



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE CASTANHAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL NA AMAZÔNIA

SINEREY KARLA SALIM ARAGÃO DE SOUSA

**OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma* spp. E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS
EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NATURALMENTE INFECTADOS
NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ**

CASTANHAL
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE CASTANHAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL NA AMAZÔNIA

**OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma* spp. E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS
EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NATURALMENTE INFECTADOS
NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ**

Sinerey Karla Salim Aragão de Sousa
Mestranda

Prof. Dr. Gustavo Góes-Cavalcante
Orientador

CASTANHAL
2013

SINEREY KARLA SALIM ARAGÃO DE SOUSA

**OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma* spp. E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS
EM GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) NATURALMENTE INFECTADOS
NA CIDADE DE BELÉM, PARÁ**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Saúde Animal. Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal na Amazônia. Campus Universitário de Castanhal. Instituto de Medicina Veterinária Universidade Federal do Pará.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Góes Cavalcante
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Alessandra Scofield Amaral
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra^a. Maria Vivina Barros Monteiro
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. André Marcelo Conceição Meneses
Universidade Federal Rural da Amazônia

CASTANHAL
2013

DEDICATÓRIA

A minha mãe, por sempre ter me
mostrado como ter garra,
perseverança, fé e superação.
Obrigada por ser meu exemplo.

AGRADECIMENTOS

Confesso que esta foi a parte mais difícil de escrever, li vários agradecimentos em diversas dissertações e teses e todos eram sempre muito parecidos e seguiam um mesmo padrão, tentei fazer algo diferente de tudo que vi, aí comecei a bater cabeça, sobre como escreveria meus agradecimentos, pensei, pensei..... e não consegui mudar, pois acho **impossível** não começar agradecendo ao senhor de todas as coisas, **Deus**, uma vez que é **fato**, que sem a vontade **Dele** eu não teria chegado até aqui, por isso meu primeiro agradecimento é a **Ele**, por ter me guiado até aqui, me ajudado a passar por todas as adversidades, que não foram poucas, por ter acalmado minhas angústias, enfim se cheguei ao final foi por **Deus**, por isso muito obrigada **meu Pai**.

A minha mãe **Nereide**, pelo apoio constante.

A minha filha **Marina**, que é a força que busco nos momentos difíceis, chegar em casa e vê seu sorriso me esperando ao final de um dia cheio, me dá toda a energia que preciso pra continuar sempre. Obrigada, filha simplesmente por existir.

Ao meu marido **Clóvis**, pelo apoio e por estar ao meu lado.

Aos meus irmãos, irmãs, cunhadas, cunhados, sobrinhos e sobrinhas pela torcida.

Ao meu orientador **Gustavo Góes Cavalcante** pela confiança, orientação, paciência, apoio nas horas mais difíceis, ensinamentos enfim obrigada, principalmente, pelo ser humano que você é.

A Professora Alessandra Scofield, pela co-orientação e apoio na execução desta pesquisa.

Aos professores do **PPGSAAM** pelas informações valiosas durante a obtenção dos créditos.

Aos colegas do **PPGSAAM**, turma de 2011 pela convivência e amizades.

Aos colegas do laboratório de parasitologia animal, **Verúcia, Lilian, PC, PG, Junior Nerd, Lú, Diana, Lais, Atimaan, Adlilton, Fabio e Kaká**, pela ajuda e convivência durante todo esse período.

A Amiga **Rafaelle**, meu muito obrigado, por **TODA** ajuda que você me deu ao longo da realização deste trabalho.

Ao amigo **André Marcelo** pelo apoio e incentivo para a realização deste mestrado.

Ao **Centro de Controle de Zoonoses**, na figura de sua diretora **Regina Perezino**, pela oportunidade de realizar parte de minhas coletas em suas instalações.

A Dra. **Márcia Valéria Bentes Alves**, médica veterinária do CCZ, o meu agradecimento pela sua imensurável colaboração nas coletas.

Aos funcionários e estagiários do **CCZ**, **Mauro**, **Lenise** (*In memorian*) e **Jorge** pela colaboração nas coletas.

Ao **Projeto Vida Digna**, seus estagiários e especialmente à Médica Veterinária responsável **Dra. Márcia Mesquita de Figueiredo** pelo apoio nas coletas ali realizadas.

A **Flavia Oliveira**, responsável pelo laboratório de análises clínicas do HOVET-UFRA, e aos **residentes** e **estagiários** pela colaboração na realização dos hemogramas.

Ao Professor **Evonnildo Gonçalves** pela sua imensa colaboração nesta pesquisa.

A todos os **felinos** que doaram uma pequena amostra de seu sangue para a realização deste trabalho.

A todos que **direta** ou **indiretamente** ajudaram a realizar este projeto, **muito obrigada**.

EPÍGRAFE

Viver e não ter vergonha de ser
feliz.

Cantar a beleza de ser um
ETERNO APRENDIZ.

