

## DETECÇÃO MOLECULAR de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' EM FELINOS DOMÉSTICOS POR MEIO DE PCR CONVENCIONAL

PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN<sup>1</sup>; ALEXSANDER FERRAZ<sup>2</sup>; DIAGO DUTRA LIMA<sup>3</sup>; ANDREIA CAROLINE MACIEL<sup>4</sup>; KAUE RODRIGUEZ MARTINS<sup>5</sup>; RODRIGO CASQUERO CUNHA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [dallmannpaola@gmail.com](mailto:dallmannpaola@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [xanderferraz@yahoo.com.br](mailto:xanderferraz@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [diagolima@gmail.com](mailto:diagolima@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [mvandreamaciel@gmail.com](mailto:mvandreamaciel@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [kauerodriguez@gmail.com](mailto:kauerodriguez@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rodrigo.cunha@ufpel.edu.br](mailto:rodrigo.cunha@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A micoplasmose haemotrópica felina (MHF), também conhecida como anemia infecciosa felina, é causada por hemoplasmas do gênero *Mycoplasma*. Trata-se de um grupo de pequenas bactérias pleomórficas, gram-negativa, intracelulares obrigatórias e epieritrocitárias (GEORGE et al., 2002; SYKES, 2010; TASKER, 2010).

Pelo menos três espécies podem ser encontradas em felinos domésticos: *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf*), '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (*CMhm*) e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (*CMt*). A transmissão pode ocorrer por meio de artrópodes hematófagos, como pulgas (*Ctenocephalides felis*) e carrapatos (*Rhipicephalus sanguineus*), através de interações agressivas e mordeduras, onde haja contato com sangue infectado, transmissão vertical, além da forma iatrogênica pela transfusão sanguínea (TASKER, 2010; WILLI et al., 2007).

De modo geral, a patogenia apresenta-se de forma subclínica. Entretanto, a adesão dos hemoplasmas à superfície dos eritrócitos pode acarretar na sua destruição pelo sistema fagocítico mononuclear, induzindo anemia hemolítica, que pode variar de leve a grave. Os felinos parasitados podem apresentar sinais clínicos inespecíficos, como: febre, inapetência, perda de peso, apatia e mucosas pálidas ou, até mesmo, permanecerem assintomáticos (MESSICK, 2004; SYKES, 2010; TANAHARA et al., 2010).

Além disso, a dupla infecção com *Mhf* e *CMhm* ou, ainda, a coinfeção com vírus da leucemia felina (FeLV) e/ou vírus da imunodeficiência felina (FIV) agravam o quadro clínico do paciente, além de favorecer o estado de portador crônico (GEORGE et al., 2002; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi utilizar ensaios de PCR baseados na amplificação do rDNA 16S para detecção de *Mhf* e *CMhm* em felinos atendidos em uma clínica especializada exclusivamente em gatos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Além disso, simultaneamente, identificar fatores de risco associados à infecção.

### 2. METODOLOGIA

#### Amostragem

Um total de 236 felinos foram amostrados por conveniência e selecionados aleatoriamente de atendimentos em uma clínica veterinária exclusiva para gatos localizada na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, entre agosto de 2022 e julho de 2023. Assim, gatos saudáveis (atendidos para exames de rotina ou cirurgias para castração eletiva) e doentes (aqueles que foram encaminhados a clínica para

atendimento clínico) foram incluídos neste estudo, sem discriminação de idade, sexo ou raça.

Ademais, foram coletados dados como estado da saúde, (saudável ou não saudável, no caso de paciente com outra enfermidade), FIV+ e FeLV+, para assim avaliar quais são potenciais fatores de risco para infecção por hemoplasmas. Todas as amostras foram analisadas e processadas no Laboratório de Biologia Molecular Veterinária (LabMol-Vet) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

### **Extração e quantificação de DNA**

As amostras foram submetidas à extração de DNA genômico (gDNA) total utilizando o método por coluna PetNAD™ Nucleic Acid Co-prep Kit, seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, para a análise de pureza e concentração do DNA extraído das amostras foi utilizado o espectrofotômetro de luz UV, NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA).

### **Identificação de hemoplasmas pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Com o intuito de detectar DNA de *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf*) e ‘*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*’ (*CMhm*), foi realizada PCR convencional, com primers direcionados ao 16S rDNA de *Mhf* e *CMhm*. Os primers senso Hf-F (5'-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3') e anti-senso Hf-R (5'-ACGCCAATAAATCCGRATAAT-3') produziram amplicons de 170 pb para *Mhf* e 193 pb para *CMhm*. As temperaturas de amplificação foram de acordo com as orientações descritas por JENSEN et al. (2001).

Os produtos obtidos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio. A visualização dos produtos amplificados foi realizada sob luz UV, por meio de transiluminador. Uma escala de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) foi utilizada para verificar o tamanho dos produtos amplificados. Para cada rodada de reações, foi incluído um controle positivo, além de um controle negativo com água ultrapura.

