk factors for infection and the clinical conditions of haemoplasma natural infection. EDTA blood samples that were submitted for diagnosis purpose at the Laboratório de Análises Clínicas of the HV-UPF were randomly selected and clinical data were obtained from the hospital database. After DNA extraction and the internal control, the samples were sent to the Department of Comparative Pathobiology at the Purdue University (IN, USA), School of Veterinary Medicine, for molecular analysis. A polymerase chain reaction (PCR) for feline haemoplasmas ('*Candidatus Mycoplasma turicensis*' and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*') and canine haemoplasmas (*Mycoplasma haemocanis* and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*') was performed. A total of 347 samples were analyzed, while 16 were negative for the control GAPDH and excluded from the study. The total prevalence was 6.4% (21/331), 5.1% (17/331) for *Mycoplasma Haemocanis* and 1.8% (6/331) for an organism genetically similar to feline '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and no samples were found positive to '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'. The haemoplasma positive dogs lived at private homes, are old and were in contact with ectoparasites (ticks and/or fleas). Although it was identified a positive correlation between neoplastic disease, wounds caused by dog fights and the haemoplasma infection, these results were attributed to the influence of age and the vector. Hematological and biochemical variations were not identified at *Mycoplasma haemocanis* positive samples. This is the first study related to the frequency of haemoplasma infection in dogs in Brazil.

Key words: hemotropic mycoplasma, polimerase chain reaction, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', *Mycoplasma haemocanis*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Árvore filogenética dos micoplasmas baseada no gene 16S rRNA .	15
FIGURA 2 –	Fotomicrografia eletrônica <i>Mycoplasma haemosuis</i>	16
FIGURA 3 -	Esfregaço de sangue periférico com organismos de <i>Mycoplasma haemocanis</i> (setas) na superfície dos eritrócitos de um cão doméstico (Wright-Giemsa, 1000x)	17

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1 - Potential risk factors for infection with hemoplasma species (<i>M. haemocanis</i> and ‘ <i>Candidatus M. haemominutum</i>) in dogs from Brazil	47
TABLE 2 - Clinical status, neoplasia and wound bite of sampled dogs and assessment of disease as risk factor for hemoplasma infection	48
TABLE 3 - Clinical characteristics of positive dogs by conventional PCR to <i>M. haemocanis</i> (Mhc) and ‘ <i>Candidatus M. haemominutum</i> ’ (CMhm) ...	50

ARTIGO 2

TABLE 1 - Hematologic parameters (median and range) from <i>M. haemocanis</i> (Mhc) positive and negative blood samples and hematological reference range	77
TABLE 2 - Biochemical parameters (median and range) in <i>M. haemocanis</i> (Mhc) positive and negative blood samples, number of dogs, and biochemical reference range.	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
	2.1 Histórico dos micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas)	14
	2.2 Fisiopatologia da infecção pelos hemoplasmas	18
	2.3 Micoplasmas hemotróficoem cães	19
	2.3.1 <i>Mycoplasma haemocanis</i>	19
	2.3.2 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ’	20
	2.3.3 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ’	20
	2.3.4 ‘ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ’	21
	2.4 Transmissão dos hemoplasmas em cães	22
	2.5 Diagnóstico dos hemoplasmas	23
	2.6 Fatores de risco para infecção pelos hemoplasmas	24
	2.7 Infecção em cães	27
	2.7.1 Infecção Aguda	27
	2.7.2 Infecção Crônica	28
	2.8 Prevalência mundial	28
	2.9 Prevalência no Brasil	30
	2.10 Patologia clínica	31
3	OBJETIVOS	33
	3.1 Objetivos gerais	33
	3.2 Objetivos específicos	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
	4.1 Artigo 1 - Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in Southern Brazil.	35
	4.2 Artigo 2 - Hematological and biochemical aspects of natural infection of dogs by <i>Mycoplasma haemocanis</i>	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7	ANEXO	91

1 INTRODUÇÃO

Os micoplasmas hemotrófico(hemoplasmas) vêm sendo estudados desde a década de 1950, quando se verificou que cães afetados por esses organismos poderiam manifestar os sinais clínicos da doença aguda, quando esplenectomizados ou a doença crônica assintomáticos. A importância da infecção foi verificada primeiramente nos Estados Unidos, onde um grupo de pesquisadores, utilizando cães como modelo experimental para pesquisas do choque hemorrágico, observaram resultados inconsistentes em decorrência de uma doença hemolítica aguda que os animais apresentavam (Kemming et al., 2004a, b). A partir desse momento, associado ao diagnóstico molecular, grupos de pesquisa americanos e europeus iniciaram os estudos moleculares dos hemoplasmas que afetam tanto os cães quanto outras espécies.

No Brasil, embora os estudos sobre o choque hemorrágico aparentemente não sofram interferência pela infecção, verifica-se que o estudo dos hemoplasmas, não somente no cão como em outras espécies, apresenta uma grande importância da identificação das espécies que afetam os animais para verificar o potencial zoonótico das hemoplasmoses, além de descobrir novas espécies e bem como a infecção cruzada. Com relação à espécie canina, atualmente, essa população tem apresentado um crescimento significativo principalmente em grandes cidades onde o convívio com os seres humanos é bastante próximo. Devido a esse comportamento, as possibilidades de transmissão dessas e de outras enfermidades infecciosas são superiores. A presença de vetores como as pulgas e carrapatos, potenciais transmissores, principalmente em locais de clima quente e a ausência de métodos eficazes de controle são fatores que devem ser considerados na possibilidade de os hemoplasmas serem zoonoses (SANTOS et al., 2008). O carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) é conhecidamente o principal fator de risco para transmissão da hemoplasmoze (SENEVIRATNA et al., 1973) e outras doenças transmitidas por vetores em caninos. No Brasil, observa-se com elevada frequência o vetor em todas as regiões do país, sendo que naquelas de clima seco o carrapato é mais prevalente.

No país, ainda se utiliza como meio de diagnóstico dos hemoplasmas e demais formas parasitárias sanguíneas, a detecção dos organismos nos esfregaços sanguíneos corados por corantes de rotina. Em decorrência do baixo custo do exame e da falta de laboratórios capacitados para tecnologias moleculares, o diagnóstico tem sido baseado em evidências clínicas, sendo que normalmente é confirmado com o tratamento

sintomático. Com os avanços e a popularização das técnicas moleculares de diagnóstico, há uma necessidade de disponibilizar aos centros de diagnóstico veterinário um protocolo padronizado para o diagnóstico dos hemoplasmas e dos demais hemoparasitas dos animais domésticos. Com o passar dos anos, a reação de polimerase em cadeia (PCR) tem se tornado uma técnica difundida e tem a vantagem de apresentar elevada especificidade e sensibilidade além de estar mais disponível no meio veterinário.

A maioria dos estudos de prevalência da infecção pelos hemoplasmas no Brasil está concentrada nas espécies que afetam os felinos. Em caninos, os estudos ainda não são suficientes para poder avaliar a prevalência, os fatores de risco e o potencial patogênico dos hemoplasmas. Um dos poucos estudos relacionou a presença do hemoplasma até então detectado em felinos, o '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' em 7 cães esplenectomizados utilizados em uma pesquisa científica (SANTOS, 2008). Os relatos de casos isolados foram nos estados do Paraná e Minas Gerais (De MORAES, et al., 2006; BIONDO et al., 2009), porém sem a determinação da composição filogenética do agente e comparação entre outros isolados de ocorrência mundial. Em um recente estudo (RAMOS et al., 2010) verificaram a caracterização genética dos patógenos transmitidos por carrapatos na região metropolitana do Recife, onde o *M. haemocanis* foi identificado em um pequeno número de animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico dos micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas)

Os micoplasmas hemotróficos são organismos pleomórficos, epicelulares, gram negativos que infectam e crescem na superfície dos eritrócitos de diversas espécies (LUMB, 1957; MESSICK et al., 2002; MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). O fato de possuírem como característica o não crescimento em meios de cultura convencionais fazem com que ocorra limitação das possibilidades de investigativas sobre o comportamento dos hemoplasmas (WILLI et al., 2007). A ausência de parede celular e flagelos, resistência à penicilina e sensibilidade às tetraciclinas são características importantes de tais agentes (RAZIN et al., 1998).

Primeiramente, os organismos foram classificados na ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, gênero *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, em decorrência do tamanho reduzido (menos que 1 μm), propriedades tintoriais e a possibilidade de serem transmitidos por artrópodes (MESSICK, 2004; WILLI et al., 2007). Entretanto, as características de ausência de parasitismo intracelular, resistência a penicilina, falta de flagelos, pequeno tamanho, falta de parede celular e sensibilidade às tetraciclinas apontavam uma suspeita de os organismos estarem intimamente relacionados à classe dos Mollicutes. Desta maneira, a análise filogenética da sequência do gene rRNA 16S transferiu os organismos do gênero *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* para a família Mycoplasmataceae, classe Mollicutes, gênero *Mycoplasma* (NEIMARK et al., 2001; MESSICK et al., 2002; TASKER et al., 2003), dando a eles a denominação de micoplasmas hemotróficos (NEIMARK et al., 2001). Nesse contexto, para identificar organismos que se ligam na parede dos eritrócitos foi incluído o sufixo “haemo” enquanto para aqueles que não foram completamente descritos, a designação de *Candidatus* (MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). Assim, a árvore filogenética dos micoplasmas foi modificada e adicionado o grupo dos hemoplasmas próximo ao *Mycoplasma fastidiosum*, através da avaliação filogenética que codificam para os genes rDNA 16S e RNase P RNA (*rnpB*) obtida através do seqüenciamento de 11 diferentes micoplasmas (PETERS et al., 2008). Adicionalmente, os hemoplasmas foram subdivididos em 2 grupos, o grupo haemofelis que contém *M. haemofelis*, *M. haemocanis* e o ‘*Candidatus M. turicensis*’; e o grupo haemominutum que contém o

'*Candidatus M. haemominutum*' e o '*Candidatus M. haematoparvum*' entre outros (Figura 1.).

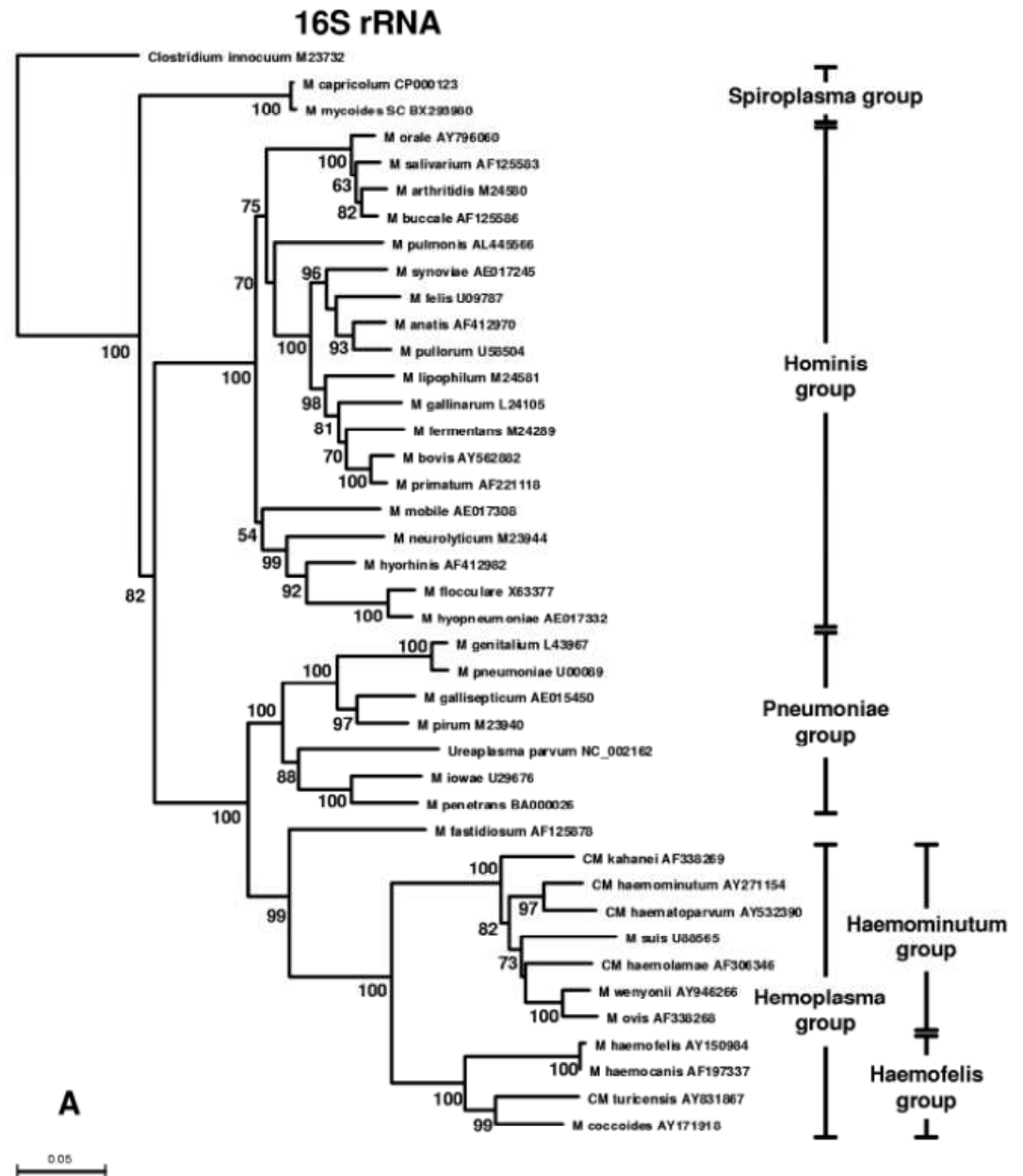


Figura 1. Árvore filogenética dos micoplasmas baseada no gene 16S rRNA.

Fonte: Peters et al., 2008.

Na microscopia eletrônica (Figura 2), o organismo pode aparecer fixado à superfície eritrocitária, preservando a integridade da membrana (BRINSON & MESSICK, 2001). Entretanto, durante a bacteremia, essa fixação ocasiona distorções no formato da célula levando a injúria celular através de mecanismos imunomediados (VENABLE & EWING, 1968). Outros mecanismos patogênicos da infecção pelos hemoplasmas ainda não estão completamente esclarecidos (MESSICK, 2004).

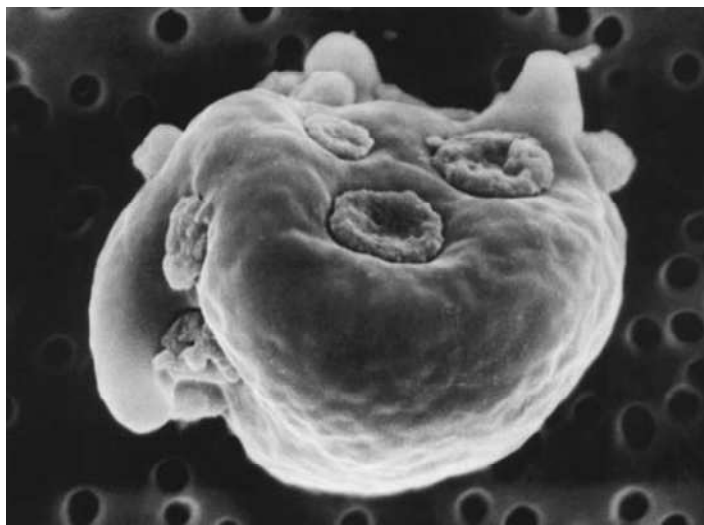


Figura 2. Fotomicrografia eletrônica *Mycoplasma haemosuis*

Fonte: Messick, 2004

Morfologicamente, no esfregaço de sangue periférico corado com corantes do tipo Romanowsky, os hemoplasmas podem ser observados na forma de cadeias que se estendem sobre a superfície eritrocitária (Figura 3) ou podem estar individuais como pequenas esferas, formato discóide ou em anéis (LUMB, 1957; HOSKINS, 1991).