Gonzaguinha

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. HISTÓRICO	20
2.2. AGENTE ETIOLÓGICO	21
2.3. EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.4. SINAIS CLÍNICOS.....	25
2.5. TRANSMISSÃO	27
2.6. DIAGNÓSTICO	28
2.7. PROFILXIA	30
2.8. TRATAMENTO	30
3. OBJETIVO	32
3.1. GERAL	32
3.2. ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. COMITÊ DE ÉTICA.....	33
4.2. LOCAL DE ESTUDO.....	33
4.3. OS ANIMAIS	34
4.4. COLETA DO MATERIAL.....	35
4.5. ESFREGAÇO SANGUÍNEO	35
4.6. HEMOGRAMA	36
4.7. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	37
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS	40
5.1. ESFREGAÇO SANGUÍNEO	40
5.2. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE	41
5.3. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS	44
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	51
APÊNDICE	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Presença de *Mycoplasma* spp. na superfície do eritrócito (Seta Preta). 21
- Figura 2:** Microscopia eletrônica de varredura das hemácias de um gato infectado com *Candidatus Mycoplasma turicensis*: Presença de formas discoides de aproximadamente 0,3 µm de diâmetro na superfície da hemácia. As barras representam 1 µm (WILLI et al., 2011). 22
- Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão mostra a imagem de *Mycoplasma haemofelis* sobre a hemácia de um gato infectado (WILLI et al., 2011) 22
- Figura 4:** Regiões do Brasil onde foram desenvolvidos trabalhos sobre micoplasmas. 24
- Figura 5:** Parte da área de Belém (Balão) e local aproximado das coletas, UFRA (estrelas vermelha) e CCZ (estrela azul). 34
- Figura 6:** Perfuração da ponta da orelha com agulha hipodérmica 25 x 7 (A), exteriorização da gota de sangue após pressão no local da perfuração (B). Transferência da gota para a lâmina (C) e confecção do esfregaço (D). 36
- Figura 7:** Presença de *Mycoplasma* spp. em esfregaço sanguíneo de gato. (Seta Preta). 40
- Figura 8:** Gel de agarose 2% corado com Brometo de etídio, os amplicons com 180 pb mostrados na foto são de DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Onde M: Marcador molecular de 100 pb; C+: Controle positivo; 1-9 amostras teste, sendo a amostra 7 negativa, 8-10 amostras positivas, 11-14 amostras negativas, 15-C-, 16- NO. 42

Figura 9: Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio, o amplicom com 400 pb mostrados na foto são de DNA de *Mycoplasma haemofelis*. Onde M: Marcador molecular de 100 pares de base, poço 1 com controle positivo e poços de 2-14 com amostras negativas, 15- C-, 16- NO. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de animais estudados em função do local de coleta e sexo.....	35
Tabela 2: Frequência das amostras positivas no esfregaço sanguíneo de acordo com grupo experimental e sexo dos animais.	40
Tabela 3: Distribuição das amostras positivas para <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> de acordo com grupo experimental e sexo dos animais.	41
Tabela 4: Distribuição das amostras positivas para <i>Mycoplasma haemofelis</i> de acordo com grupo experimental e sexo dos animais.	43
Tabela 5: Descrição das alterações hematológicas dos animais considerados positivos no exame parasitológico em função do sexo e do grupo experimental.	45
Tabela 6: Descrição das alterações hematológicas dos animais positivos na PCR para <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> em função do sexo e grupo experimental.....	46
Tabela 7: Descrição das alterações hematológicas dos animais positivos na PCR para <i>Mycoplasma haemofelis</i> em função do sexo e grupo amostral.	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Quadro de valores de referência para hemograma felino.	62
---	----

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1: Certificação do Comitê de Ética.	63
Apêndice 2: Ficha de identificação para coleta de material.	64
Apêndice 3: Termo de autorização para inclusão do animal na pesquisa.	65
Apêndice 4: Tabelas de análises estatísticas.	66
Apêndice 5: Tabela de valores hematológicos dos animais do experimento. .	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Escala de concordância do indicador Kappa (ANDRADE e ZICKER, 1997).....	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm: Micrômetro

µg: Micrograma

µL: Microlitro

ABINPET: Associação brasileira da indústria de produtos para animais de estimação.

AIF: Anemia Infecciosa Felina.

ANFALPET: Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para animais de estimação.

CCBS: Centro de Ciências Biológicas da Saúde

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses

CEUA: Comitê de ética no Uso de Animais

CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CPDA: Citrato Fosfato Dextrose Adenina.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

EDTA: Acido Etileno Diamino Tetracético.

EUA: Estados Unidos da América.

FELV: Vírus da Leucemia Felina

FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina.

Hb: Hemoglobina

HIV: Vírus da imunodeficiência Humana

HOVET: Hospital Veterinário

Ht: Hematócrito

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IM: Intramuscular

Kg: Kilograma

LAC: Laboratório de Análises Clínicas

LPA: Laboratório de Parasitologia Animal.

Mg: Miligrama

MHF: Micoplasmose Hemotrópica Felina.

mL: Mililitros.

mm: Milímetros

PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase.