### **Análise Estatística**

As associações estatísticas entre os resultados da análise de PCR e as variáveis estudadas como estado da saúde (não saudável e saudável), FIV+ e FeLV+ foram avaliadas por meio do teste Qui-quadrado. Para as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ), foram calculados os odds ratios (OR) com seus intervalos de confiança de 95%, por meio do programa OpenEpi.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Um total de 30,1% (71/236) dos felinos estavam infectados com pelo menos uma espécie de hemoplasma. Os produtos de amplificação de PCR dos tamanhos previstos foram obtidos para *Mhf* (170 pb) e *CMhm* (193 pb) em 31% (22/236) e 66,2% (77/236) das amostras, respectivamente. A coinfeção por *Mhf* e *CMhm* foi observada em 2,8% (2/236) das amostras analisadas.

Na Tabela 1, estão expostos os resultados da análise estatística e suas associações com a infecção por hemoplasmas. Em relação as variáveis testadas, felinos com outras enfermidades, classificados como “não saudáveis”, apresenta associação ( $p < 0,05$ ) com a detecção do agente (odds ratio = 2,5; IC 95% = 1,4-4,4). Além disso, a variável “gatos positivos para FeLV” apresenta associação ( $p < 0,05$ ) com a coinfeção com *Mycoplasma* (odds ratio = 2,7; IC 95% = 1,4-5,4), bem como a variável “animais positivos para FIV” (odds ratio = 4,3; IC 95% = 1,5-12,5).

Tabela 1. Fatores de riscos de hemoplasmas em gatos domésticos atendidos em uma clínica especializada exclusivamente no atendimento de felinos, na cidade de Pelotas, RS.

Variáveis		N (%)	Felinos positivos <i>Mycoplasma</i> spp. (%)	p <sup>1</sup>
Estado da saúde	Não Saudável	106 (44,9)	43 (18,2)	0,001
	Saudável	130 (55,1)	28 (11,9)	
FIV+	Sim	16 (6,8)	10 (4,2)	0,003
	Não	220 (93,2)	61 (25,8)	
FeLV+	Sim	43 (18,2)	21 (8,9)	0,003
	Não	193 (81,8)	50 (21,2)	

Abreviaturas: N= número de animais analisados; <sup>1</sup>Teste Qui-quadrado, FIV= vírus da imunodeficiência felina, FeLV= vírus da leucemia felina.

De acordo com os resultados obtidos, *CMhm* foi a espécie mais detectada nas amostras, o que vai de acordo com a maioria dos estudos de prevalência realizados no mundo (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013; RAIMUNDO et al., 2016; ROSENQVIST et al., 2016; TANAHARA et al., 2010; TASKER et al. 2003). Tal característica pode ser em decorrência da infecção e da multiplicação mais eficiente do *CMhm* em comparação aos demais hemoplasmas, ou, ainda, de uma virulência reduzida que permite um estado de portador assintomático mais prolongado. A associação significativa entre infecção por *Mycoplasma* e coinfeção por retrovírus, FeLV e FIV, demonstrada por este e por outros estudos, pode ser explicada pelo conhecido efeito imunossupressor desses retrovírus (GEORGE et al., 2002; MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013; TANAHARA et al., 2010).

A detecção de DNA de *CMt* não foi avaliada neste estudo. Ademais, os resultados apresentados são parciais, aos quais ainda serão incluídas as amostras recebidas em agosto de 2023, para realização da avaliação dos fatores de riscos já citados e outras variáveis como sexo, idade, presença de pulgas, acesso a rua, estação do ano e alterações hematológicas.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que, nas amostras analisadas, foram detectadas presenças de *Mycoplasma*, sendo *CMhm* a espécie mais observada. Além disso, felinos com outras enfermidades são mais propensos a serem infectados. Diante disso, mais estudos são necessários para entender o papel da infecção por essas espécies de hemoplasma em felinos. Os demais resultados serão apresentados em um posterior momento.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GEORGE, J.W.; RIDEOUT, B.A.; GRIFFEY, S.M.; PEDERSEN, N.C. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 1172–1178, 2002.

JENSEN, W.A.; LAPPIN, M.R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W.J. Using of the polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 604–608, 2001.

MARTÍNEZ-DÍAZ, V.L.; SILVESTRE-FERREIRA, A.C.; VILHENA, H.; PASTOR, J.; FRANCINO, O.; et al. Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 10, p. 879-885, 2013.

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.

RAIMUNDO, J.M.; GUIMARÃES, A.; RODRIGUES, R.B.; BOTELHO, C.F.M. e al. Hematological changes associated with hemoplasma infection in cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 441-449, 2016.

ROSENQVIST, M.B.; MEILSTRUP, A.K.H.; LARSEN, J. et al. Prevalence of feline haemoplasma in cats in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 78, p. 58, 2016.

SYKES, J.E. Feline hemotropic micoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n.1, p. 62–69, 2010.

TANAHARA, M.; MIYAMOTO, S.; NISHIOT, T.; YOSHII, Y. et al. An epidemiological survey of feline hemoplasma infection in Japan. **Journal of Veterinary Science**, v. 72, n. 12, p. 1575-1581, 2011.

TASKER, S.; BINNS, S.H.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.L. et al. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v. 152, n. 7, p. 193–198, 2003.

TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: What’s their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 5, p. 369–381, 2010.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; MELI, M.L.; BERNASCONI, M.V. et al. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3798–3802, 2007.