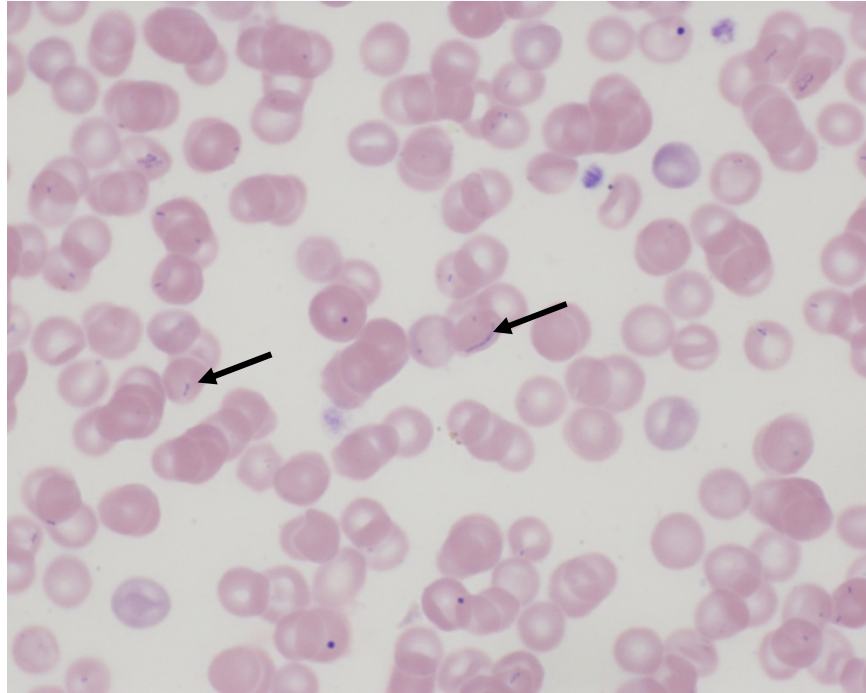


Figura 3. Esfregaço de sangue periférico com organismos de *Mycoplasma haemocanis* (setas) na superfície dos eritrócitos de um cão doméstico (Wright-Giemsa, 1000x).
Fonte: Joanne B. Messick, Purdue University, School of Veterinary Medicine.

Com o tamanho celular extremamente reduzido, o genoma dos hemoplasmas pode variar de 745 kb (*Mycoplasma suis*) a 1245 kb (*Mycoplasma haemofelis*) (BARKER, 2011). O seqüenciamento do genoma do *M. haemofelis* sugeriu que 21% dos genes eram designados para o transporte e metabolismo do organismo, enquanto outros poucos eram responsáveis para a proteção elevada contra estresse oxidativo e grande flexibilidade na síntese de aminoácidos. Um número considerável de genes determina as adesinas que são fundamentais para a sobrevivência do organismo, além de variáveis antígenos de superfície que defendem os micoplasmas das ações do sistema imune do hospedeiro (MESSICK, 2004).

Estudos recentes envolvendo a avaliação dos genomas do *Mycoplasma suis* e *Mycoplasma haemofelis* demonstram que ambos possuem genomas reduzidos para as rotas metabólicas e evidências para adaptação do ambiente sanguíneo. Os autores especulam que os hemoplasmas podem causar a doença através da remoção de nutrientes e competição com a célula parasitada, podendo levar à redução da meia-vida dos eritrócitos (MESSICK et al., 2011). As características metabólicas (MESSICK et

al., 2011; BARKER et al., 2011) desses organismos prejudicam a cultura *in vitro* fazendo com que os métodos de diagnóstico devam se basear em técnicas moleculares (TASKER et al., 2003).

2.2 Fisiopatologia da infecção pelos hemoplasmas

Os mecanismos da patogenicidade dos hemoplasmas ainda não estão bem elucidados. A fisiopatologia da infecção pelos micoplasmas pode envolver a produção de radicais livres pelo microrganismo, levando a um dano oxidativo na membrana celular do hospedeiro, secreção de enzimas que podem promover a ruptura tecidual e aberrações cromossômicas (MESSICK, 2004). Adicionalmente, a característica fastidiosa pode comprometer o equilíbrio celular, ocasionando danos e induzindo a doença no hospedeiro (RAZIN et al., 1998).

Os micoplasmas podem induzir reações imunes específicas, como a produção de anticorpos, no caso, pelos micoplasmas não hemotróficos. As reações imunes específicas exercem um papel importante no desenvolvimento de lesões e na exacerbação de doenças induzidas pelos micoplasmas. Durante a infecção, os micoplasmas podem afetar o sistema imune hospedeiro, induzindo a supressão ou a estimulação policlonal de linfócitos B e T; induzindo citocinas; aumentando citotoxicidade de macrófagos, células natural killer e células T, intensificação da expressão de receptores celulares e ativação do sistema do complemento. A capacidade para imunomodular a responsividade imune do hospedeiro contribui para as propriedades patogênicas dos micoplasmas e permite estabelecer uma infecção crônica persistente (RAZIN et al., 1998).

Normalmente os micoplasmas vivem em harmonia com a célula hospedeira e, portanto, raramente as infecções causadas serão fulminantes. No entanto, a associação da hemoplasmose latente com doenças imunossupressivas é, na maioria das vezes, fundamental para o desenvolvimento da doença aguda (MESSICK, 2004). Nesse contexto, a maioria das pesquisas está direcionada às espécies que afetam felinos e à associação dos hemoplasmas felinos com as doenças retrovirais como a imunodeficiência (FIV) e a leucemia felina (FeLV). A maioria dos autores sugere que a hemoplasmose no gato possa ser um modelo para o estudo da infecção pelos micoplasmas em humanos imunocomprometidos pela imunodeficiência causada pelo retrovírus (MESSICK, 2004; PETERS et al, 2008).

2.3 Micoplasmas hemotróficoem cães

Em caninos, os primeiros hemoplasmas a serem identificados foram o *Mycoplasma haemocanis* que anteriormente foi denominado de *Haemobartonella canis* da ordem Rickettsia (BRINSON e MESSICK, 2001) e o ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ (SYKES et al., 2004; SYKES et al., 2005). Após a difusão das técnicas de biologia molecular para o diagnóstico dos hemoplasmas, identificou-se o ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (de MORAIS et al., 2006; ZHUANG et al., 2009; OBARA et al., 2011) e o ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (SANTOS, 2008), que possuem características filogenéticas semelhantes às espécies descritas em felinos.

2.3.1 *Mycoplasma haemocanis* (*H. canis*)

É descrito desde 1928 na Alemanha, onde em um cão esplenectomizado verificou-se no sangue periférico a presença de organismos semelhantes à Bartonella (LUMB, 1957). Tais organismos eram pleomórficos aderidos à membrana com o formato de cocos individuais muito pequenos (0,25 a 1 µm) ou em cadeias agregadas retas, curvas, espirais, aneladas ou com o formato de arco de violino (VENABLE & EWING, 1968; MESSICK et al., 2002). Com distribuição mundial, até o presente momento, há descrição na Espanha (ROURA et al., 2010), Suíça (WENGI et al., 2008), Europa meridional (NOVACCO et al., 2010), França (KENNY et al., 2004), África (BARKER et al., 2010), Índia, Peru, Venezuela, Estados Unidos (BRINSON & MESSICK, 2001) e Brasil (BIONDO et al., 2009) através da PCR convencional e PCR em tempo real.

Nos estudos filogenéticos do gene rDNA 16S, verificou-se uma íntima similaridade com o *M. haemofelis* (99,3% a 99,7% de similaridade), em que alguns autores sugeriram ser o mesmo organismo que poderia afetar tanto cães quanto gatos, já que a infecção cruzada havia sido verificada (LUMB, 1957; BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002). No entanto, o estudo do gene RNA RNase P (*rnpB*) entre os agentes identificou uma reduzida homologia (94,3 a 95,5%) e por isso puderam ser classificados como espécies distintas (BIRKENHEUER et al., 2002). Com base no gene RNA RNase P, alguns estudos já referem o realinhamento dos hemoplasmas na árvore genética (PETERS et al., 2008).

2.3.2 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum'

Foi detectado pela primeira vez em um cão com linfoma de células T após a esplenectomia e quimioterapia (SYKES et al., 2004; SYKES et al., 2005). Na comparação filogenética do gene rDNA 16S, os autores concluíram se tratar de um organismo muito semelhante ao 'Candidatus M. hemominutum' dos felinos (94%) e pouco relacionado ao *M. haemocanis* (77%). Como semelhança morfológica entre o 'Candidatus M. haematoparvum' e o 'Candidatus M. hemominutum', pode-se relacionar o tamanho reduzido (0,3 µm de diâmetro) e a ausência de cadeias de organismos dispostas na superfície dos eritrócitos (SYKES et al., 2005).

Um protocolo semelhante ao utilizado para verificação da diferença entre *M. haemocanis* e *M. haemofelis* (BIRKENHEUER et al., 2002) que envolve o seqüenciamento do gene RNase P (*rnpB*) foi aplicado para diferenciar ambos os hemoplasmas pequenos que afetam cães e gatos. Na avaliação do fragmento resultante desse ensaio, SYKES et al. (2005), verificaram homologia de 75% para o 'Candidatus M. haemominutum' e 65% para os isolados de *M. haemocanis*.

Em um estudo francês, Kenny et al. (2004) utilizando a PCR em tempo real para o diagnóstico dos hemoplasmas em cães, foi detectado reduzido número de cópias de DNA nos animais infectados pelo 'Candidatus M. haematoparvum' ($5,8 \times 10^2$ e $2,1 \times 10^3$ cópias/mL de sangue). Tal observação sugere que muitos cães positivos assintomáticos possam não ser diagnosticados através da PCR em tempo real ou convencional pela baixa bacteremia.

No Brasil, em Londrina, Paraná (DE MORAES et al., 2006), em um estudo com 145 cães, os autores observaram 7,5% dos cães (11/145) positivos para 'Candidatus M. haematoparvum', sendo que as cópias quando seqüenciadas apresentaram 85% de homologia para esse organismo e 96% para o *M. haemocanis*. Os autores sugeriram se tratar de uma nova espécie ou uma variação do *M. haemocanis* (BIONDO et al., 2009). No entanto, nenhum outro estudo foi conduzido para elucidar esse fato.

2.3.3 'Candidatus Mycoplasma haemominutum'

Juntamente com o *Mycoplasma haemofelis* foi classificado como agente causal da Anemia Infecciosa Felina, sendo o primeiro responsável por uma anemia hemolítica e o segundo, uma cepa menos patogênica. Anteriormente ao ano de 2005, tais organismos eram classificados de *Haemobartonella felis*, isolado Ohio e

Haemobartonella felis isolado Califórnia, com base nas características morfológicas. Com a avaliação da seqüência dos genes 16S RNA e *mnpB*, foram removidos no *Taxa* e reclassificados no gênero *Mycoplasma* (MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). A similaridade do gene 16S RNA entre ambos é de 83% (FOLEY & PEDERSEN, 2001).

A ocorrência do ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em cães foi verificada em Londrina, estado do Paraná (BIONDO et al., 2009), na Província de Guangdong, China (ZHUANG et al., 2009) e recentemente no Japão (OBARA et al., 2011). Através da PCR convencional para o gene 16S usando primers universais, o estudo chinês identificou 1 positivo entre 40 cães saudáveis. A seqüência do isolado apresentou 97 a 99% de similaridade com o ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 94 e 95% de similaridade com o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’.

Em gatos, foi sugerido que as pulgas (*Ctenocephalides felis*) fossem responsáveis pela transmissão tanto do *M. haemofelis* quanto do ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (WOODS et al., 2005). No entanto, em cães, ainda não existem estudos que sugerem o papel das pulgas na transmissão dos hemoplasmas em cães.

2.3.4 ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’

Essa nova espécie de hemoplasma foi recentemente descrita na Suíça sendo responsável por causar anemia hemolítica em gatos através da inoculação intravenosa de sangue infectado para um gato livre de patógenos (WILLI et al., 2005). Posteriormente, através de estudos moleculares, determinou-se se tratar de um organismo semelhante ao *Mycoplasma coccoides* e *Mycoplasma haemomuris*, ambos micoplasmas hemotróficos de roedores (WILLI et al., 2006).

Apesar de o ‘*Candidatus M. turicensis*’ nos felinos apresentar distribuição mundial, em cães, até o presente momento, há apenas um relato da identificação em 7/10 cães esplenectomizados assintomáticos pela técnica da PCR convencional otimizada para a detecção do hemoplasma em felinos (SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2009). No seqüenciamento do gene 16S, o organismo encontrado em cães revelou-se tratar de um organismo 98 a 100% similar àquele que infecta os felinos domésticos (SANTOS, 2008).

2.4 Transmissão dos hemoplasmas em cães

A transmissão natural do *M. haemocanis* no cão ainda não está completamente esclarecida. A infecção experimental do *H. canis* foi verificada em 1973 (SENEVIRATNA et al., 1973), quando se conseguiu transmitir a doença para um canino esplenectomizado através do carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*). Dessa forma, foi sugerido que o carrapato fosse o vetor da transmissão dos hemoplasmas para o cão (BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK, 2003; SYKES et al., 2004; MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). Até o presente momento, não existem estudos verificando o papel das pulgas na transmissão dos hemoplasmas em cães, assim como já foi verificado para hemoplasmas em felinos (HORNOK et al., 2010).

Em gatos, os estudos moleculares demonstraram a presença de DNA dos hemoplasmas '*Candidatus M. haemominutum*' e *M. haemofelis* em pulgas e fezes recolhidas de gatos (WILLI et al., 2007). Os autores defenderam que a avaliação da presença de hemoplasmas e organismos rickettsiais em carrapatos e pulgas é necessária para elucidar completamente o papel desses vetores na transmissão da doença no cão.

Outras formas de transmissão dos hemoplasmas foram descritas, mas até o presente momento, não há um completo conhecimento dos mecanismos que as envolvem. A transmissão iatrogênica, através de transfusões sanguíneas, pode ocasionar a transmissão do hemoplasma entre outros agentes para cães receptores (LUMB, 1957; Mc WILLIAMS & FURNEAUX, 1973; LESTER et al., 1995; MESSICK, 2003; MESSICK & HARVEY, 2011). O consenso do American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) determinou testes para cães doadores de sangue e a identificação do *M. haemocanis* pode ser realizada, pois a maioria dos cães infectados, assim como os gatos, não apresenta evidências clínicas da doença (WARDROP et al., 2005). A contaminação iatrogênica já foi sugerida em um canino com '*Candidatus M. haematoparvum*' (SYKES et al., 2004).

A presença de *Haemobartonella* no esfregaço sanguíneo de cães que receberam sangue de um cão infectado por via oral já foi relatada (LUMB, 1957) e considerou-se que a presença de lesões no trato gastrointestinal superior é facilitadora da infecção. Com relação à transmissão através do leite materno ainda não há comprovações. Ainda nesse aspecto, a ingestão acidental de sangue em brigas (SASAKI et al., 2008), além do

contato com secreções vaginais do estro não foram esclarecidas como fontes contaminantes até o presente momento.

Estudos experimentais para demonstrar a transmissão intra-uterina não obtiveram sucesso, embora haja evidências indiretas de que a transmissão intra-uterina possa ser possível (LUMB, 1957; KRAKOWKA et al., 1977; MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). Uma suspeita de transmissão transplacentária foi verificada em cães livres de patógenos com 6 dias de idade inoculados com vírus da cinomose e que apresentaram inclusões de *H. canis* 21 dias após a inoculação. Nesse caso, foi sugerido que os efeitos imunossupressores do vírus da cinomose foram determinantes para o desenvolvimento da hemoplasmosose nesses cães que supostamente adquiriram a infecção transplacentária (KRAKOWKA et al., 1977).

Na infecção pelos *M. haemocanis*, o período pré-patente após a injeção IV de sangue contaminado em caninos esplenectomizados é entre 1 ou 2 dias a 2 semanas ou mais (LESTER et al., 1995). Os sinais clínicos da infecção já foram identificados em até 9 semanas após o início do tratamento de hemangiossarcoma esplênico (esplenectomia, transfusão sanguínea e quimioterapia) em um cão (BRINSON & MESSICK, 2001). Nesse caso, o cão desenvolveu uma anemia persistente atribuída a uma infecção crônica.