PMB: Prefeitura Municipal de Belém

SESPA: Secretaria de Saúde do Estado do Pará

UEPA: Universidade Estadual do Pará

UFRA: Universidade Federal Rural da Amazônia

UFPA: Universidade Federal do Pará

VCM: Volume Corpuscular Médio

RESUMO

Ocorrência de *mycoplasma* spp. e alterações hematológicas em gatos domésticos (*felis catus*) naturalmente infectados na cidade de Belém, Pará

Mycoplasma haemofelis, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* são os agentes causadores da micoplasmose felina, estes agentes são bactérias gram-negativas, pleomórficas, pequenas e que se aderem à superfície dos eritrócitos do animal acometido. Os sinais clínicos da micoplasmose felina são manifestações de anemia aguda ou crônica, ocorrendo perda de peso, anorexia, depressão, membranas mucosas pálidas, fraqueza, dores articulares, hiperestesia e, ocasionalmente esplenomegalia e icterícia, podendo o animal vir a óbito nos casos mais graves. O diagnóstico é baseado na detecção do parasita em esfregaços sanguíneos e também no diagnóstico molecular pela PCR. Objetivando determinar a ocorrência de *Mycoplasma* spp. em felinos domésticos da região de Belém-Pará, e as alterações hematológicas dos animais naturalmente infectados por estes parasitos, foram coletadas 201 amostras de sangue com EDTA para análise de hemograma e extração de DNA para realização de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) bem como esfregaços sanguíneos de ponta de orelha para detecção do parasita na superfície do eritrócito. Foram encontrados 5,47% (11/201) de positividade no exame de esfregaço sanguíneo, sendo 1,47% (1/68) de machos e 7,51% (10/133) de fêmeas. O DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* foi encontrado em 7,96% (16/201) dos animais onde 16,17% (11/68) eram machos e 3,75% (5/133) eram fêmeas, já *Mycoplasma haemofelis* foi detectado em 1,49% (3/201) das amostras, totalizando 2,94% (2/68) de machos e 0,75% (1/133) de fêmeas. O hemograma mostrou alterações em eritrócitos, volume globular e hemoglobina apenas nos animais em que foi detectado DNA de *Mycoplasma haemofelis*.

Palavras chave: *Mycoplasma* spp., micoplasmose e PCR.

ABSTRACT

Occurrence of *Mycoplasma* spp. and hematological changes in domestic cats (*Felis catus*) naturally infected in the city of Belém, Pará

Mycoplasma haemofelis, *Candidatus* *Mycoplasma haemominutum* and *Candidatus* *Mycoplasma turicensis* are the causative agents of feline mycoplasmosis, these agents are gram-negative, pleomorphic, small and that adhere to the surface of erythrocytes of the animal involved. Clinical signs of feline mycoplasmosis are manifestations of acute or chronic anemia, occurring weight loss, anorexia, depression, pale mucous membranes, weakness, joint pain, soreness and occasionally splenomegaly and jaundice, the animal may come to death in severe cases. The diagnosis is based on detection of the parasite in blood smears and also in molecular diagnostics using PCR. Aiming to determine the occurrence of *Mycoplasma* spp. in domestic cats in a region of Belém, Pará, and hematological changes of animals naturally infected by these parasites were collected 201 blood samples with EDTA for Count Blood Cells (CBC) analysis and extraction of DNA for performing the Polymerase Chain Reaction (PCR) as well as blood smears ear tip for detection of the parasite on the surface of erythrocyte. Found 5.47% (11/201) of positive examination of blood smears, being 1.47% (1/68) of males and 7.51% (10/133) than females. The DNA of *Candidatus* *Mycoplasma haemominutum* was found in 7.96% (16/201) where 16.17 % (11/68) were males and 3.75% (5/133) females, was detected *Mycoplasma haemofelis* in 1.49% (3/201) of samples totaling 2.94% (2/68) of males and 0.75% (1/133) of females. The CBC showed changes in erythrocytes, hematocrit and hemoglobin only in those animals with DNA of *Mycoplasma haemofelis*.

Key Words: *Mycoplasma* spp., *Mycoplasmosis*, PCR.

1. INTRODUÇÃO

O felino tornou-se o animal de estimação mais popular nos Estados Unidos, Canadá e Norte da Europa, e sua popularidade continua a crescer. Gatos são divertidos, carinhosos, bonitos, únicos e fascinantes. Proprietários de gatos amam seus animais de estimação e aproximadamente 78% os consideram como membros da família (RODAN, 2012).

O Brasil possui a segunda maior população de animais domésticos (Cães e gatos) do mundo, muito embora seja um dos poucos países em que o cão ainda é o animal de estimação preferido (ANFALPET, 2012).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet, 2012), o Brasil conta com cerca de 98 milhões de animais de estimação.

Em Belém do Pará, segundo a coordenação do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-SESPA) a população de gatos em 2006 era de 44.636 e em 2012 passou para 54.121, representando um aumento de 21,24% no período.

Micoplasmose hemotrófica felina (MHF) é um dos termos usados para denominar a infecção causada pelos agentes *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e/ou *Candidatus Mycoplasma turicensis* (SYKES, 2003; WILLI et al, 2005).

