

DETECÇÃO de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' POR MEIO DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM FELINO - RELATO DE CASO.

SARA DA SILVA SANTIAGO¹; PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN²; KAUE RODRIGUEZ MARTINS³; CERES CRISTINA TEMPEL NAKASU⁴; CHARLES SILVA LIMA⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – sara.santiago.ufpel@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – ceresnaku@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – charless.lima@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A micoplasmose é uma enfermidade ocasionada por agentes do gênero *Mycoplasma* spp., sendo conhecidas três espécies de ocorrência em cães e gatos: *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf*); '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (*CMhm*) e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (*CMt*). Os micoplasmas são bactérias gram-negativas capazes de infectar eritrócitos (THRALL et al., 2015). Na maioria dos casos, essa enfermidade apresenta-se de forma subclínica, ou seja, assintomática (NEIMERK et al., 2001; MESSIK, 2004). No entanto, a adesão do parasito à superfície dos glóbulos vermelhos pode resultar na destruição destes pelo sistema fagocítico mononuclear, resultando em um quadro de anemia hemolítica aguda ou crônica, podendo variar de leve a grave (MESSIK, 2004). Em felinos essa condição é também conhecida como micoplasmose haemotrópica felina (MHF), ou anemia infecciosa felina (MESSIK, 2004). O hemoplasma *Mhf* está associado ao desenvolvimento de anemia grave nos felinos, enquanto as outras espécies, como *CMhm* e *CMt*, podem desenvolver sintomatologia clínica apenas em animais imunossuprimidos (GEORGE et al., 2002; MESSICK, 2004). Estudos identificaram os retrovírus como um fator predisponente para a micoplasmose, especialmente o FeLV (Vírus da leucemia felina), devido ao comprometimento do sistema imune do animal infectado (HARVEY E MESSICK, 2015).

A transmissão da micoplasmose felina pode ocorrer através do repasto sanguíneo realizado por carrapatos e pulgas, durante a gestação, via uterina, ou pela amamentação. Além disso, é possível que a doença seja transmitida através de transfusões sanguíneas (THRALL et al., 2015).

A técnica de reacção em cadeia de polimerase (PCR) é o método de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade na detecção dos hemoplasmas, sendo capaz de amplificar fragmentos de DNA mesmo que a amostra apresente baixas quantidades da bactéria (HARVEY E MESSICK, 2015). O PCR convencional é capaz de diferenciar as espécies de *Mycoplasma* (JENSEN et al., 2001).

O presente estudo teve como objetivo utilizar ensaios de PCR baseados na amplificação do rDNA de rRNA 16S para detecção de *Mhf* e *CMhm* em um felino atendido em uma clínica especializada exclusivamente em gatos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul.

2.METODOLOGIA

Amostra e Local de processamento

Foi encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular Veterinária (LabMol-Vet) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), uma amostra de sangue de um felino doméstico atendido em uma clínica veterinária exclusiva para gatos localizada na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Foram coletadas as seguintes informações: macho, 10 anos, sem raça definida, tem acesso a rua e contato com outros animais, vírus da leucemia felina (FeLV) e vírus da imunodeficiência felina (FIV) positivo, sem alterações no hemograma.

Extração e quantificação de DNA

A amostra foi submetida 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 da amostra 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 rDNA de 16S rRNA de *Mhf* e *CMhm*. Os primers senso Hf-F (5'-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3') e anti-senso Hf-R (5'-ACGCCCAATAAATCCGRATAAT-3') produziram amplicons de 170 pb para *Mhf* e 193 pb para *CMhm*. A mistura de reação de PCR, em um volume final de 25 µL, incluiu 2,5 µL de tampão de amostra 10×, 0,5 µL dNTPs (0,2 mM cada), 1,25 µL (1.5 mM) MgCl₂, 0,5 µL de cada primer, 0,25 µL (2,5 U) Taq DNA polimerase (Invitrogen; EUA), 16,5 µL de água ultrapura (Invitrogen) e, finalmente, 2 µL de DNA genômico da amostra. As condições de amplificação consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação); 55 °C por 30 segundos (anelamento); 72 °C por 30 segundos (extensão), e na etapa final da extensão, 72 °C por 7 minutos.

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.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi detectado na amostra a coinfeção de *Mycoplasma*, conforme a figura 1, no qual observou-se dois amplicons de tamanhos diferentes, 170 pb para *Mhf* 193 pb para CMhm, na mesma amostra analisada.

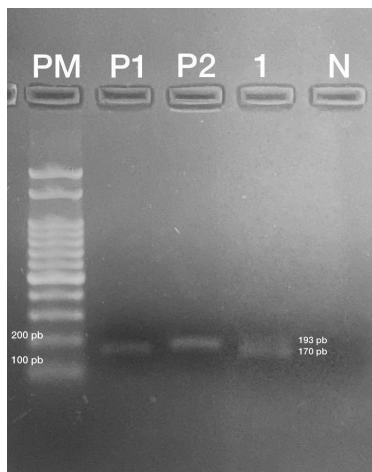


Figura 1: Gel de Agarose 1,5%. Abreviaturas: PM= peso molecular (DNA ladder); P1= positivo *Mhf*; P2= positivo CMhm; 1 = amostra; N= negativo (água ultrapura).

É importante ressaltar que o paciente não apresenta sinais clínicos nem alterações no hemograma. Sendo assim, a enfermidade estava curso subclínico, o que vai de acordo com alguns estudos, no qual o paciente permanece assintomático. Ademais, a multinfecção do felino por *Mhf* e CMhm, associados aos retrovírus, FIV e FeLV, pode favorecer o estado de portador crônico ou, até mesmo, agravar o quadro clínico (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013; TASKER et al., 2003).

Fica em evidência a importância dos ensaios de PCR como uma ferramenta para diagnosticar e diferenciar as infecções por hemoplasma felino. Além disso, devido a alta sensibilidade, tem sido aplicado como triagem de gatos aparentemente saudáveis, evitando assim que se tornem doadores de sangue e com o intuito de prevenir a transmissão para outros animais, além de monitorar a resposta ao tratamento (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2013).

Ademais, mesmo que seja realizado o tratamento com doxiciclina, que é o medicamento de eleição, é possível que o felino se reinfecte, uma vez que tem contato com fatores de risco, como: presença de pulgas, acesso a rua e contato com outros animais (TASKER et al., 2003).

Neste contexto, fica exposta a importância da realização do monitoramento dos felinos por meio de PCR e, a partir destas informações, a adoção de medidas terapêuticas e quimioproláticas para o controle desta enfermidade, evitando assim a disseminação. Em suma, é imprescindível a conscientização dos tutores quanto aos fatores de riscos e as alternativas de prevenção.

4. CONCLUSÃO

Na amostra, foram detectados DNA de *Mhf* e *CMhm*, já o PCR para detecção de DNA de *CMt* não foi realizado. É importante destacar que felinos que já possuem outras enfermidades apresentam maior suscetibilidade à infecção por hemoplasmas. Portanto, são necessários mais estudos para aprofundar nossa compreensão do papel dessa infecção em felinos.

5. REFERÊNCIAS

GEORGE, J.W.; RIDEOUT B.A.; GRIFFEY S.M. 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, ago 2002.

JENSEN, W.A.; LAPPIN, M.R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W.J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, 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, p. 2- 13, 2004.

MESSICK, J.B.; HARVEY J.W. Micoplasmose Hemotrópica/Hemobartonelose. In: Greene, Craig E. Doenças infecciosas em cães e gatos. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2015. Cap. 31, p. 325-335.

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.

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

THRALL, M. A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2 ed. Roca. 2015.