2.5 Diagnóstico dos hemoplasmas

Durante a bacteremia, os organismos podem ser observados em esfregaços de sangue periférico, porém com reduzida especificidade e sensibilidade diagnóstica (CHALKER, 2005; BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK et al., 2004). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos hemoplasmas é consagrada como um teste padrão ouro desde que os esfregaços sanguíneos corados não são específicos e sensíveis para detecção na maioria das espécies. No caso do *M. haemocanis*, um tempo prolongado entre a coleta e a análise pode remover o agente da membrana eritrocitária, não sendo possível observar nos esfregaços sanguíneos. Em contrapartida, os resultados falso-positivos também podem estar evidentes, desde que artefatos de corante e corpúsculos de Howell-Jolly possam ser confundidos com o agente (KEMMING et al., 2004b). A PCR convencional e em tempo real tem sido amplamente utilizada com

elevada especificidade e sensibilidade, permitindo obter o diagnóstico e, através do sequenciamento do fragmento amplificado, comparar a composição filogenética dos hemoplasmas (KENNY et al., 2004; MESSICK, 2003).

Devido à intensa similaridade do gene 16S rDNA entre os hemoplasmas caninos e felinos, para a amplificação do agente em caninos são utilizados os mesmos oligonucleotídeos (*primers*) para a detecção dos hemoplasmas felinos, sendo *M. haemofelis* para *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ (SANTOS, 2008; BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002; MESSICK et al., 2002).

2.6 Fatores de risco para infecção pelos hemoplasmas

Os primeiros estudos epidemiológicos dos hemoplasmas em cães começaram a ser publicados a partir do ano de 2004, a partir da difusão das técnicas moleculares de diagnóstico, como a PCR convencional e a PCR em tempo real. Ao passo que a maioria dos estudos demonstra uma prevalência reduzida de um dos hemoplasmas que afetam os caninos, até o presente momento, não houve como determinar os fatores de risco para infecção para cada hemoplasma isoladamente. Nos Estados Unidos, desde a verificação da interferência que o *M. haemocanis* ocasionava em pesquisas clínicas do choque hemorrágico em humanos, os estudos dos hemoplasmas nessa espécie começaram a ter maior relevância (PRYOR & BRADBURY, 1957, KEMMING et al., 2004a,b).

Com relação aos fatores de risco para infecção pelos hemoplasmas em cães, a maioria dos estudos refere uma relação significativa com a presença de carrapatos, considerando esse um dos principais fatores de risco (KENNY et al., 2004; WENGI et al., 2008; NOVACCO et al., 2010; ROURA et al., 2010). A importância do carrapato na transmissão da doença foi verificado por Seneviratna et al. (1973) e desde que a infecção experimental foi confirmada, a presença do carrapato tem sido incluída nos estudos populacionais de prevalência. Um único estudo realizado na Tanzânia e Trinidad e Tobago, onde a ocorrência do carrapato é comum, não se verificou a presença do carrapato como fator de risco para infecção pelos hemoplasmas na população estudada (BARKER et al., 2010).

Já foi verificado que o ambiente de vida dos cães pode interferir na infecção e na perpetuação da doença. As primeiras verificações do *H. canis* (*M. haemocanis*) em canis relacionavam cães portadores assintomáticos e que, a partir da esplenectomia, começavam a apresentar sinais de anemia grave e persistente, interferindo em resultados de pesquisa (KNUTTI et al., 1935; Mc NAUGHT et al., 1935; PRYOR & BRADBURY, 1975; KEMMING et al., 2004a). Em um estudo em cães de 3 canis comerciais e um grupo controle constituído de cães do Hospital Veterinário da Universidade de Illinois, verificou-se uma frequência significativamente superior da infecção pelos hemoplasmas em canis do que o grupo controle (60 cães), em que não houve positivos pela PCR (KEMMING et al., 2004b). A população constante e um maior risco de exposição aos vetores são aspectos importantes para a perpetuação do organismo nesse tipo de população. Cães que vivem em abrigos também são mais predispostos à infecção pelo hemoplasma. Em um estudo europeu, NOVACCO et al. (2010) identificaram correlação significativa entre a infecção pelos hemoplasmas e cães que viviam em abrigos. Nesse caso, os autores sugeriram que as más condições de higiene poderiam auxiliar na perpetuação do vetor.

As características metabólicas e biológicas dos micoplasmas em geral permitem que o organismo fique latente e que, no surgimento de afecções imunodepressoras, possa ser fundamental para o desenvolvimento dos sinais clínicos da doença (MESSICK, 2004). Afecções infecciosas ou não infecciosas concomitantes já foram identificadas em cães positivos para os hemoplasmas (PRYOR & BRADBURY, 1975; KRAKOWKA et al., 1977; GETILLAT, 1981; NOVACCO et al., 2010; ROURA et al., 2010). Cães traumatizados ou criticamente doentes podem manifestar imunodepressão em decorrência da ação das citocinas produzidas pelos macrófagos dos tecidos injuriados no sistema imune (PRYOR & BRADBURY, 1975; DATZ, 2010). As funções dos macrófagos, neutrófilos, células T são incompetentes, mas células B e resposta com anticorpos podem estar normais (DATZ, 2010). Baseado nesse contexto, a relação entre a infecção pelo parvovírus canino e a *H. canis* foi identificada e suspeitou-se que o vírus fornecesse condições favoráveis para a multiplicação dos hemoplasmas (GETILLAT, 1981). A infecção pelos vírus da cinomose também favoreceu a infecção em filhotes (KRAKOWKA et al., 1977) e a demodicose foi considerada um fator de risco para infecção na Europa mediterrânea (NOVACCO et al., 2010). Na Espanha, cães doentes apresentaram significativamente maior predisposição à infecção pelos hemoplasmas que os saudáveis (ROURA et al., 2010).

No Brasil, as co-infecções com a *Babesia gibsoni* (TRAPP et al., 2006) e o *Hepatozoon canis* (RAMOS et al., 2010) já foram identificadas, porém não existem estudos que comprovem a associação entre outros agentes transmitidos por vetores e a infecção pelos hemoplasmas. A co-infecção por agentes transmitidos por vetores foi identificada no Sudão, onde a co-infecção do *M. haemocanis* e do ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ com a *Ehrlichia canis* (4 e 16 casos, respectivamente) e *E. canis* com *Anaplasma platys* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, além de *E. canis*, *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ foi verificada (INOKUMA et al., 2006). Os autores sugeriram que a doença pode ser mais severa quando há a combinação de um ou mais organismos. Entretanto, nas co-infecções não há como determinar o papel do hemoplasma no favorecimento da infecção por outro agente transmitido por vetores.

Animais jovens podem apresentar a forma aguda podendo ser fatal em 3 ou 4 semanas de idade; já nos velhos, a forma crônica pode ser mais evidente (MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). Tanto na França (KENNY et al., 2004) quanto na Suíça (WENGI et al., 2008), a idade e a raça não foram identificadas como fatores de risco para infecção pelos hemoplasmas. No entanto, na Europa mediterrânea (Itália, Espanha e Portugal), os cães jovens e sem raça definida foram significativamente mais predispostos à infecção (NOVACCO et al., 2010). Essa variação de resultados nesse parâmetro pode ser atribuída a fatores como: baixo número de animais infectados nos dois primeiros estudos, perda de dados em amostragem de conveniência e as diferenças climáticas entre os países dos primeiros estudos, comparados à Europa mediterrânea, onde a presença do carrapato é mais freqüente. Já a correlação com os cães sem raça definida foi em decorrência da predominância de cães provenientes de abrigos do estudo da Europa Mediterrânea.

Na Tanzânia e em Trinidad e Tobago (BARKER et al., 2010), foi verificado que os machos eram mais predispostos a apresentar a infecção pelos hemoplasmas e isso foi atribuído ao fato de os cães com acesso livre às ruas poderem se infectar pelo contato com sangue infectado durante brigas. Apesar do contato com a saliva não ser confirmado como um fator de risco para infecção, cães da raça Tosa (cão de briga) foram mais predispostos a infecção no Japão (SAZAKI et al., 2008). Nesse caso, pode-se considerar a ingestão de sangue contaminado como fonte de infecção pelos hemoplasmas.

2.7 Infecção em cães

A importância da infecção pelos hemoplasmas no cão está na severidade da doença aguda, na possibilidade de estado de portador (MESSICK, 2004), na perpetuação do organismo em canis (KEMMING et al, 2004b) e na interferência dos resultados de pesquisa, quando o cão é usado como modelo experimental para o estudo de afecções em humanos (PRYOR & BRADBURY, 1975; BAKER et al., 1971; KEMMING et al., 2004a; MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). Outro fato a ser considerado é o potencial zoonótico que os hemoplasmas podem ter e que ainda não foi completamente esclarecido em nenhuma das espécies de hemoplasma.

Os sinais clínicos da infecção pelos hemoplasmas em cães são variáveis e a severidade da doença depende de fatores ainda não bem esclarecidos. Entre eles, pode-se referir à espécie infectante e à presença de doenças concomitantes ou infecções. As condições da maioria dos estudos (amostras de conveniência) não foram capazes de inferir a distinção entre os sinais de doença aguda e crônica (ROURA et al.,2010).

2.7.1 Infecção aguda

A infecção aguda geralmente é verificada em cães esplenectomizados (KEMMING et al., 2004a; BRINSON & MESSICK, 2001) e imunossuprimidos. Caso contrário, nas infecções concomitantes como babesiose (WRIGHT, 1971; TRAPP et al., 2006), erliquiose (INOKUMA et al., 2006), septicemias de origem não específicas (PRYOR & BRADBURY, 1975; KRAJE, 2001) e terapia imunossupressiva (HANDCOCK, 1989; HOSKINS, 1991; LESTER et al., 1995). Os sinais clínicos são variáveis e inespecíficos, onde pode estar presente a anorexia, letargia, perda de peso e febre (LUMB, 1957; LESTER et al., 1995; BRINSON & MESSICK, 2001; KEMMING et al., 2004a; MESSICK, 2004) ou apresentar prostração, anemia com temperatura retal e apetite normal (MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*) em cães experimentais. Cães não esplenectomizados que possuem a doença latente podem apresentar sintomas, quando houver a esplenectomia (MacWILLIAMS & FURNEAUX, 1973), em situações de estresse ou doenças concomitantes (LUMB, 1957; 2001). O baço tem um papel importante na proteção contra a infecção pelo *M. haemocanis*, uma vez que é responsável pela produção de determinados fatores que promovem um efeito inibitório nos hemoplasmas (LUMB, 1957).

Essa fase é caracterizada pela presença de sinais clínicos e uma bacteremia, verificada no esfregaço sanguíneo corado, que pode variar conforme os diferentes graus da doença (KRAJE, 2001). Uma anemia hemolítica severa também pode ser identificada na fase aguda da doença (BRINSON & MESSICK, 2001; KEMMING et al., 2004a; MESSICK, 2004; CHALKER, 2005; WENGI et al., 2008).

2.7.2 Infecção crônica

A infecção crônica pode ser verificada em cães não esplenectomizados, em que os sinais clínicos da doença são inaparentes (LUMB, 1957; MESSICK & HARVEY, *In press*) ou inespecíficos (HOSKINS, 1991; MESSICK, 2004). Anorexia, letargia, perda de peso e febre já foram observados em animais cronicamente infectados (CHALKER, 2005). A bacteremia é discreta e, por isso, os organismos podem ser encontrados na circulação em um número reduzido (MESSICK, 2004; KEMMING et al., 2004b). No entanto, se uma infecção concomitante ou esplenectomia ocorrer, os sinais clínicos passam a ser aparentes ou até mesmo os organismos passam a ser observados na corrente sanguínea (LUMB, 1957).

2.8 Prevalência mundial

A comparação entre os resultados provenientes dos estudos de prevalência no mundo é prejudicada, uma vez que as amostras são, na maioria, obtidas de cães de hospitais veterinários ou abrigos. Existe uma grande variabilidade na taxa de prevalência entre países do mesmo continente, que pode ser atribuída à condição geográfica e climática dos locais estudados (NOVACCO et al., 2010). No entanto, é relevante para o estudo dos hemoplasmas caninos conhecer a prevalência e o tipo de população mais suscetível, já que a infecção é inaparente e significativa apenas quando, por algum motivo, houver esplenectomia, imunodepressão ou estresse (MESSICK, 2003).

Na França, em um total de 460 amostras de sangue de cães, 71 (15,4%) foram positivas para os *Mycoplasmas* sp sendo que 44 (9,6%) para *M. haemocanis*, 15 (3,3%) para '*Candidatus M. haematoparvum*' e 12 (2,6%) para ambos. Embora, no estudo, os autores tivessem atribuído uma técnica específica da PCR em tempo real para a detecção dos hemoplasmas em cães, o organismo foi muito semelhante geneticamente

ao ‘*Candidatus M. haemominutum*’, já que o protocolo foi baseado na composição genética desse organismo. O estudo refere o primeiro relato do ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ na Europa (KENNY et al., 2004).

A baixa prevalência (1,2%) da infecção pelos hemoplasmas (WENGI et al., 2008) foi identificada na Suíça onde 0,9% (8/889) das amostras avaliadas foram positivas para *M. haemocanis*, e 0,3% (3/889) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ na PCR em tempo real. Os autores acreditam que a condição climática foi desfavorável para a sobrevivência do vetor, *Rhipicephalus sanguineus* (WENGI et al., 2008; NOVACCO et al., 2010; WILLI et al., 2010) e por isso houve uma reduzida frequência dos hemoplasmas. Nesse estudo, os cães positivos possuíam histórico de viagens para países de climas quentes e foi sugerido que a infecção tivesse sido adquirida nessa ocasião. Um reduzido número de produtos da PCR observado nos cães positivos para ambos os hemoplasmas, principalmente o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, foi a justificativa que os autores sugeriram para não haver maior sensibilidade no estudo.

Na Espanha, foram identificados 26/182 (14,3%) cães positivos para os hemoplasmas, sendo que apenas um foi positivo para o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, anteriormente apenas observado na França, Japão, Suíça e Norte da Tanzânia e Trinidad e Tobago (ROURA et al., 2010).

A avaliação da prevalência dos hemoplasmas na Europa mediterrânea identificou uma frequência significativamente superior em Portugal, onde 40% das 50 amostras de sangue de cães foram positivas para o *M. haemocanis*. O estudo concluiu que existe uma grande diferença da frequência dos hemoplasmas entre os países da Europa (NOVACCO et al., 2010; WILLI et al., 2010) em decorrência das condições geográficas.

Na China, através de 40 amostras de sangue de cães saudáveis, através da amplificação do gene 16S, foi detectada a presença de um hemoplasma que apresentava 99% de similaridade com o ‘*Candidatus M. haemominutum*’ dos felinos e 95% com o ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (ZHUANG et al., 2009).

Em Trinidad e Tobago e Tanzânia, onde o *R. sanguineus* é difundido, foram avaliadas a presença dos hemoplasmas em cães através da PCR em tempo real. Nas amostras de cães de vida livre na Tanzânia, 19% (19/100) foram positivas para *M. haemocanis* e apenas um cão foi positivo para ambos hemoplasmas. Já em Trinidad e Tobago, em amostras obtidas em um laboratório clínico, 4,9% (9/184) foram positivas

para *M. haemocanis*, 2,7% (5/184) positivas para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e 1,1% (2/185) positivas para ambos os hemoplasmas (BARKER et al., 2010).

Um estudo japonês verificou a infecção pelos hemoplasmas em canídeos silvestres, onde em 12 carcaças de raposas (*Vulpis sp*) analisadas, uma foi positiva para o *M. haemocanis*. Os autores sugeriram que o organismo pode ser transmitido entre cães e raposas através do mesmo vetor (SASAKI et al., 2008).

O primeiro estudo realizado para detecção de doenças transmitidas por carrapatos no continente africano evidenciou no Sudão que, dos 78 cães de vida livre amostrados, 63 eram positivos para *Ehrlichia canis* e 33 para os hemoplasmas *M. haemocanis* e/ou ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. Nos cães infectados pelos hemoplasmas, os autores verificaram que 3 apresentavam infecção simples, enquanto os demais apresentavam co-infecção pela *E. canis* ou *Anaplasma platys*. Os autores concluíram que a co-infecção pode causar uma doença severa e que o carrapato tem um papel importante nas co-infecções em cães (INOKUMA et al., 2006).

2.9 Prevalência no Brasil

Até o presente momento, não existem estudos de prevalência dos hemoplasmas caninos no Brasil, onde os relatos geralmente estão relacionados a estudo de casos isolados.