Os sinais clínicos dessa enfermidade estão relacionados com manifestações de anemia hemolítica aguda ou crônica (SOUZA, ALMONNY, 2002; PAGE, 2003).

O diagnóstico é estabelecido pela demonstração do organismo em esfregaços de sangue periféricos corados, cuja sensibilidade é bem reduzida (HAGIWARA, 2003). Outra forma de diagnóstico é a utilização da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), que é uma ferramenta diagnóstica mais sensível e permite ainda fazer diferenciação entre as espécies de micoplasmas (FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001)

Apesar da aquisição do felino, como animal de estimação, apresentar crescimento, o mesmo não tem sido observado em pesquisas científicas sobre hemoparasitoses nesta espécie, principalmente na região norte do Brasil. Desta forma, faz-se necessário determinar a ocorrência de *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum* em felinos da cidade de

Belém, e avaliar métodos de diagnóstico de esfregaço sanguíneo e PCR, além de se avaliar as alterações hematológicas dos animais estudados, relacionando-se a presença dos agentes com as alterações sanguíneas observadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

Wander (2009) citou que Clark em 1942, relatou na África do Sul uma infecção por hemoparasito em um gato com anemia grave, sendo denominado por ele de *Eperythrozoon felis*.

“Em 1953, nos EUA, Flint e Moss fazendo uso de um método experimental, descreveram um organismo semelhante ao citado por Clark em 1942, que estava causando anemia infecciosa em gatos. Pouco depois em 1955 Flint e Mckelvie sugeriram que esse organismo fosse nomeado de *Hemobartonella felis*, pois ao contrário da espécie *Eperythrozoon*, ele não era visto livremente no plasma, além de ter sido identificado formas anelares (APUD – WANDER, 2009)”.

A primeira descrição da doença em gatos domésticos no Brasil foi relatada em 1976 por Massard et al., e a primeira caracterização molecular da América do Sul de co-infecção por *Candidatus M. haemominutum* e *M. haemofelis* em três gatos domésticos foi relatada por Moraes et al., em 2007.

Em 1993 o microorganismo foi classificado na família Anaplasmataceae, na ordem Rickettsiales (CARNEY e ENGLAND, 1993), algum tempo depois Rikihisa et al. (1997), após a análise da sequência do gene 16S rRNA identificaram duas sequências distintas em gatos domésticos, sendo detectados dois isolados, Ohio e Califórnia. Novas análises do gene e das características fenotípicas demonstraram que alguns membros dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* foram transferidos para a classe Mollicutes sendo reclassificados como membros do gênero *Mycoplasma* onde então foram reclassificados (NEIMARK et al., 2001; 2002).

Os isolados de *H. felis*, Ohio e Califórnia, foram nomeados *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma Haemominutum*, respectivamente (NEIMARK et al., 2001)

Uma terceira espécie de *Mycoplasma* foi identificada em um gato na Suíça que apresentava anemia hemolítica sendo esta espécie denominada de *Candidatus Mycoplasma Turicensis* (WILLI et al., 2005)

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

Mycoplasma spp. é um parasita microscópico ($< 1 \mu\text{m}$), que afeta os eritrócitos, causando sua destruição (MORAES et al., 2007). São epitelulares, pleomórficos e se aderem à superfície do eritrócito do hospedeiro, sem invadir a célula (MESSICK, 2004).

Possuem forma de cocos, bastonetes ou ainda anelares, e, sob microscopia, óptica apresentam-se individuais, em pares ou em cadeias (MESSICK, 2003; MESSICK, 2004; HARVEY, 2006) (Figura 1). Não possuem parede celular nem flagelo, apresentam alta resistência à penicilina e seus análogos e são suscetíveis à tetraciclina (NEIMARK et al., 2001, 2002).

Duas variedades diferentes foram identificadas em gatos domésticos, Ohio (maior e mais patogênica), facilmente detectada nos eritrócitos dos esfregaços sanguíneos; e Califórnia (menos patogênica e com tamanho reduzido) (Figura 2 e 3).