O *M. haemocanis* já foi descrito nas regiões sul e sudeste do Brasil (DANTAS-TORRES, 2008), onde o diagnóstico é baseado na observação dos organismos em esfregaços de sangue periférico, técnica pouco sensível e específica para o diagnóstico dos hemoplasmas. Recentemente no Recife, através de métodos moleculares para detecção de doenças transmitidas por vetores em cães, foi identificado um cão positivo para o *M. haemocanis* (RAMOS et al., 2010).

No Rio Grande do Sul, o primeiro registro de um cão positivo para *Haemobartonella canis* (*M. haemocanis*) foi em 1992 em Porto Alegre. Os autores não avaliaram a epidemiologia isolada desse agente, no entanto, dos 316 esfregaços analisados, 27% foram positivos para algum tipo de parasita sanguíneo (BRACCINI et al., 1992).

No estado do Paraná, em um grupo de 16 cães, foram encontrados quatro animais positivos para *Babesia gibsoni* (genótipo asiático), onde dois animais tinham

co-infecção por *M. haemocanis* (TRAPP et al., 2006). Através da PCR convencional, de amostras de 40 cães, foram identificados quatro cães não esplenectomizados infectados pelo *M. haemocanis* (de MORAIS et al., 2003).

O primeiro caso de hemoplasma pequeno em um cão (de MORAIS et al., 2006) e a co-infecção por *E. canis* foi detectado no estado do Paraná. Nesse caso, a sequência de nucleotídeos do gene 16S do agente tinha 97% de similaridade ao ‘*Candidatus M. haemominutum*’.

2.10 Patologia clínica

As alterações laboratoriais podem variar, dependendo do estágio da infecção. Na infecção aguda em cães, as alterações hematológicas comumente encontradas são: hematócrito reduzido (11%), anisocitose, presença de eritrócitos nucleados e policromasia. A presença de esferócitos, o resultado positivo no teste de Coombs (BUNDZA et al., 1976) e trombocitopenias podem ser observados (MESSICK, 2004). Ao contrário dos felinos, a maioria dos cães não esplenectomizados infectados com *M. haemocanis* não desenvolvem anemia ou apresentam um grande número de hemoplasmas no sangue (MESSICK, 2004; MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). Em caninos experimentalmente infectados, os sinais verificados foram anemia moderada, leucopenia e apatia (MESSICK & HARVEY, 2011, *In press*). No caso da infecção crônica, em que os sinais clínicos são inaparentes ou inespecíficos, as alterações hematológicas podem ser associadas com anemia moderada e leucopenia (BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK, 2004).

A anemia não regenerativa (perda de sangue ou eritropoiese inadequada), neutrofilia e trombocitopenia foi verificado em um cão, consistente com uma resposta ao estresse. Após a esplenectomia, o cão começou a apresentar uma anemia severa e bacteremia (MacWILLIAMS & FURNEAUX, 1973) já que os carreadores da infecção podem desenvolver anemia hemolítica em condições de estresse ou imunossupressão.

Nos Estados Unidos, uma síndrome caracterizada por febre, anemia e eosinofília foi detectada em cães não esplenectomizados submetidos a um leve estresse experimental. A eosinofilia foi direcionada a infecção pela *H. canis*, já que a presença de alérgenos e infecções foram descartadas nos testes de diagnóstico. Os autores

demonstraram a bacteremia em 3 de 6 caninos esplenectomizados (PRYOR & BRADBURY, 1975).

Em um estudo de prevalência suíço, não foi identificada uma associação estatisticamente significativa entre a infecção pelos hemoplasmas e a presença de anemia (WENGI et al., 2008), devido à reduzida prevalência (11/889). Embora em um estudo com uma prevalência superior (14,3%; 28/182), a relação entre a anemia e a infecção também não tenha sido significativa (ROURA et al., 2010).

Nas alterações hematológicas, a contagem de leucócitos totais não varia entre os animais infectados, no entanto, a contagem diferencial pode apresentar uma discreta diferença entre infectados e não. Na fase aguda, pode-se observar redução dos valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (LUMB, 1957).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a frequência dos hemoplasmas em caninos domésticos através da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) e correlacionar os fatores de risco para infecção e as alterações hematológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os fatores de risco para infecção dos hemoplasmas caninos e felinos em cães a partir de dados clínicos com auxílio da PCR;
- Verificar a presença de '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' em cães;
- Identificar a relação entre enfermidades que podem atuar concomitantemente com a infecção pelos hemoplasmas;
- Avaliar as alterações hematológicas e da bioquímica sérica em cães naturalmente infectados;
- Verificar as características clínicas dos cães infectados pelos hemoplasmas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão estão apresentados no formato de artigos científicos. Cada artigo foi redigido e formatado de acordo com as normas técnicas das revistas às quais serão submetidos. Cada subtítulo corresponde a um artigo.

ARTIGO 1

Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in Southern Brazil.

Será submetido à publicação no Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA).

ARTIGO 2

Hematological and biochemical aspects of natural infection of dogs by *Mycoplasma haemocanis*

Artigo submetido ao Veterinary Clinical Pathology Journal

4.1 Artigo 1

Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in Southern Brazil.

Stella de Faria Valle^{a*}; Joanne B. Messick^b; Andrea Pires dos Santos^c; Luiz Carlos Kreutz^d; Naila Cristina Blat Duda^e, Ahmed Mohamed^c, Alexander Welker Biondo^f; Félix Hilario Diaz González^g

^a DMV, MS, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo University, Campus I BR 285 Km I s/n, CEP 99010-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^b DMV, PhD, Dipl. ASVCP, Department of Comparative Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Purdue University, 725 Harrison Street, 47907, West Lafayette, IN, United States

^c DMV, PhD, Department of Comparative Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Purdue University, 725 Harrison Street, 47907, West Lafayette, IN, United States

^d DMV, PhD, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo University, Campus I BR 285 Km I s/n, CEP 99010-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^e DMV, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo University, Campus I BR 285 Km I s/n, CEP 99010-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil

^f DMV, PhD, Department of Veterinary Clinical Pathology, Federal University of Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Curitiba, Paraná, Brazil

^g DMV, PhD, Department of Veterinary Clinical Pathology, Veterinary Medicine Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author: Tel +55 (54) 3316-8485, Fax +55 (54) 3316-8163

E-mail address: stellavalle@upf.br (S. F. Valle)

This manuscript represents a portion of a thesis submitted by Dr. Valle to the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias as partial fulfillment of the requirements for a Doctor of Veterinary Sciences.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate prevalence of canine and feline hemoplasmas and risk factors to hemoplasma infection in dogs from Brazil with possible identification of influence of clinical status on hemoplasmas infection.

Design: cross-sectional study

Animals: 347 blood samples from household healthy and unhealthy dogs from Veterinary Teaching Hospital at Passo Fundo University (Southern Brazil) at moment of presentation.

Procedures: Complete clinical records were obtained from dogs admitted at the veterinary hospital by diverse reasons. A conventional PCR to *Mycoplasma haemocanis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ and

'*Candidatus M. turicensis*' were performed with an internal control by conventional PCR to canine GAPDH gene.

Results: The prevalence observed at the present study were 6.4% (21/331) to both hemoplasmas; 5.1% (17/331) to *Mycoplasma haemocanis* and 1.8% (6/331) to organism closely related with feline '*Candidatus M. haemominutum*'. The hemoplasma positive dogs were older, living in private homes and had contact with blood sucking arthropods as ticks or fleas. Neoplastic diseases and contaminated wound in consequence of dog fight were correlated with infection although the influence of age and ticks exposure could confuse the analysis result.

Conclusion and clinical relevance: the hemoplasma infection had a low prevalence in south Brazil and the frequency of '*Candidatus M. haemominutum*' was not according with previously European studies were the second detected hemoplasma more relevant is the canine hemoplasma '*Candidatus M. haematoparvum*'. The clinical course of both hemoplasma could not be determined at present study and the presumable low bacteremia could cooperate with low sensibility to detect the '*Candidatus M. haemominutum*' by conventional PCR.

Keywords: hemotropic mycoplasmas, *Mycoplasma haemocanis*, PCR assay

INTRODUCTION

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are pleomorphic, epicytellar bacteria that do not grow in conventional culture media. These organisms parasitize erythrocytes of several animal species (VENABLE & EWING, 1968; MESSICK & HARVEY, *in press*; WILLI, 2007). The hemoplasmas (formerly *Haemobartonella* and

Eperythrozoon) are classified within the class Mollicutes and the genus *Mycoplasma* based on 16S rRNA gene (NEIMARK et al., 2001; MESSICK et al., 2002; TASKER et al., 2003). In dogs, four hemoplasmas species have been described: *Mycoplasma haemocanis* (MESSICK et al., 2002), ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ (SYKES et al., 2004; SYKES et al., 2005), ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (de MORAIS et al., 2006; ZHUANG et al., 2009) and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ (SANTOS, 2008).

Mycoplasma haemocanis is found worldwide, having been first reported in 1928 in Germany (PRYOR & BRADBURY, 1975). Although it appears that ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ infection is widely distributed, both conventional and real-time PCR assays for this parasite might also amplify ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (KENNY et al., 2004; WENGI et al., 2008; NOVACCO et al., 2009; BARKER, 2010). To date, detection of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in dogs is limited to Brazil (de MORAES et al., 2008) and China (ZHUANG et al., 2009), whereas the detection of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ was found only in a recent report from Brazil (SANTOS, 2008).

Transmission of *Mycoplasma haemocanis* by the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) has been demonstrated experimentally (SENEVIRATNA et al. 1973). However, the role of this tick in natural transmission of *M. haemocanis* and other hemoplasmas that infect the dogs is unknown. Blood transfusions (Mc WILLIAMS & FURNEAUX, 1973; LESTER et al., 1995; MESSICK, 2003; HARVEY, 2006), splenectomy (LUMB, 1957; BUNDZA et al., 1976; MacWILLIAMS & FURNEAUX, 1973; LESTER et al, 1995; SYKES et al., 2004; SYKES et al., 2005), immunosuppression, concomitant clinical conditions (PRYOR & BRADBURY, 1975; KRAJE, 2001, de MORAES et al., 2006; TRAPP et al., 2006, NOVACCO et al, 2010)

and kennel-raised dogs (BAKER et al., 1971; PRYOR & BRADBURY, 1975; KEMMING et al., 2004a; KEMMING et al., 2004b) have been recognized as risk factors for *M. haemocanis* infection. The risk factors associated with ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ infection in dogs has not been investigated.

Severe anemia may occur following infection with *M. haemocanis*, but more typically, a chronic infection is established that is clinically unapparent. A chronically infected dog may develop overt disease if splenectomized or immune suppressed, and without appropriate treatment, might die (LUMB, 1957; BUNDZA et al., 1976; MacWILLIAMS & FURNEAUX, 1973; LESTER et al, 1995; MESSICK, 2004, KEMMING et al, 2004). Chronic infections also may be exacerbated by concurrent diseases such as ehrlichiosis (INOKUMA et al., 2006), babesiosis (WRIGHT 1971; TRAPP et al., 2006) and septicemia (PRYOR & BRADBURY, 1975; KRAJE, 2001; GREENE, 2006). Dysregulation of the immune response might explain development of opportunistic infections in some animals with the latent hemoplasmosis. There is a paucity of information about the clinical course of disease in dogs infected with ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’. Only one report is found in the literature of an infected dog with hemic neoplasia (SYKES et al., 2004) that developed clinical signs related to anemia and mild bacteremia. The clinical course of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ infection in the dog is unknown; cases in which infection has been described previously were in asymptomatic animals (SANTOS, 2008; ZHUANG et al., 2009).

The polymerase chain reaction (PCR) is exquisitely sensitive for detection of hemoplasma infection in dogs (MESSICK et al., 1998). The same primers used for the detection of *M. haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’

in cats have been successfully use to amplify the 16S rRNA gene of genetically related species in the dog (BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002; MESSICK et al, 2001). Although a real-time PCR assay was developed for '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', the assay specificity was not tested against '*Candidatus M. haemominutum*' (BAKER et al., 2010). Based on findings in our laboratory, it appears that cross-amplification between these species is possible (personal communications?). A conventional PCR assay previously developed for detection of '*Candidatus M. turicensis*' in the cat was used also to amplify this species from dogs (SANTOS, 2008).

The aim of the present study is to investigate the prevalence of hemoplasmas in dogs in Southern Brazil using the conventional PCR to four hemoplasmas species, to assess the risk factors for infection based on the clinical data and to molecularly characterize the hemoplasmas isolates.

MATERIALS AND METHODS

1. Sample collection

347 EDTA blood samples were collected from pet owned dogs at the moment of presentation to the Veterinary Hospital of the Passo Fundo University (HV-UPF) and submitted for routine hematologic analysis at the Laboratory of Veterinary Clinical Analyses. After the routine blood screening, EDTA blood samples were identified and aliquoted into microcentrifuge tubes and frozen at -20°C. The samples were collected between September 2008 until October 2009.

2. Medical records

The complete clinical data was obtained at the time of presentation and stored in a computerized database of HV-UPF. Information regarding breed, gender, type of living condition (apartment, house, kennel or farm), age, outdoor access (free or with the owner), history of the presence of fleas and/or ticks, reproductive history, contact with other animals (dogs, cats, horses and cows) and clinical status were obtained from owners.

3. DNA extraction and controls

DNA samples were extracted from 200 µL of anticoagulated whole blood and were eluted in 200 µL of elution buffer (Generation Capture Column, Qiagen, West Sussex, United Kingdom). Samples were stored at -20°C until tested. In the extraction process, a negative control (water) was included in every ten samples extracted. To check a presence of PCR inhibitors, a conventional PCR for the dog constitutive GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was performed on all DNA samples (BIRKENHEUER et al., 2003). Negative samples were excluded from the study.

4. Conventional PCR for the detection *Mycoplasma haemocanis* and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’

The PCR assays for canine hemoplasmas were performed at Purdue University (School of Veterinary Medicine, Department of Comparative Pathobiology) in all GAPDH positive samples. Initially, the samples were tested for *M.haemocanis* using the primers Mhf F1 (5' - GAC TTT GGT TTC GGC CAA GG - 3') and Mhf R3 (5' - CGA AGT ACT ATC ATA ATT ATC CCT - 3'), the same set used to detect feline hemoplasma *M. haemofelis*, a genetically closely related species (BRINSON &

MESSICK, 2001). Each reaction (25 µl) consisted of autoclaved ultrafiltered water, 1x Green GoTaq® Flexi Buffer (pH 8,5), 1.5 mM MgCl₂, deoxynucleoside triphosphates (dNTPs – dNTP Mix Promega, Madison, WI, USA) at a concentration of 0.2 µM, 1.25 U of GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) forward and reverse primers at a concentration of 10 µM each and template DNA (5 µL). Positive controls included DNA extracted from blood of naturally infected dog. Negative controls consisted of autoclaved ultra-filtered water and an extraction negative control. Cycling conditions were as follow: 95°C for 2 min, followed by 34 cycles of amplification (45 seconds at 94 °C, 30 seconds at 53 °C and 30 seconds at 72 °C), and final extension of 5 min at 72 °C in a Eppendorf Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY).

To detect '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', the PCR assay was performed using the same primers, forward Mt1 (5' – AGT ATT CGG CAC AAA CAA CT – 3') and reverse Mt2 (5' – CGC TCC ATA TTT AAT TCC AA – 3'), developed for the detection of this hemoplasma in cats (SANTOS et al., 2009). The reaction condition was the same as those described above for *M. haemocanis*. Positive controls included DNA extracted from blood of naturally infected dog. Negative controls consisted autoclaved ultra-filtered and water extraction negative control. Cycling conditions were as follow: 95°C for 2 min, followed by 29 cycles of amplification (45 seconds at 94 °C, 45 seconds at 55 °C and 45 seconds at 72 °C), and final extension of 5 min at 72 °C in a Eppendorf Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY).

The PCR products were subjected to 1.5% agarose gel for 1 hour at 100 V followed by ethidium bromide staining (1 µg/mL) and visualization of amplified products under UV light using Epi Chemi II Darkroom (UVP, inc., Upland, CA).

5. Conventional PCR for amplification of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'

Given phylogenetic similarity between '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', the PCR assay was performed using primer forward CAL 1 F1 (5' – GCA TAA TGT GTC GCA ATC – 3') and reverse CAL 1 R3 (5' – GTT TCA ACT AGT ACT TTC TCC – 3'); this primer set will amplify both of these hemoplasmas (SYKES et al., 2005). The reaction at final volume of 25 µL was the same describe above. Positive controls included plasmid obtained from DNA extracted from blood of naturally infected cat and negative controls consisted autoclaved ultra-filtered water extraction negative control. Cycling conditions were as follow: 95°C for 2 min, followed by 37 cycles of amplification (45 seconds at 94 °C, 45 seconds at 54 °C and 45 seconds at 72 °C), and final extension of 7 min at 72 °C in a Eppendorf Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY). If the presence of an amplified band was equivocal, 1µL of PCR products were reamplified using the same reaction conditions; thus the putative positive results were confirmed. Again, ultra-filtered autoclave water was included as a negative control to ensure that the absence of contamination during this process. The PCR reamplifications products visualized as described above.

To promote the differentiation between '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', the DNA from all positive and suspicious samples were subjected to a second PCR using the following primers: forward (LH F1 3'- AGC GTT CTG GGA AAC TAG AG – 5') and reverse (LH R1 GAC AAA CGA TAT CTA TCA CA), which are specific for the amplification of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (SANTOS, 2008). The reactions

conditions consisted of 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. Cycling conditions were as follow: one cycle of 95°C for 2 min, followed by 34 cycles of amplification (1 minute at 94 °C, 30 seconds at 53 °C and 44 seconds at 72 °C), and final extension of 7 min at 72 °C (Messick, et al., unpublished data). The thermocycler used and the evaluation of the PCR products was similar to that previously described for *M. haemocanis*.

6. Sequencing of 16S rRNA genes

To confirm the identity of PCR products, the complete sequence of 16S rRNA gene was obtained from positive samples to *M. haemocanis*. For this, the PCR using primers previously designed 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') was performed (SANTOS, 2008). The reactions conditions 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. Cycling conditions were as follow: one cycle of 95°C for 2 min, followed by 34 cycles of amplification (1 minute at 94 °C, 45 seconds at 53 °C and 1:30 min at 72 °C), and final extension of 10 min at 72 °C. The PCR products were subject the 1% agarose gel at same condition that has been describes above to hemoplasmas. The almost complete fragment of the 16SrRNA gene obtained was purified with Zymoclean Gel DNA

Recovery Kit (Zymo Research, Valencia, CA, USA) and submitted for sequencing at Purdue Genomics Core Facility at Purdue University, (West Lafayette, IN, USA).

7. Statistics

The prevalence and risk factors evaluations in this cohort study, PCR positive and negative dogs were considered. The categorical variables were compared between PCR positive and negative dogs using Pearson chi-square Test and exact Fisher's Test when the frequency of one those variables studied was between 1 and 5. The estimated *Odds Ratio* (95% confidence interval) was determined using Mantzel-Haenszel Test. The median of age between hemoplasma positive and negative dogs was performed using Mann-Whitney Test. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$. For all statistics, the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 15.0, 2006 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) was used.

RESULTS

1. PCR assays to hemoplasmas and prevalence of hemoplasma infection

Of the 347 tested samples, 16 were negative for GAPDH and therefore excluded from the study. Conventional PCR testing of the remaining 331 samples for hemoplasmas showed: 17 samples (5.1%) were positive for *M. haemocanis* alone and 6 samples (1.8%) were positive for either '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' or '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', whereas 21 samples (6.4%) were positive for *M. haemocanis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' or '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'.

Sequencing of partial 16S rRNA gene products that were amplified using the CAL 1 primer set, revealed 6 products had 97% to 98% (AY150974) and 94 to 95% (AY383241) identity to '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', respectively. The partial products were also compared with the *M. haemocanis* (AY150973) sequence, with an identification rate of 86 to 89% with the latter organism. The identity of these 6 products was also confirmed using a PCR specific for '*Candidatus M. haemominutum*'.

No positive samples were obtained for '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' and there were no coinfection of hemoplasmas in these dogs. All negative controls (extraction and reaction) tested were negative.

The sequence analysis of the 16S RNA gene of the two samples revealed 100% of sequence identity to *M. haemocanis* (EF416568).

2. Samples and risk factors to hemoplasma infection

The mean age of dogs in this study was 4.67 years (range = 16.97, min 4 months – max 17 years). The older dogs (7.16 years and range of 16.27) were significantly ($p < 0.05$) more susceptible to hemoplasma infection than the younger dogs (4.48 years and range of 15.42). Most dogs were female (65.5%) and purebred (65.5%), with no correlation between these factors and hemoplasma infection. Among those which were positive for hemoplasmas, 16 were female and seven were male; 10 were crossbred and 13 were purebred.

Risk factors that were significantly associated with hemoplasma infection included older age ($p < 0.005$), raised in private homes ($p < 0.005$) without outdoor access and with history of flea and tick exposure ($p < 0.005$). No significant association was observed between hemoplasma infection and the other variables (Table 1).

Table 1. Risk factors for hemoplasma infection in dogs living in Passo Fundo, southern Brazil.

Variables	Hemoplasmas positive	Hemoplasmas negative	Odds Ratio	95% IC	P value
<u>Vectors</u>					
Presence	5.4% (18/331)	41.1 (136/331)	4.553	1.648-12.576	p=0.003
Absence	1.5% (5/331)	52% (172/331)			
<u>Contact</u>					
Contact	6.5% (18/278)	81.3%(226/278)	0.785	0.174-3.542	p=0.753*
Non contact	0.7% (2/278)	11.5% (32/278)			
<u>Outdoor access</u>					
No access	2.7% (9/328)	47.3% (155/328)	1.607	0.675-3.825	p=0.283*
Outdoor access	4.3% (14/328)	45.7% (150/328)			
<u>Living conditions</u>					
Private homes	5.2% (17/330)	86.7% (286/330)	4.807	1.715-13.475	p=0.003*
Farm or kennel	1.8% (6/330)	6.4% (21/330)			
<u>Breed</u>					
Crossbreed	3.0% (10/331)	31.4% (104/331)	0.663	0.281-1.562	p=0.347*
Purebred	3.9% (13/331)	61.6% (204/331)			
<u>Gender</u>					
Male	2.1% (7/331)	32.3% (107/331)	1.217	0.486-3.049	p=0.676*
Female	4.8% (16/331)	60.7% (201/331)			
<u>Reproduction</u>					
Intact dog	6.7% (22/330)	85.8% (283/330)	0.536	0.069-4.150	p=0.550*
Neutered	0.3% (1/330)	7.3% (24/330)			

* Fisher Exact Test

With respect to the risk factors assessed in the present study, those dogs infested with fleas and ticks and living in houses were respectively 4.5 and 4.8 times more likely to have hemoplasma infection compared to those which did not have these risk factors.

While all samples tested for '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*' were negative, it was not possible to determine the risk factors in dogs in the present study.

3. Clinical status in hemoplasma PCR positive dogs

In the present study, the samples were collected from dogs admitted to the Veterinary Hospital for various reasons; 82.4% of the dogs were considered to be clinically ill based on their medical history and physical examination. However, no association was found between clinical status (unhealthy versus healthy) and hemoplasma infection in dogs ($p < 0.05$). Of 331 analyzed samples, 13.6% (45/330) had some type of neoplastic disorder; seven of these dogs (2.1%) were PCR hemoplasma positive. The association between the presence of neoplastic diseases and hemoplasma infection was determined to be significant. In the case of skin lacerations due to fighting, four hemoplasma positive dogs (1.2%) were identified, and the association between this and hemoplasma infection was not identified. (Table 2).

Table 2. Clinical status of sampled dogs and assessment of disease as risk factor for hemoplasma infection.

Variables	Hemoplasmas positive	Hemoplasmas negative	Odds Ratio	95% IC	P value
<u>Clinical conditions</u>					
Unhealthy	5.7% (19/331)	76.7% (254/331)	0.223	0.324-3.027	p=0.986*
Healthy	1.2% (4/331)	16.3% (54/331)			
<u>Neoplasia</u>					
Presence	2.1% (7/330)	11.5% (38/330)	0.323	0.125-0.836	p=0.020*
Absence	4.8% (16/330)	81.5% (269/330)			
<u>Wound bite</u>					
Presence	1.2% (4/331)	87.9% (291/331)	0.277	0.085-0.907	p=0.034*
Absence	5.7% (19/331)	5.1% (17/331)			

* Fisher Exact Test and Mantel-Haenszel Test.

One dog that was PCR positive dog for *M. haemocanis* had been splenectomized eight weeks prior to sampling due to splenic cancer. This patient had

normocytic, normochromic and non-regenerative anemia associated with chronic renal failure as a result of co-occurrence of glomerulonephritis and pyometra. *M. haemocanis* positives were also identified in immune suppressed dogs including i) a dog undergoing treatment with vincristine sulfate for a genital transmissible venereal tumor (Sticker Tumor), but showing no clinical signs of hemoplasma infection and a other dog having allergic dermatitis due to flea saliva on prednisolone for the control of itching at the time the positive result was obtained. Two positive bitches were pregnant, and despite the fact that one of them had a dystocia, both gave birth to healthy puppies. No organisms were seen on blood smears from infected dogs.

Of the positive samples, two were obtained from healthy dogs admitted to the Veterinary Teaching Hospital of Universidade de Passo Fundo and housed in separate kennels; however, they had contact with other dogs. Other diagnoses observed among hemoplasma positive dogs included canine eclampsia, trauma (hit by car), idiopathic epilepsy, demodicosis and suspected infection by canine distemper virus (Table 3.).

Table 3. Characteristics of positive dogs by conventional PCR to *M. haemocanis* and '*Candidatus M. haemominutum*'

Sample	Age (years)	Gender^b	Breed	Isolate	Diagnosis
06	6	F	Crossbreed	Mhc	Venereal transmissible tumor
38	9	F	Pinscher	CMhm	Mammary Adenoma
28 ^a	5	F	Crossbreed	Mhc	Trauma and Dystocia
42	2.9	F	Poodle	Mhc	Trauma
55	8	M	Crossbreed	Mhc	Mange
61	14	F	Crossbreed	Mhc	Ulcerated Mammary Neoplasm
69	10	F	Poodle	CMhm	Intervertebral Disc disease
120	1.8	F	Crossbreed	Mhc	Healthy
137 ^b	2	F	Crossbreed	CMhm	Dystocia
141	12.6	F	English Cocker Spaniel	Mhc	Pyometra
149	1.4	M	Poodle	Mhc	Bite wound
158 ^b	2	F	Chow-chow	CMhm	Pyometra
153	5	F	Golden Retriever	Mhc	Idiopathic epilepsy
203	17	M	Crossbreed	Mhc	Testicular tumor
207	6.9	M	Yorkshire	Mhc	Gastritis

211 ^b	7.2	F	Poodle	CMhm	Pregnancy
215 ^b	0.9	M	Belgian Shepherd	CMhm	Canine Distemper
258	3	F	Fox	Mhc	Puerperal tetany
282	6.3	F	Crossbreed	Mhc	Healthy
321	6.7	F	Shar-Pei	Mhc	Thoracic Mesothelioma
322	10	M	Crossbreed	Mhc	Wound Bite
331	10	F	Boxer	Mhc	Mast Cell Tumor
378	14	M	Crossbreed	Mhc	Perianal malignant neoplasm

^a samples that were obtained 16S RNA sequence.

^b CMhm samples was submitted do partial sequence analysis.

^c gender: F (female) and M (male).

^d Mhc (*M. haemocanis*) and CMhm ('*Candidatus M. haemominutum*')

Sample 42 bone trauma automobilist accident sample 141 was been submitted to splenectomy before pyometra

DISCUSSION

The aim of this study was to determine the occurrence of and risk factors for hemoplasma infection in domestic dogs of southern Brazil using conventional PCR. In addition, the study assessed the clinical status of naturally infected dogs and correlated the infection with some diseases that were probable risk factors for the infection. Most of the Brazilian studies published to date have investigated hemoplasma infection in swine (GUIMARAES et al., 2007), domestic cats (MACIEIRA et al., 2008)

and wild species (VIEIRA et al., 2009). While single case reports of hemoplasmosis in Brazilian dogs are found in the annals of meetings, this is the first in-depth investigation of *M. haemocanis* infection in dogs. In Brazil, *M. haemocanis* has already been detected in the states of Rio Grande do Sul and Minas Gerais by qualitative assessment using stained blood smear and southeastern region (Paraná, São Paulo and Minas Gerais) in asymptomatic non-splenectomized dogs by conventional PCR (BIONDO et al., 2009). Coinfection with *Babesia canis* and other vector-borne diseases was also observed (TRAPP et al., 2006). In all referenced studies, the analyzed populations were small, not allowing for the determination of risk factors. Recently, *M. haemocanis* has been reported in the state of Pernambuco, northeastern Brazil, in one out of 205 dogs (RAMOS et al. 2010).

In this study, the prevalence (6.4%) was lower compared with that obtained for southern France (WENGI et al., 2008), Mediterranean Europe (NOVACCO et al., 2010), northern Tanzania and Trinidad (BARKER et al., 2010) and Barcelona in Spain (ROURA et al., 2010); but higher compared with prevalence rates obtained for Switzerland (WENGI et al., 2008) and Japan (SASAKI et al., 2008). The difference between the prevalence rates obtained in the present study and in other studies is due to the geographic and climatic variation and to the type of sampled population. This fact had already been detected in Europe by NOVACCO et al. (2009) and this possibility has not been ruled out for Brazil because of the climatic variation across states, of which Rio Grande do Sul has the lowest temperatures. Because there are no other studies in Brazil, it is not possible to suggest that the low prevalence results from different climatic conditions, as verified in Europe. In consonance with that, lower winter temperatures have been suggested to be determinants of survival of the brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*) in given times of the year in the state.

In a study published by Kemming et al. (2004b), the frequency of *M. haemocanis* infection was significantly higher in kennel dogs due to the survival of the vector and the possibility of other modes of transmission (e.g. oral and transplacental). In our study, the low prevalence can be explained by the fact that dogs are kept in private homes and few of them were from kennels. Given that the present study was not designed with this purpose, we cannot state that kennel dogs are more susceptible to hemoplasma infection.

In China, ZHUANG et al. (2009) identified feline ‘*Candidatus M. haemominutum*’ by amplification of the 16S RNA gene using conventional PCR that had a 99% similarity to the agent reported for felines. In Brazil, the only report of an agent closely related to ‘*Candidatus M. haemominutum*’ was that of a dog in the state of Paraná (BIONDO et al., 2009). By comparing the sequences of ‘*Candidatus M. haemominutum*’ and of ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ published in the GenBank, there is a difference of 17 base pairs between them and some difficulty in precisely determining the agent involved only by the sequence of the 16S RNA gene. The fact that we obtained a partial sequence hindered our analysis. However, our partial fragment revealed 97-98% similarity to ‘*Candidatus M. haemominutum*’ isolated in felines and 94-95% with ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, allowing the identification of an organism similar to ‘*Candidatus M. haemominutum*’.

The reamplification of PCR products was useful in the present study for expanding the detection level of ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ and of ‘*Candidatus M. haemominutum*’ and detecting the presence of this species. Since these organisms have a low blood loads in the other species we hypothesized that the association with low bacteremia contributed to the necessity to use the reamplification. False-negative results were disregarded due to the fact that internal control was efficient in identifying

the presence of DNA in the samples. In the study, conventional PCR was not sensitive enough to detect both types of hemoplasma, suggesting that it is necessary to use a more sensitive molecular technique such as real-time PCR, as used in most studies for the detection of these hemoplasmas (KENNY, et al., 2004; WENGI et al., 2007; NOVACCO, et al., 2010; ROURA, et al., 2010). Nonetheless, we opted to use conventional PCR in our study because real-time PCR is not widely available in our setting.