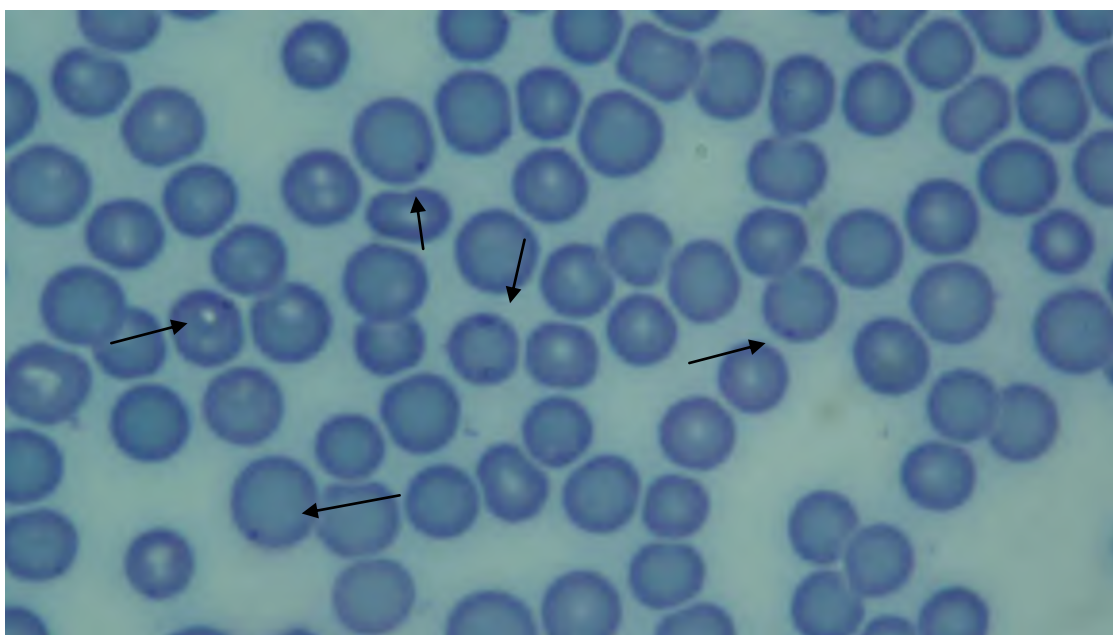


Figura 1: Presença de *Mycoplasma* spp. na superfície do eritrócito (Seta Preta).

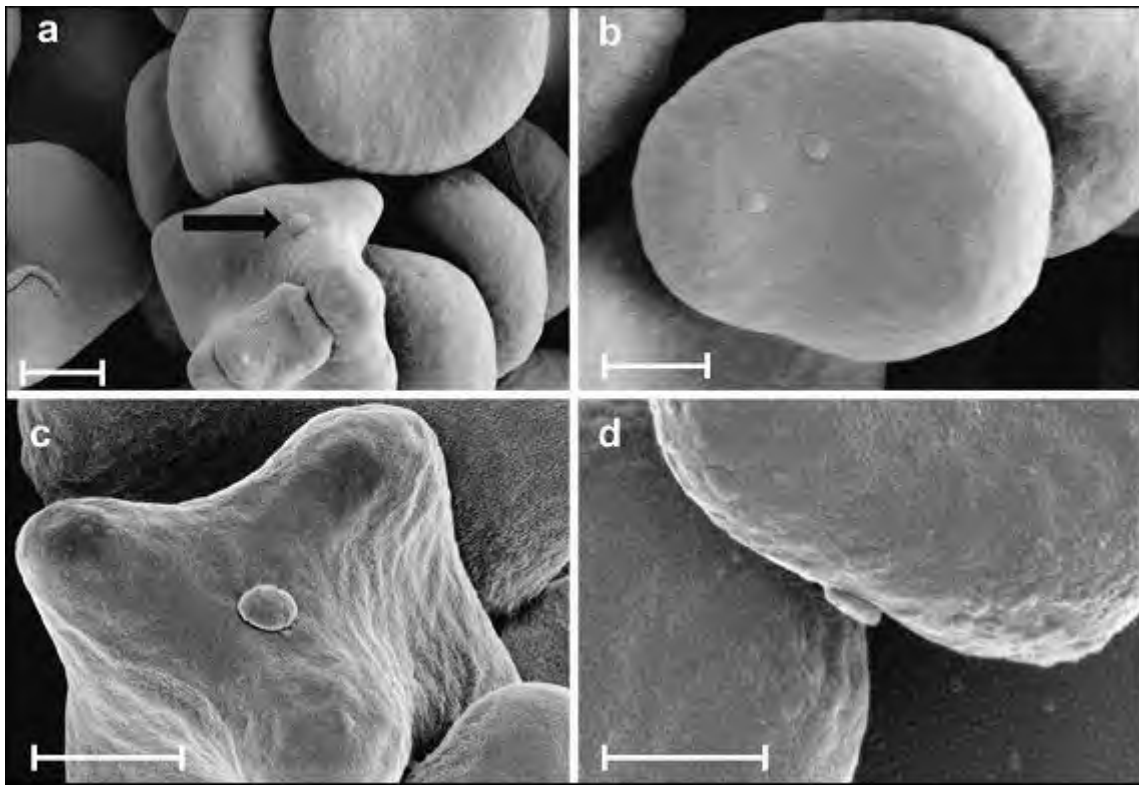


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura das hemácias de um gato infectado com *Candidatus Mycoplasma turicensis*: Presença de formas discoides de aproximadamente 0,3 μm de diâmetro na superfície da hemácia. As barras representam 1 μm (WILLI et al., 2011).