The frequency of *M. haemocanis* infection was higher than that caused by a similar agent to '*Candidatus M. haemominutum*' (1.8%). In addition, there are no previous studies for comparison of these values because, as previously mentioned, this is the first report on the prevalence of hemoplasmosis in dogs in Brazil. Comparing the prevalence rates with that of the organism similar to '*Candidatus M. haematoparvum*', most studies report a lower prevalence rate than that of *M. haemocanis* (NOVACCO et al, 2010; ROURA et al., 2010; WENGI et al., 2008), except for KENNY et al. (2004), who found the contrary after using real-time PCR. In the present study, the lowest prevalence for the organism similar to '*Candidatus M. haemominutum*' can be attributed to the fact that the animals did not show any clinical signs of the disease and that they had low bacteremia. In dogs, '*Candidatus M. haematoparvum*' was detected by quantitative PCR in a smaller amount (5.8×10^2 and 2.1×10^3 copies of DNA/mL) than those found for *M. haemocanis* (33 to 5.2×10^5 copies of DNA/mL) in Switzerland (WENGI et al., 2008).

The prevalence of '*Candidatus M. turicensis*' in particular, cannot be elucidated in our study. Further studies must be conducted to explain the prevalence of this organism in dogs and evaluated the ways of transmission. The first report of '*Candidatus M. turicensis*' infection in dogs was observed in south Brazil by

conventional PCR in 7 of 10 splenectomized dogs (SANTOS, 2008). The sequence analysis of the PCR fragment was closely related with feline hemoplasma and further information about this infection in dogs was not explained.

The association between PCR-positive dogs and the contact with other animals, outdoor access, breed and gender was not observed in the present study. In line with later studies, the significant association between hemoplasma infection and exposure to the brown tick, fleas, or both was observed. The role of ticks in hemoplasma infection has been discussed since 1973 by SENEVIRATNA et al., and other studies has demonstrated that the presence of the tick is a risk factor for infection (ROURA et al, 2010). The information obtained from the clinical history of flea and tick infestation of dogs was not enough to determine whether flea infestation, as occurs with cats (HORNOK, et al., 2010), can be considered a risk factor for infection just as tick infestation is.

Even though in the present study a very small amount of dogs was from or lived in commercial kennels, there was a correlation between infection and living conditions. In our case, dogs living in private homes are more likely to have the infection, even if they have limited access to the street and little contact with other animals. However, this can be a favorable environment for the survival of the vector and for the dissemination of hemoplasma. This finding runs counter to other studies, which found a positive correlation between kennel living and hemoplasma infection (PRYOR & BRADBURY, 1975; KEMMING et al., 2004b; NOVACCO et al., 2010). Owing to the low prevalence obtained and to the fact that most dogs investigated in the present study lived in private homes, it was not possible to check the finding of these authors. To define which factor could be more of a determinant for infection, it would be necessary to include a population of kennel dogs.

Hemoplasma-positive dogs were older and this risk factor can be attributed to the higher exposure to the tick, in addition to lower immunity, as the percentage of B lymphocytes and the immune markers that decrease with age (DATZ, 2010). Unlike the finding of a previous European study (NOVACCO et al., 2010) in which the authors associated the fact that younger dogs were preferably infected by hemoplasma with more intense physical activity and with their provenance from kennels.

The clinical signs of hemoplasma infection are usually perceived when there is immunosuppression or after splenectomy (BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK, 2003; MESSICK & HARVEY, 2011). In the present study, no clinical signs associated with hemoplasma infection were observed. However, one splenectomized dog, due to spleen cancer, had persistent normocytic, normochromic and non-regenerative anemia related to chronic renal failure. One dog positive for *M. haemocanis* was being treated with vincristine sulfate for a transmissible venereal tumor and did not show clinical signs of infection.

The presence of diseases can be regarded as risk factor for hemoplasma infection (PRYOR & BRADBURY, 1975; KRAKOWKA et al., 1977; GETILLAT, 1981; ROURA et al., 2010) as in certain situations (trauma and critical diseases) there may be immunosuppression due to the action of cytokines produced by the tissues (DATZ, 2010). In our study, of the positive dogs, 21 had different diseases, but no significant association was found between the presence of non-infectious diseases and hemoplasma infection. In the case of co-infection by other tick-borne diseases, as verified by ROURA et al. (2010), there is a positive correlation with hemoplasmosis. Infections co-occurring with babesiosis (WRIGHT, 1971; KRAJE, 2001), *Hepatozoon canis* (RAMOS et al, 2010), ehrlichiosis and septicemias of nonspecific etiologies may

block the reticuloendothelial system leading to infection and to the appearance of clinical signs (LUMB, 1957; PRYOR & BRADBURY, 1975). However, in the present study, the presence of other tick-borne diseases was not investigated. Further studies are suggested to elucidate the role of co-infections in the pathogenesis of hemoplasma infection.

In an attempt to identify clinical conditions that support hemoplasma infection in dogs, the relationship between infection and the presence of skin lacerations resulting from fights between dogs was analyzed. This finding is consistent with a Japanese study, when most dogs (Tosa dogs) infected by hemoplasmas (25/37) had a history of fighting episodes (SASAKI et al., 2008). As with the lack of studies confirming the role of saliva in infection, our observation will be a confounding bias because the presence of ticks in dogs with skin lacerations was observed. This hypothesis was considered because, although the association was positive, the *Odds ratio* value regards the presence of fights as protection factor for hemoplasma infection.

Another clinical condition that could predispose to hemoplasma infection is the presence of neoplasias, both as a result of chemotherapy and of stress caused by chronic diseases or paraneoplastic syndromes, which reduce the number of immune defense cells. The statistical analysis showed that the diagnosis of cancer is a risk factor. However, as observed in the analysis of infection with skin lacerations, this correlation between infection and neoplasias may be influenced by age.

CONCLUSION

Our conclusion in the present study is that older dogs infested with fleas and ticks and which live in private homes are more susceptible to hemoplasma infection. Identification of the presence of arthropods in dogs confirms the assumption

that such vectors play an important role in the dissemination of infection. Contrary to what several studies demonstrated, environmental conditions, such as living in kennels, did not interfere with infection in our dogs. Nevertheless, it may be suggested that dogs which live in private homes without access to the street can be more easily contaminated by hemoplasmas. No dogs had clinical signs of hemoplasma infection, and clinical disorders are not risk factors for infection. Despite the association of dog fights and the diagnosis of neoplasias, neither factor was a risk factor as a consequence of a confounding bias that arose from the contact with arthropods and the age of dogs that must be evaluate in others studies. The present study also pointed out that conventional PCR might not be the best diagnostic method for ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ and ‘*Candidatus M. haemominutum*’ considering that real-time PCR is still necessary to determine the prevalence of these agents.

REFERENCES

1. Baker HJ, Cassell GH, Lindsey JR. Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. *Am J Path* 1971; 64: 625-632.
2. Baker EN, Tasker S, Day MJ, Warman SM, Woolley K, Birtles R, Georges KC, Ezeokoli CD, Newaj-Fyzul A, Campbell MD, Sparagano OAE, Cleaveland S, Helps CR. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ in dogs. *Vet Microbiol* 2010; 140: 167-170.
3. Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB, Alleman AR et al. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1385-1388.

4. 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: 4172-4177.
5. Brinson JJ & Messick JB. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1943-1945.
6. Bundza A, Lumsden BJ, McSherry VE et al. Haemobartonellosis in a dog in association with Coomb's positive anemia. *Can Vet J* 1976; 17: 267-270.
7. Datz, CA. Noninfectious causes of immunosuppression in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim* 2010; 40: 459-467.
8. de Moraes HSA, Dagnone AS, Trapp SM et al. Infecção com Mycoplasma Hemotrópico pequeno em um cão no Brasil (Small Haemotropic Mycoplasma infection in dog in Brazil), in *Proceedings. 23th ANCLIVEPA Brazilian Congress 2006, Vitória, Anais...CD ROM.*
9. Inokuma H, Oyamada M, Daboust B et al. Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in Eastern Sudan. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078: 461-463.
10. Kemming G, Messick JB, Mueller W, et al. Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old problem – New insight. *Eur Surg Res* 2004a; 36: 198-205.
11. Kemming G, Messick JB, Enders G, et al. *Mycoplasma haemocanis*: underestimated widespread, Kennel-related Disease? *Comp Med* 2004b; 54: 284-289.
12. Kraje AC. Canine Haemobartonellosis and Babesiosis. *Comp Small An Pract* 2001; 23: 310-318.
13. Kenny MJ, Shaw, SE, Beugnet F et al. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5397-5399.

14. Lester SJ, Hume JB, Phipps B. *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. *Can Vet J* 1995; 36: 444-445.
15. Lumb WV. A study of canine haemobartonellosis. PhD dissertation, School of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St Paul, Minn, 1957.
16. Macieira, D.B., de Menezes R.C., Damico, C., Almosny, N.R., McLane, H.L., 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. Feline Med Surg.* 2008; 10: 120-129.
17. MacWilliams P & Furneaux RW. Haemobartonellosis in a dog in Saskatchewan. *Can Vet J* 1973; 14: 21-22.
18. 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: 642-466.
19. Messick JB, Walker PG, Raphael W, et al. ‘*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*’ sp. nov., ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ sp. nov and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 693–698.
20. Messick JB. New perspectives about *Hemotrophic mycoplasma* (formely, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim* 2003; 33: 1453-1465,
21. Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Path* 2004; 33: 2-13.

22. Messick, JB & Harvey JW Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In.: Greene CE. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2011. *In press*.
23. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, 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* 2001; 51: 891-899.
24. Novacco M, Meli, ML, Gentilini F et al. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasmas infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet Microbiol* 2010; 142:276-84.
25. Pryor VW Jr & Bradbury RP. *Haemobartonella canis* infection in research dogs. *Lab Anim Sci* 1975; 25: 566-569.
26. Ramos, R.; Ramos, C.; Araújo, F.; Oliveira, R.; Souza, I.; Pimentel, D.; Galindo, M.; Santana, M.; Rosas, E.; Faustino, M.; Alves, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife. *Parasitology Research* 2010. *In press*.
27. Roura, X.; Peters, I.R.; Altet, L.; Tabar, M.; Barker, E.N.; Planellas, M.; Helps, C.R.; Francino, O.; Shaw, S.E.; Tasker, S. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2010, 22:270-274.
28. Santos AP. Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos na região de Porto Alegre, RS, Brasil. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

29. Santos AP, Messick JB, Biondo AW et al. 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. *Veterinary Clinical Pathology* 2009, 38: 443-452.
30. Seneviratna P, Weerasinghe N, Ariyadasa S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Res Vet Sci* 1973; 24: 112-114.
31. Sykes JE, Bailiff NL, Ball LM, et al. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1946-1951.
32. Sykes JE, Ball LM, Bailiff NL, et al. ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’, a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005; 55:27-30.
33. Tasker S, Helps CR, Day MJ, et al. Phylogenetic analysis of Hemoplasma Species: an International Study. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3877-3880.
34. Trapp SM, Messick JB, Vidotto O, et al. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil (Short Communication). *Veterinary Parasitology* 2006; 141: 177–180.
35. Venable JH & Ewing SA. Fine-structure of *Haemobartonella canis* (Rickettsiales: Bartonellaceae) and its relation to the host erythrocyte. *The Journal of Parasitology* 1968; 54: 259-268.
36. Vieira RF, Molento MB, dos Santos LC, Moraes W, Cubas ZS, Santos AP, Guimaraes AM, Mohamed A, Barros Filho IR, Biondo AW, Messick JB. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). *Vet. Microbiol.* 2009; 139 (3-4): 410-413.
37. Willi B, Boretti FS, Tasker S, et al. From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. *Veterinary microbiology* 2007; 125:197-209.

38. Zhuang QJ, Zhang HJ, Lin RQ, et al. The occurrence of the feline '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. *Trop Anil Health Prod* 2009; 41: 689-692.
39. Wright IG. The isolation of *Haemobartonella canis* in association with *Babesia canis* in a splenectomised dog. *Aust Vet J* 1971; 47: 157-159.

4.2 Artigo 2

Hematological and biochemical aspects of natural infection of dogs by *Mycoplasma haemocanis*

Canine hemoplasma laboratorial parameters

Stella de Faria Valle¹¹, Joanne Belle Messick², Andrea Pires dos Santos², Naila Cristina Blatt Duda¹, Marcos Andre Arcari¹, Luiz Carlos Kreutz³, Camila Marques Linck⁴, Felix Hilario Díaz González⁵

¹Laboratory of Veterinary Clinical Analysis, ³Laboratory of Immunology and Virology,

⁴Veterinary Hospital, University of Passo Fundo, Campus I, Universidade de Passo Fundo, BR 285, Km 171, Bairro São José, CEP 99052-900, Passo Fundo, RS, Brazil.

²Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, USA.

⁵Department of Veterinary Clinical Pathology, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

Background: The hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are pleomorphic, epicellular, organisms that parasitize the erythrocytes of many species. In dogs, the

¹ Correspondence:

Dr. Stella de Faria Valle, School of Veterinary Medicine, Universidade de Passo Fundo, BR 285 Km 171, Bairro São José, CEP 99052-900, Passo Fundo, RS, Brazil, Tel: +55 - 54 - 33168485; Fax: +55 - 54 - 33168163

E-mail: stellavalle@upf.br

clinical signs are conditioned to factors such as the degree of bacteremia, concomitant diseases, immunosuppression and splenectomy. The laboratorial findings (i.e. hematological and biochemical parameters) on natural canine hemoplasma infection was not been investigated at most of canine hemoplasma studies published until now.

Objective: The aims of the present study were to evaluate the hematological and blood biochemistry parameters associated with *Mycoplasma haemocanis* infection, to investigate the relation between infection and anemia, and to identify the variation of laboratory parameters in infection.

Methods: A total of 313 blood samples were randomly obtained and assayed by conventional PCR for detection of canine *M. haemocanis*. Descriptive statistics and univariate analysis were used to determine the correlation between positive status and hematologic laboratory parameters, with a focus on anemia.

Results: Counts of WBC, neutrophils, and monocytes were significantly correlated with the hemoplasma infection. All other hematological and biochemical parameters were normal in infected animals.

Conclusions: Consistent with previous studies, anemic status was not correlated with hemoplasma infection. The significant correlation between infection and WBC counts was attributed to hemoplasma despite the fact that most of the dogs did not present concomitant inflammatory disease.

Key words: anemia, hemotropic mycoplasmas, PCV, WBC count

Introduction

The hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are pleomorphic, epicellular, organisms that do not grow in conventional culture media and can parasitize

red blood cells of various species.^{1,2} Recently, following 16S rRNA molecular genetic studies, the hemoplasma species (previously *Haemobartonella* and *Eperythrozoon*) were renamed Mollicutes, genus *Mycoplasma*.³ *Mycoplasma haemocanis* (formerly *Haemobartonella canis*) has a widespread distribution and was first reported in 1928 in Germany.⁴ To date, 3 hemoplasma species have been described in dogs: ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’,⁵ ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’⁶ and ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’.⁷

The dog brown tick (*Rhipicephalus sanguineus*) is the identified vector for *M. haemocanis*, both in natural⁸ and experimental⁹ transmission. Blood transfusion^{1,10}, splenectomy^{10,11}, immunosuppression, concomitant clinical conditions^{4,12}, and dog kennel rearing^{4,13, 14} are suggested risk factors for *M. haemocanis* infection.

The acute disease is characterized by severe hemolytic anemia associated with intense bacteremia.^{15,16} Organisms in peripheral blood smears can be readily identified¹⁵⁻¹⁷, but clinical signs of chronic disease are not apparent.^{4,15,18} The acute disease can be apparent with concomitant splenectomy or immunosuppression.^{10,11,16} Chronic infection can be associated with concurrent conditions such as ehrlichiosis, babesiosis, and septicemias of non-specific origins.^{1,4} These opportunistic infectious diseases could explain the lack of regulation failure of the immune response and the subsequent development of the disease.

To date, most studies of *M. haemocanis* infection have evaluated risk factors with little focus on laboratory results and clinical signs. Hematological and biochemical findings are likely to vary and depend on the clinical stage of disease (i.e., acute or chronic).¹ Reports on infection by *M. haemofelis* in cats showed that anemia

(evaluated by PCV) and the immunomediated anemia condition¹⁹ are not related to *M. haemocanis* natural infection.^{8,12}

The aims of the present study were to evaluate the hematological and blood biochemical parameters in *Mycoplasma haemocanis* infection as detected by PCR, to investigate the relation between infection and anemia, and to identify variation in laboratory parameters during the course of the disease in dogs.

Materials and methods

A total of 329 EDTA blood samples were randomly obtained after routine hematologic and biochemical blood screening for veterinary diagnosis. All blood samples were obtained from dogs at the time of admission for diverse clinical causes to the Veterinary Teaching Hospital of the University of Passo Fundo (HV-UPF) in the period between August 2008 and September 2009. In all cases, clinical parameters were obtained by veterinarians and stored in the veterinary hospital database. The study was approved by UFRGS and the UPF Research Ethics Committee, having followed the ethical principles for animal experimentation of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Samples consisted of approximately 5 mL of blood submitted to the laboratory for hematological and biochemical analysis. Complete blood count (CBC), red blood cell count (RBC), white blood cell count (WBC), and hemoglobin were analyzed in a semi-automated counter (CELM CC 530, Barueri, São Paulo, Brazil). Packed cell volume (PCV) was evaluated by the microhematocrit method (Microhemato, FANEM, São Paulo, Brazil), and total plasma protein (TPP) was determined by refractometry. The mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCH) were calculated. Blood smears were prepared and stained with Diff Quick

(Instant Prov, Pinhais, Paraná, Brazil) to perform leukocyte differential counts and estimated platelet counts on an optical microscope (1000×). The degree of anisocytosis and polichromasia were determined by semi-quantitative morphological methods.²⁰

For biochemical analysis, non-anticoagulated samples were centrifuged at 5000 *g* for 5 minutes for serum separation and refrigerated until use. Albumin, urea, creatinine, alanine aminotransferase, and alkaline phosphatase were measured by a semi-automated colorimetric method (Labquest, Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, MG, Brazil).

After blood screening, 500 µL of EDTA blood sample was frozen at -2°C in Eppendorf tubes. Total DNA was extracted from 200 µL of EDTA blood with a commercial kit, used in accordance with manufacturer's protocol (Generation Capture Column, Qiagen, West Sussex, United Kingdom). All DNA samples were frozen at -20°C until molecular analysis at the Department of Comparative Pathobiology (School of Veterinary Medicine, Purdue University, IN). PCR of the GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was performed as an internal control and to identify PCR inhibitors.²¹ All negative samples from this PCR assay were not included in subsequent PCR analysis.

To detect *M. haemocanis*, a conventional PCR assay was performed using the following primers: Mhf F1 (5' - GAC TTT GGT TTC GGC CAA GG - 3') and Mhf R3 (5' - CGA AGT ACT ATC ATA ATT ATC CCT ' 3'). These primers reliably detect feline *M. haemofelis*, a genetically closely related organism.²² Reaction with a final volume of 25 µL consisted of ultrafiltered autoclaved water, 1× Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA) (pH 8.5), 1.5 mM MgCl₂, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) (Promega, Madison, WI, USA) at 0.2 µM, 1.25 U of GoTaq Flexi DNA Polymerase, primers (forward and reverse) at 10 µM each, and DNA template (5

μL). All reactions included a positive control of DNA obtained from a naturally infected dog and the negative control consisted ultrafiltered autoclaved water. Amplification was accomplished as follows: 2 min at 95°C, followed by 34 cycles of amplification (45 sec at 94°C, 30 sec at 53°C, and 30 sec at 72°C), and final extension for 5 min at 72°C, using a thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient Thermocycler, Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and visualized with UV light (Epi Chemi II Darkroom, UVP, inc., Upland, CA, USA). To confirm the identity of positive samples, the hemoplasma universal primers set was used to amplify 16S RNA by PCR. The amplicon was purified and sequenced to compare with sequences previously deposited in GenBank.

For all hematological and biochemical variables, descriptive statistics were calculated using statistical software (Excel 2007 for Windows and SPSS 15.0 - Statistical Package for the Social Sciences for Windows, SPSS, Inc. Chicago, IL, USA). To analyze differences between laboratory parameters and positive and negative PCR samples, a Mann-Whitney test followed by a Kolmogorov-Smirnov test was performed. For analysis of correlation between hemoplasma infection and anemia through PCV, RBC count, and hemoglobin in EDTA blood samples, data were dichotomized into normal and below reference values, followed by the Pearson Chi-square test and Fisher Exact Test when appropriate. Additionally, all hematologic and biochemical values were dichotomized into categorical variables on the basis of normal and abnormal and subjected to the Pearson Chi-square test and Fisher Exact Test when the value on the contingency table was less than 5. Variables that show $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Sixteen out of 329 initial samples were negative for the *GAPDH* gene in a conventional PCR assay and were excluded from the study. Using conventional PCR for *M. haemocanis*, 17 positive samples (5.13%) were observed. All were subsequently verified as positive by sequencing of the 16S RNA gene to confirm 100% similarity to *M. haemocanis* previously described in Europe.²³

The positive samples showed higher WBC counts, higher segmented neutrophil counts, and lower monocyte counts ($p < 0.05$) compared to negative samples. All hematologic parameters from positive samples were within the reference range (Table 1).

In positive samples, anisocytosis and polychromasia were observed in 23.5% (4/17) and 47.1% (8/17), respectively, as evaluated by the blood smear semi-quantitative method. In anemic dogs (52.9% of positive samples), nucleated red blood cells characteristic of regenerative anemia were not observed. One sample with nucleated red blood cells was obtained from a splenectomized dog that was diagnosed with splenic neoplasia 2 months earlier. The anemia in that case was classified as normocytic and hypochromic, and *Mycoplasma* sp. organisms attached to erythrocytes were not verified. At sampling this dog did not demonstrate clinical signs compatible with hemoplasmosis.

The dichotomized analysis showed that non-anemic status occurred in most of the dog blood samples (188/331), and 9 of 17 positive dogs (52.9%) were considered anemic by PCV values. A correlation between positive status and anemia was not detected based on RBC, PCV, and hemoglobin values.

Not all cases had a complete set of biochemical values. From a total of 313 blood samples, values of albumin and ALT were determined in 178 cases, creatinine in

161 cases, urea in 204 cases, and ALP in 226 cases. No correlation between *M. haemocanis* positive status and biochemical parameters was observed (Table 2.).

Discussion

The present study aimed to identify the laboratory findings in *M. haemocanis* natural infection in samples obtained from household dogs that had been admitted to a veterinary teaching hospital for various reasons. Hematological and biochemical values were compared with positive status that was determined by conventional PCR with an internal control (*GAPDH* gene). Although most of the positive dogs were anemic, a significant correlation between anemia and positive status was not verified. This observation is in agreement with previous European studies.^{8,12,24,25}

In positive dogs, PCV, RBC, and hemoglobin values were normal as compared to reference values. Thus, in chronic and unapparent infection, anemia was not identified in positive dogs, contrary to what is observed in feline hemoplasma infection. In *M. haemofelis* infection, low regenerative anemia was identified in the beginning of the infection and was concomitant with retroviral diseases such as feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV).²⁶ In contrast, the mechanism of anemia in hemoplasma positive dogs is currently unclear. A recent English study failed to identify positive dogs in a group with immune-mediated hemolytic anemia using Coomb's Test.¹⁹ This observation suggests that an unknown mechanism causing anemia in hemoplasma infection in dogs must be further investigated.

The mechanism of clinical signs of hemoplasma infection is similar to non-hemotropic mycoplasmas. Like non-hemotropic mycoplasmas, the severity of the disease is dependent on the host immune response, since there is auto-antibody

production induced by infection.²⁷ In hemoplasma infection, this condition was well verified in dogs with autoimmune hemolytic anemia confirmed by Coomb's positive test.^{11,16} Likewise, the severity of clinical and laboratory signs is dependent on the degree of parasitemia in the hemoplasma infection.¹⁶ For these reasons, we hypothesize that low parasitemia in asymptomatic dogs in the present study was insufficient to induce clinical signs and the resulting anemia.^{18,22}

Conventional PCR is a specific and sensitive assay for hemotropic mycoplasma diagnosis¹⁸, but it is not quantitative, as is real-time PCR. Previous studies that have identified the blood loads of hemoplasma in dogs, arriving at values greater than the other canine hemoplasma, the '*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum'.^{23,25} In the present study, the quantitative PCR was not performed; smear evaluation was used to identify the presence of the organisms in RBCs. Blood smear evaluation did not detect hemoplasma in RBCs in any positive dog, consistent with a low parasitemia state in which the organism is not observed.¹⁵ Notably, most of the case studies published until now have described acute infection only in immunosuppressed or splenectomized dogs that presented intense parasitemia in blood smears.^{4,10}

The present study was the first to relate leukocyte parameters to hemoplasma infection in dogs. *M. haemocanis*-positive dogs had significantly higher WBC and neutrophil counts than did negative dogs. However, all values were in the normal reference range. This leukogram could be associated with a chronic inflammatory response induced by chronic infection in positive dogs.²⁸ Concomitant clinical conditions were not presented in the present study, but were found to make no significant contribution to the leukocyte responses (unpublished data). The only previous reports regarding leukograms in hemoplasma positive dogs discussed persistent eosinophilia and anemia in experimental dogs.⁴

No difference in biochemical parameters between positive and negative dogs was observed in the present study. Previous reports showed low total plasma protein in acute hemoplasma infection in dogs. Perhaps the observed low prevalence of hemoplasma infection in our sample partially explains the absence of a relation on biochemical and hematologic parameters.

Conclusion

The results of the present study indicate that laboratory exams may not detect hemoplasma infection in dogs. Contrary to the situation in cats, anemia status was not related to hemoplasmosis, and the observed leukocyte response was associated with chronic inflammation due to *M. haemocanis* infection. Further studies are needed to investigate the influence of *M. haemocanis* on canine erythrocyte metabolism and its role in chronic hemoplasmosis.

References

1. Messick JB, Harvey JW. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: Greene, CE, eds. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier. *In press*. 2011.
2. Venable JH, Ewing SA. Fine-structure of *Haemobartonella canis* (Rickettsiales: Bartonellaceae) and its relation to the host erythrocyte. *J Parasitol*. 1968;54:259-268.
3. Messick JB, Walker PG, Raphael W, Berent L, Shi X. ‘*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*’ sp. nov., ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ sp. nov and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*):

- phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:693–698.
4. Pryor WH, Bradbury RP. *Haemobartonella canis* infection in research dogs. *Lab Anim Sci.* 1975;25:566-569.
 5. Sykes JE, Bailiff NL, Ball LM, Foreman O, George JW, Fry MM. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. *J Am Vet Med Assoc.* 2004;224:1946-1951.
 6. Zhuang QJ, Zhang HJ, Lin RQ, et al. The occurrence of the feline ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. *Trop Anim Health Prod.* 2009;41:689-692.
 7. Santos AP. Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos na região de Porto Alegre, RS, Brasil. (PhD dissertation) Veterinary Sciences Post graduation program, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 2008.
 8. Roura X, Peters IR, Altet L, et al. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *J Vet Diagn Invest.* 2010;22:270-274.
 9. Seneviratna P, Weerasinghe N, Ariyadasa S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Res Vet Sci.* 1973;24:112-114.
 10. Lester SJ, Hume JB, Phipps B. *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. *Can Vet J.* 1995;36:444-445.
 11. Bundza A, Lumsden BJ, McSherry VE, Valli VEO, Janzen EA. Haemobartonellosis in a dog in association with Coomb’s positive anemia. *Can Vet J.* 1976;17:267-270.
 12. Novacco M, Meli ML, Gentilini F, et al. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasmas infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet Microbiol.* 2010;142:276-284.

13. Baker HJ, Cassell GH, Lindsey JR. Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. *Am J Pathol.* 1971;64:625-652.
14. Kemming G, Messick JB, Enders G, et al. *Mycoplasma haemocanis*: a kennel Disease? *Comp Med.* 2004;54:404-409.
15. Allison RW, Meinkoth JH. Anemia Caused by *Rickettsia*, *Mycoplasma*, and Protozoa. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2010:199-210.
16. Messick JB. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet Clin Path.* 2004;33:2-13.
17. Chalker VJ. Canine mycoplasmas. *ResVet Sci.* 2005;79:1-8.
18. Messick JB. New perspectives about *Hemotropic mycoplasma* (formely, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *Vet Clin Small An.* 2003;33:1453-1465.
19. Warman SM, Helps CR, Barker EN, et al. Hemoplasma infection is not a common cause of canine immunemediated haemolytic anaemia in the UK. *J Small Anim Pract.* 2010;51:534–539.
20. Weiss DJ. Uniform evaluation and semiquantitative reporting of hematologic data in veterinary laboratories. *Vet Clin Path.* 1984;13:27-31.
21. 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;41:4172-4177.
22. Brinson JJ, Messick JB. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218:1943-1945.
23. Kenny MJ, Shaw SE, Beugnet F, Tasker S. Demonstration of two distinct Hemotropic Mycoplasmas in French dogs. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5397-5399.

24. Barker EN, Tasker S, Day MJ, et al. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. *Vet Microbiol.* 2010;140:167-170.
25. Wengi N, Willi B, Boretti FS, et al. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet Microbiol.* 2008;126:132-141.
26. Willi B, Boretti FS, Tasker S, et al. From *Haemobartonella* to haemoplasma: molecular methods provide new insights. *Vet Microbiol.* 2007;125:197-209.
27. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:1094–1156.
28. Schultze EA. Interpretation of Canine Leukocyte Responses. In: Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. *Schalm’s Veterinary Hematology.* 6th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2010:321-334.

Table 1. Hematologic parameters (median and range) from *M. haemocanis* (Mhc) positive and negative blood samples and hematological reference range.

Parameter	Mhc positive (n=17)	Mhc negative (n=296)	Reference range [§]
	Median (range)	Median (range)	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5.6 (2.7–8.9)	5.7 (1.1–12.4)	4.9–8.3
Hemoglobin (g/dL)	12.5 (6.8–19)	13.4 (1.7–24.3)	12.2–18.8
PCV (%)	37.9 (20–57)	40 (6.0–73)	36.7–56.4
MCV (fL)	69.7 (46.1–86)	71.7 (6.7–144.5)	57.4–82.3
MCH (%)	32.9 (29.7–35)	33.4 (25.3–49.3)	31.6–35.8
WBC ($/\mu\text{L}$)	16405.9* (5000–40900)	12651 (1300–62000)	4687–14815
Bands ($/\mu\text{L}$)	78.5 (0–522)	89.5 (0–7032)	0–38
Segmented ($/\mu\text{L}$)	13856.1* (3500–36810)	10001 (754–53606)	2484.6–10406.1
Eosinophils ($/\mu\text{L}$)	651.1 (0–2045)	429.2 (0–6006)	0–1744.7
Lymphocytes ($/\mu\text{L}$)	1614.7 (296–4064)	1585.9 (0–9324)	311.9–4105.2
Monocytes ($/\mu\text{L}$)	205.6* (0–492)	538.4 (0–5580)	0–809.3
TTP (g/dL)	6.68 (4.4–8.8)	6.4 (3.2–11)	5.51–7.7
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	292.13 (102–648)	254.52 (20–696)	200–600

[§] Laboratory reference range obtained from healthy dogs.

* Significant difference indicated by Mann-Whitney test between positive and negative samples, $p < 0.05$.

Table 2. Biochemical parameters (median and range) in *M. haemocanis* (Mhc) positive and negative blood samples, number of dogs, and biochemical reference range.

Parameter	Dogs	Mhc positive	Dogs	Mhc negative	Reference
Albumin (g/dL)	11	28.8 (18–45)	167	30 (12–42)	26–33
Creatinine (mg/dL)	7	1.1 (0.7–3.8)	154	0.9 (0.4–6.4)	0.5–1.5
ALT (UI/L)	7	58 (19–275)	171	53.9 (14–292)	21–86
BUN (mg/dL)	11	54.3 (10–206)	193	42.5 (12–243)	21.4–59.9
FAS (UI/L)	13	81.35 (41–148)	213	111.6 (17–518)	20–156

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo referiu a primeira investigação da frequência e dos fatores de risco para infecção pelos hemoplasmas em cães no Brasil onde até o presente momento, apenas dados referentes aos organismos que afetam os felinos têm sido estudados. Houve uma grande dificuldade em comparar os dados apresentados, pois a maioria das informações foi publicada em anais de congressos ou os resultados eram baseados na observação dos organismos em esfregaços sanguíneos corados.

Embora os resultados verificados no estudo tenham fornecido informações a respeito da epidemiologia, diagnóstico e condições clínicas da hemoplasmose em cães, ainda há muitos aspectos a serem avaliados e considerados na infecção em cães no Brasil. Acredita-se que através dessa primeira avaliação possa ser dada importância para os estudos das doenças transmitidas por vetores, como pulgas e carrapatos, no Sul do Brasil.