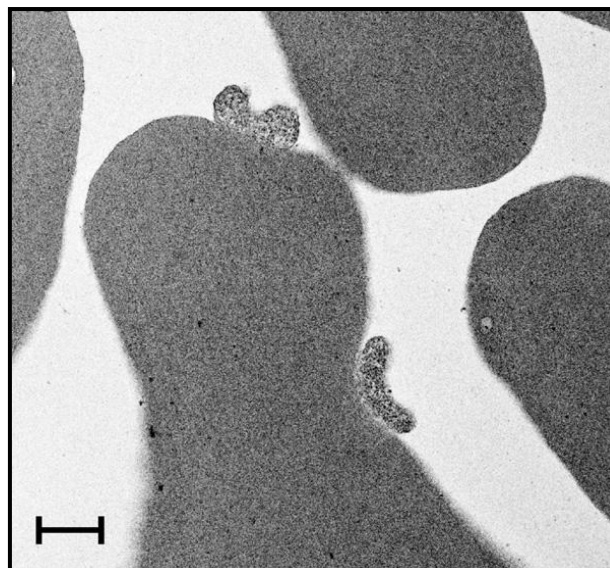


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão mostra a imagem de *Mycoplasma haemofelis* sobre a hemácia de um gato infectado (WILLI et al., 2011)

2.3. EPIDEMIOLOGIA

Devido à baixa sensibilidade dos testes rotineiramente aplicados para o diagnóstico de micoplasma, poucos estudos epidemiológicos de elevada acurácia sobre a infecção felina foram registrados antes do ano 2000 (SYKES, 2003). Portanto, muitas questões ainda precisam ser respondidas com o objetivo de esclarecer a epidemiologia desses agentes, principalmente o papel dos animais portadores assintomáticos. Não existe confirmação se esses gatos podem ou não serem fontes de infecção, ou ainda se a transmissão só ocorre na fase em que a doença é clinicamente ativa (URQUHART, 1998).

Alguns fatores de risco já foram identificados, o sexo parece influenciar, sendo os machos mais predispostos do que as fêmeas, talvez pelo seu comportamento, hábitos de deambulação e envolvimento em brigas. Com relação à faixa etária os gatos mais jovens são mais acometidos do que idosos. Gatos positivos para Imunodeficiência felina (FIV) e Leucemia viral felina (FELV) possuem maior risco de desenvolver os sinais clínicos, devido à imunossupressão (SYKES., 2003).

A infecção em seres humanos por espécies de *Mycoplasma* oriundas de animais são particularmente comuns em pacientes imunossuprimidos e essas infecções normalmente ocorrem em virtude do contato íntimo e duradouro desses indivíduos com animais domésticos (PITCHER e NICHOLAS, 2005).

Dos Santos et al. (2008) relataram um caso de paciente humano HIV positivo, com anemia e infecção por *Mycoplasma haemofelis-like* e *Bartonella henselae*, com o objetivo de tentar demonstrar a característica zoonótica deste agente no Brasil.

Existem vários trabalhos realizados no Brasil sobre micoplasmas. Em um estudo utilizando apenas diagnóstico em esfregaço sanguíneo, Miranda (2008) encontrou 26,66% (8/30) de positividade em lâminas de gatos oriundos de Belém-Pará, enquanto que em 371 gatos estudados em Porto Alegre (RS), através da PCR, 21,3% (79/371) foram positivo para pelo menos uma espécie de *Mycoplasma* (DOS SANTOS, 2008).

Hora (2008) encontrou 23/270 de gatos positivos para *Mycoplasma haemofelis* em um estudo realizado em São Paulo – SP, com a utilização de PCR. Ainda em São Paulo, mas na cidade de Botucatu, Metzeger (2009) em

um estudo com felídeos de vida livre, detectou 38,70% (12/31) de infecções por *Mycoplasma haemofelis* e/ou *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. No Distrito Federal Firmino (2008) trabalhou com hemograma, esfregaço sanguíneo e PCR, enquanto que Biondo et al. (2009) fez uma revisão sobre a ocorrência de micoplasmas no Brasil.

Existem estudos realizados associando a presença de *Mycoplasma* spp. com outras doenças em gatos como FIV, FELV e linfomas, (MACIEIRA, 2008; LEAL, 2009). Braga (2010) realizou um estudo usando diagnóstico molecular com a presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti- *Neospora caninum*, em gatos peridomiciliados na cidade de São Luís - MA, e das 200 amostras analisadas 5 (2,5%) foram positivas para *M. haemofelis*, 4 (2,0%) foram positivas para *Candidatus MycoplasmaTuricensis* e 20 (10%) foram positivos para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, totalizando 14,5% dos animais estudados (Figura 4).

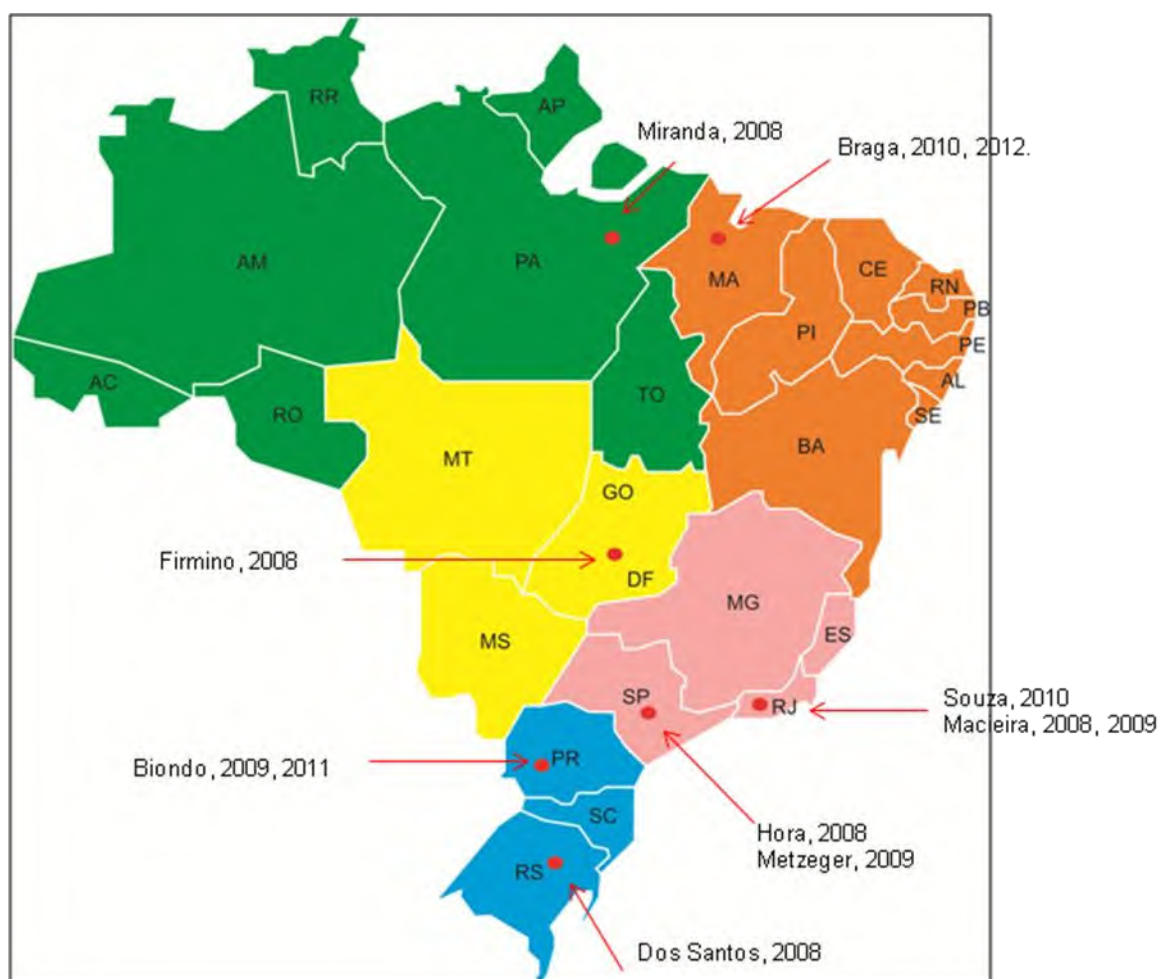


Figura 4: Regiões do Brasil onde foram desenvolvidos trabalhos sobre micoplasmas.

2.4. SINAIS CLÍNICOS

Infecções causadas por *M. haemofelis* em gatos geralmente causam anemia, enquanto que *Candidatus Mycoplasma haemominutum* causa infecção inaparente com mínima alteração no volume globular, e está associada a outras infecções, como FIV, FELV e neoplasias (HARVEY, 2006). Estas diferenças podem estar associadas à patogenicidade do agente (FOLEY et al., 1998; WILLI et al., 2007) e também a susceptibilidade do hospedeiro (MESSICK, 2004).

M. haemofelis pode ser um agente oportunista, estando presente em animais sadios, levando a manifestação de sinais quando esses são acometidos por outras enfermidades, submetidos a procedimentos cirúrgicos ou até mesmo a situações de estresse intenso (HARVEY, 2006).

O aparecimento da doença causada por *M. haemofelis* em gatos está relacionado com a infecção pelo vírus da FeLV visto que, em torno de 40% a 50% dos animais com a clínica de hemoplasmoses são FeLV positivo, pois a FeLV pode suprimir a resposta imunitária dos gatos, aumentando a suscetibilidade do animal. A associação das infecções por *M. haemofelis* e FeLV geralmente resultam em anemia mais severa do que em animais com apenas um dos agentes (HARVEY, 2006).

Candidatus M. haemominutum é considerado pouco patogênico e é detectado por técnicas moleculares em felinos sem sintomatologia (JENSEN et al., 2001), apesar de já ter sido diagnosticado em felinos com anemia (TASKER et al., 2003) associado, na maioria das vezes, a *M. haemofelis* (JENSEN et al., 2001; MORAES et al., 2007).

Candidatus M. turicensis, foi primeiramente detectado por Willi et al. (2005) e foi considerado tão patogênico quanto *M. haemofelis*, apesar de sua patogenicidade não estar muito bem definida.