Desde que os hemoplasmas são incultiváveis em meios de cultura convencionais, o diagnóstico preferencialmente deve ser feito através da PCR ou outras técnicas moleculares. Para detecção desses organismos, a PCR pode ser considerada o “gold standard”, no entanto, a limitação identificada no presente estudo foi com relação à redução da sensibilidade para detecção em animais assintomáticos e que provavelmente apresentam baixa bacteremia. Essa observação foi constatada pelo fato da PCR convencional não ter sido sensível o suficiente para detecção dos hemoplasmas felinos e do canino ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. No caso do ‘*Candidatus M. haemominutum*’, houve a necessidade de reamplificar os produtos da PCR para que a identificação dos cães positivos pudesse ocorrer. Atualmente, a maioria dos estudos tem considerado a PCR em tempo real para detecção dos hemoplasmas em cães assintomáticos. Além da possibilidade do acompanhamento da quantidade de DNA do organismo na circulação é uma técnica mais sensível para detecção. Com relação à especificidade, como os organismos são muito semelhantes geneticamente, a construção das sondas é baseada na composição filogenética dos hemoplasmas que afetam os felinos. Uma das grandes limitações para a difusão dessa técnica no Brasil é o custo elevado.

Ainda com relação à detecção do ‘*Candidatus M. haemominutum*’ nos cães do presente estudo, ainda há necessidade de investigações adicionais para que se possa diferenciar o organismo verificado do já conhecido ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. O

sequenciamento do fragmento de 170pb demonstrou ser muito mais similar (97-98%) ao organismo que afeta os felinos do que com o '*Candidatus M. haematoparvum*'. Apenas com o resultado apresentado no primeiro artigo não há como sugerir ser o mesmo '*Candidatus M. haemominutum*' que parasita os felinos ou tratar-se de uma nova espécie em cães. No Brasil, os relatos de infecção pelo '*Candidatus M. haemominutum*' são mais consistentes do que pelo '*Candidatus M. haematoparvum*'.

O '*Candidatus M. turicensis*' que já foi detectado em cães esplenectomizados não pode ser verificado no presente estudo. A ausência de resultados foi atribuída tanto à baixa bacteremia, já identificada em felinos, quanto à presença do baço. Na infecção pelo *M. haemocanis* estudos da década de 1950 referem que o baço possui um fator protetor para infecção pelo hemoplasma. A PCR convencional falhou na detecção desse organismo em cães não esplenectomizados e sugere-se a necessidade da utilização de técnicas moleculares mais sensíveis para que o diagnóstico seja possível de ser realizado.

A baixa prevalência pode estar relacionada ao tipo de população amostrada e a situação climática. Até então, a maioria dos estudos refere que cães nascidos e mantidos em canis eram mais predispostos a adquirir a infecção. No entanto, foi constatada uma prevalência significativa em cães domiciliados sugerindo que mesmo sem ter contato com outros animais e não possuindo acesso a rua, a infecção pode existir. Com essas afirmativas, a hipótese de contaminação intrauterina pode ser considerada um fator de infecção nesse caso. No entanto, não houve como verificar essa suposição que há muito vem sendo discutida nos estudos da hemoplasmose em cães.

Assim como já discutido em estudos americanos e europeus, o carrapato marrom é o vetor da hemoplasmose em cães. No entanto, ainda não se conseguiu verificar o papel da infestação por pulgas na infecção pelos hemoplasmas caninos e felinos. Desde que em gatos, o *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' podem ser transmitidos pela pulga, acredita-se que em cães essa via de transmissão também possa estar ocorrendo. Para isso, deve-se considerar a avaliação da presença do DNA dos micoplasmas nos vetores.

A condição imune do hospedeiro interfere no desenvolvimento dos sinais clínicos embora no presente estudo, a ausência de correlação entre a situação de doente e a presença de hemoplasma tenha sido verificada. Enquanto em felinos, a maioria dos estudos relaciona a infecção com as doenças retrovirais, em cães ainda há dúvidas sobre

quais as condições clínicas são determinantes para a infecção e o desenvolvimento dos sinais clínicos. Os estudos avaliando as condições imunológicas dos cães infectados naturalmente devem ser conduzidos.

A transmissão pela saliva, determinada pela presença de lacerações cutâneas ocasionadas por interação animal, já havia sido identificada, no entanto, a maioria dos estudos apenas considera os fatores isolados na interpretação dos resultados. A interferência de dois fatores que fortemente colaboram para infecção como a idade avançada e a presença de contato com vetores podem, na maioria das vezes, ocasionar interferência nos resultados levando a interpretações equivocadas.

Na patologia clínica, as variações dos parâmetros não podem sugerir a presença de infecção. Uma vez que os sinais são inaparentes e algumas vezes inespecíficos (anorexia e hipertermia), tais exames não auxiliam os clínicos na determinação da hemoplasmose na fase crônica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, H.J.; CASSELL, G.H.; LINDSEY, J.R. Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. **American Journal of Pathology**, v. 64, n.3, p. 625-632, 1971.

BARKER, E.N.; TASKER, S.; DAY, M.J.; WARMAN, S.M.; WOOLEY, K.; BIRTLES, R.; GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C.D.; NEWAJ-FYZUL, A.; CAMPBELL, M.D.; SPARAGANO, O.A.E.; CLEAVELAND, S.; HELPS, C.R. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ in dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 167-170, 2010.

BARKER, E.N; HELPS, C.R.; PETERS, I.R; DARBY, A.C.; RADFORD, A.D.; TASKER, S. Complete genome sequence of *Mycoplasma haemofelis*, a hemotropic mycoplasma. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 8, p. 2060–2061, 2011.

BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P.; GUIMARAES, A.M.S.; VIEIRA, R.F.C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.P.; MOLENTO, M.B.; TIMENETSKY, J.; de MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.D.; MESSICK, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 1-7p, 2009.

BIRKENHEUER AJ, BREITSCHWERDT EB, ALLEMAN AR, PITULLE C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 10, p. 1385-1388, 2002.

BRACCINI, G.L.; CHAPLIN, E.L.; STOBBE, N.S.; ARAUJO, F.A.P.; SANTOS, N.R. Protozoology and rickettsial findings of the laboratory of the Veterinary Faculty of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil 1986-1990. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 20, p. 134-149, 1992.

BRINSON, J.J.; MESSICK, J.B. 2001. Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 12, p. 1943-1945, 1992.

BUNDZA, A.; LUMSDEN, J.H.; McSHERRY, J; VALLI, V.E.O.; JANZEN, E.A. Haemobartonellosis in a dog in association with Coombs' positive anemia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 17, p. 267-270, 1976.

CHALKER, V.J. Canine mycoplasmas. **Research in Veterinary Science**, v. 79, p. 1-8, 2005.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 25, p. 1-17, 2008.

DATZ, C.A. Noninfectious causes of immunosuppression in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v. 40, p. 459-467, 2010.

de MORAIS, H.S.A; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J.B. Infecção com *Mycoplasma Hemotrófico* pequeno em um cão no Brasil (Small Haemotropic *Mycoplasma* infection in dog in Brazil). **Anais... XXVII Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA**, Brasil, 2006.

de MORAIS, H.S.A.; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma haemocanis* (Previously, *Haemobartonella canis*) infection in non-splenectomized dogs in Brasil: 4 Cases (1999-2001). **Proceedings... American College of Veterinary Internal Medicine**, 2003.

FOLEY, J.E.; PEDERSEN, N.C. '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 815-817, 2001.

GETILLAT, S. *Haemobartonella canis* (Kiknth, 1928) in the blood of dogs with parvovirus disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, n. 10, p. 647-653, 1981.

HANDCOCK, W.J. Clinical haemobartonellosis associated with use of corticosteroid. *Veterinary Record*, v. 125, n. 23, p.585, 1989.

HOSKINS, J.D. Canine haemobartonellosis, canine hepatozoonosis and feline cytauxzoonosis. *Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice*, v. 21, p. 129-140, 1991.

HORNOK, S.; MELI, M.L.; PERRETEN, A.; FARKAS, R.; WILLI, B.; BEUGNET, F.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 1-2, p. 98-104, 2010.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M. DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; BROUQUI, P. Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in Eastern Sudan. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 1078, p. 461-463, 2006.

KEMMING, G.; MESSICK, J.B.; MUELLER, W.; ENDERS, G.; MEISNER, F.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; SCHROPP, A.; WOJTCZYK, C.; PACKERT, K.; MESSMER, K.; THEIN, E. Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old problem – New insight. *European Surgical Research*, v. 36, p. 198-205, 2004a.

KEMMING, G.; MESSICK, J.B.; ENDERS, G.; BOROS, M.; LORENZ, B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSMER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis*: underestimated widespread, Kennel-related Disease?. *Comparative Medicine*, v. 54, n. 4, p. 284-289, 2004b.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct Hemotropic Mycoplasmas in French dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 11, p. 5397-5399, 2004.

KNUTTI, R.E. & HAWKINS, W.B. Bartonella incidence in splenectomized bile fistula dogs. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 61, n. 1, p. 115-125, 1935.

KRAKOWKA, S. Transplacentally acquired microbial and parasitic disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, p. 750-753, 1977.

LESTER, S.J.; HUME, J.B.; PHIPPS, B. *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 36, p. 444-445, 1995.

LUMB, W.V. A study of canine haemobartonellosis. PhD dissertation, School of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St Paul, Minn, 1957.

LUMB, W.V. More information on haemobartonellosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 732-733, 2001.

Mc NAUGHT, J.B.; WOODS, F.M.; SCOTT, V. Bartonella bodies in the blood of a non-splenectomized dog. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 32, p. 353-358, 1935.

MacWILLIAMS, P; FURNEAUX, R.W. Haemobartonellosis in a dog in Saskatchewan. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 14, n. 1, p. 21-22, 1973.

MESSICK, J. B.; WALKER, P. G.; RAPHAEL, W.; BERENT, L.; SHI, X. ‘*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*’ sp. nov., ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ sp. nov and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 693–698, 2002.

MESSICK, J.B. New perspectives about *Hemotrophic mycoplasma* (formely, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n.6, p. 1453-1465, 2003.

MESSICK J.B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2-13, 2004.

MESSICK, J.B. & HARVEY, J.W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In.: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier. 2011, *In press*

MESSICK, J.B.; SANTOS, A.P.; GUIMARAES, A.M.S. Complete genome sequences of two hemotropic mycoplasmas, *Mycoplasma haemofelis* Strain Ohio2 and *Mycoplasma suis* Strain Illinois. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 8, p. 2068–2069, 2011.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, 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**, v. 51, p. 891-899, 2001.

NOVACCO, M.; MELI, M.L.; GENTILINI, F.; MARSILIO, E.; CECI, C.; PENNISI, M.G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasmas infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p.276-84, 2010.

OBARA, H.; FUJIHARA, M.; WATANABE, Y.; ONO, H.K.; HARASAWA, R. A feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', detected in Dog in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2011. (*In press*).

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; McAULIFFE, L.; NEIMARK, H.; LAPPIN, M.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J.; HOELZLE, L.E.; WILLI, B.; MELI, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. RNase e P RNA gene (*rnpB*) phylogeny of hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1873-1877, 2008.

PRYOR, W.H. & BRADBURY, R.P. *Haemobartonella canis* infection in research dogs. **Laboratory Animal Science**, v. 25, n. 5, p. 566-569, 1975.

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSAS, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, v. 105, p. 1115-20, 2010.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, 1998.

ROURA, X.; PETERS, I.R.; ALTET, L.; TABAR, M.; BARKER, E.N.; PLANELLAS, M.; HELPS, C.R.; FRANCINO, O.; SHAW, S.E.; TASKER, S. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 270-274, 2010.

SASAKI, M.; OHTA, K.; MATSUU, A.; HIRATA, H.; IKADAI, H.; OYAMADA, T. A molecular survey of *Mycoplasma haemocanis* in dogs and foxes in Aomori Prefecture, Japan. **The Journal of Protozoology Research**, v. 18, p. 57-60, 2008.

SANTOS, A.P. Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos na região de Porto Alegre, RS, Brasil. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 164p, 2008.

SANTOS, A. P.; SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; de MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.D.; MESSICK, J.B. Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 12, p. 1922-1924, 2008.

SANTOS, A.P.; MESSICK, J.B.; BIONDO, A.W.; OLIVEIRA, S.T.; PEDRALLI, V.; LASTA, C.S.; LACERDA, L.A.; ESTEVES, R.S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; WILLI, B.; GONZÁLEZ, F.H.D. 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. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p.443-452, 2009.

SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE, ARIYADASA, S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in Veterinary Science**, v. 14, p. 112-114, 1973.

SYKES, J.E.; BAILIFF, N.L.; BALL, L.M.; FOREMAN, O.; GEORGE, J.W.; FRY, M.M. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 12, p. 1946-1951, 2004.

SYKES, J.E.; BALL, L.M.; BAILIFF, N.L.; FRY, M.M. '*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1. p. 27-30, 2005.

TASKER, S.; HELPS, C.R.; DAY, M.J.; HARBOUR, D.A.; SHAW, S.E.; HARRUS, S.; BANETH, G.; LOBETTI, R.G.; MALIK, R.; BEAUFILS, J.P.; BELFORD, C.R.; GRUFFUDD-JONES, T.J. Phylogenetic analysis of Hemoplasma Species: an International Study **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3877-3880, 2003.

TRAPP, S.M.; MESSICK, J.B; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F.S.; de MORAIS, H.S.A. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil (Short Communication). **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 1-2. p. 177-180, 2006.

VENABLE, J.H., EWING, S.A. Fine-structure of *Haemobartonella canis* (Rickettsiales: Bartonellacea) and its relation to the host erythrocyte. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 2, p. 259-268, 1968.

WARDROP, K.J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M.R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 135-142, 2005.

WENGI, N.; WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; RIOND, B.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 132-141, 2008.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M.L.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2581–2585, 2005.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F.S.; DOHERR, M.G.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; LOBETTI, R.G.; MALIK, R.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4430–4435, 2006.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; TASKER, S.; MELI, M.L.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. **Veterinary microbiology**, v. 125, n. 3-4, p. 197-209, 2007.

WILLI, B.; NOVACCO, M.; MELI, M.L.; WOLF-JÄCKEL, G.A.; BORETTI, F.S.; WENGI, N.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 152, n. 5, p. 237-244, 2010.

WOODS, J.E.; BREWER, M.M.; HAWLEY, J.R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M.R. Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p. 1008-12, 2005.

WRIGHT, I.G. The isolation of *Haemobartonella canis* in association with *Babesia canis* in a splenectomised dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 157-159, 1971.

ZHUANG, Q.J.; ZHANG, H.J.; LIN, R.Q.; SUN, M.F.; LIANG, X.J.; QIN, X.W.; PU W.J.; ZHU, X.Q. The occurrence of the feline '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 4, p. 689-692, 2009.

7. ANEXOS

Comprovante de submissão do Artigo 2 para o Veterinary Clinical Pathology Journal

Stella Valle

De: onbehalfof+vetclinpathjournal+gmail.com@manuscriptcentral.com em nome de vetclinpathjournal@gmail.com
Enviado em: quinta-feira, 13 de outubro de 2011 15:39
Para: stellavalle@upf.br; stellavalle@upf.br
Cc: stellavalle@upf.br; stellavalle@upf.br; jmessic@purdue.edu; santos1@purdue.edu; ncbduda@hotmail.com; marcosarcari@hotmail.com; lckreutz@upf.br; camila_linck@hotmail.com; felixgonzalez.ufrgs@gmail.com
Assunto: Veterinary Clinical Pathology - Manuscript ID VCP-11-1826

13-Oct-2011

Dear Prof. Valle:

Your manuscript entitled "Hematological and biochemical aspects of natural infection of dogs by Mycoplasma haemocanis" by Valle, Stella; Messick, Joanne; Santos, Andrea; Duda, Naila; Arcari, Marcos; Kreutz, Luiz Carlos; Linck, Camila; González, Félix has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Veterinary Clinical Pathology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is VCP-11-1826.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/vcp> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/vcp> .

Thank you for submitting your manuscript to Veterinary Clinical Pathology.

Sincerely,
 Veterinary Clinical Pathology Editorial Office