Aproximadamente 50% dos gatos que são detectados infectados por *Mycoplasma* spp. apresentam sinais clínicos da doença, enquanto que os outros casos são detectados em exames de rotina de pacientes clinicamente saudáveis (FOLEY e PEDERSON, 2001).

Foley et al. (1998) citaram que após o estágio agudo da infecção por micoplasmas, os felinos infectados apresentam períodos assintomáticos e de agravamento do quadro.

Os sinais clínicos variam conforme o estágio da doença e a espécie de micoplasma envolvida (GRACE e NORSWORTHY, 2011). Os gatos que são infectados por *M. haemofelis* podem apresentar sinais que evoluem em poucos dias. Ao exame físico destaca-se fraqueza, desidratação, palidez de mucosas, além de icterícia, temperatura normal ou aumentada, taquipnéia e aumento de baço que pode ser percebido através da palpação (MORAES et al., 2007).

Os animais com infecção grave são geralmente hipotérmicos e podem morrer em poucos dias. Os casos de curso crônico podem ser percebidos pela perda de peso e anemia moderada. As consequências da infecção por longo prazo não são claras e os animais cronicamente infectados podem se tornar anêmicos e imunossuprimidos (HOELZLE, 2008).

Também se pode observar anemia hemolítica, anorexia, depressão, fraqueza, dores articulares, hiperestesia e, ocasionalmente membranas mucosas ictericas, podendo o animal vir a óbito em casos mais graves. Porém, os animais geralmente apresentam-se alertas e moderadamente ativos, mesmo com anemia ou febre, podendo apresentar apenas sinais de apatia (SOUZA e ALMONNY, 2002; PAGE, 2003; WANDER, 2009;). Existe um relato que associa a presença de *M. haemofelis* com meningoencefalite, em um felino de 10 meses. (BEAUCHAMP et al., 2011).

Na doença subclínica, os animais apresentam apenas uma anemia discreta. Os sinais clínicos estão na dependência da fase da doença e da rapidez com que se desenvolve a anemia. Se o desenvolvimento da anemia for gradual, o gato pode exibir perda de peso, mas se mantém vivaz e alerta. Ao contrário, a diminuição rápida e acentuada do hematócrito, em associação com a parasitemia elevada, pode causar pouca diminuição do peso corporal, mas uma marcante depressão (HAGIWARA, 2003).

Alguns autores relacionam o grau de anemia com a espécie do parasito que está acometendo o felino. Segundo Berent, Messick e Cooper (1998), a infecção por *M. haemofelis* geralmente resulta em anemia hemolítica severa enquanto que a infecção por *Candidatus M. haemominutum* normalmente não desenvolve sinais clínicos (FOLEY et al., 1998. WESTFALL et al., 2001). A

infecção experimental por *Candidatus Mycoplasma turicensis* resultou em uma anemia moderada a severa (WILLI et al., 2005). Segundo Messick (2003) a hemólise extravascular é responsável pelos quadros de esplenomegalia e icterícia.

2.5. TRANSMISSÃO

Existem poucas informações sobre a transmissão das diferentes espécies de micoplasmas que acometem felinos, mas existem fortes indícios de que a infecção pode ser causada pela ingestão ou injeção parenteral de sangue infectado (BERENT, MESSICK e COOPER, 1998).

Acredita-se também que a transmissão de *M haemofelis* pode ocorrer principalmente por artrópodes hematófagos e também há a possibilidade de ocorrer por feridas causadas por mordeduras. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a possibilidade da transmissão de micoplasmas em decorrência de brigas entre os felinos, pelo comportamento de lambeduras ou pelo compartilhamento de comedouros e bebedouros por vários animais (GRACE, 2004).

A transmissão experimental de micoplasmas já foi descrita por via intravenosa, intraperitoneal ou oral com sangue fresco de gatos infectados (TASKER, 2006). Dean et al. (2008), realizaram amplificação de DNA, usando “PCR em tempo real”, de glândula salivar de gatos infectados experimentalmente com *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

Transfusão sanguínea de animais portadores pode produzir a doença aguda em gatos susceptíveis (WILLI et al., 2006). Small e Ristic (1987) sugerem que esta forma de transmissão pode ser considerada como iatrogênica. Gary et al. (2006), detectaram que o *Mycoplasma haemofelis* sobrevive por cerca de 1 hora, enquanto que o *Candidatus Mycoplasma haemominutum* sobrevive por até 1 semana em soluções para transfusão com Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina (CPDA-1).

É possível ocorrer transmissão vertical, mas ela é considerada pouco importante, Carney e England, (1993), observaram a presença de *M. haemofelis* em filhotes de gatas portadoras após três horas de nascidos, corroborando

com Page (2003), que cita que já houve descrição de infecção em recém nascidos mesmo na ausência de artrópodes hematófagos. Mas segundo Harvey (2006) não está estabelecido se a forma de transmissão se dá por via uterina ou durante o parto, ou ainda nos cuidados de higiene e limpeza da mãe com os filhotes.

Segundo Souza e Almosny (2002), as pulgas das espécies *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis* e *Pulex irritans* são os principais vetores. Woods et al. (2005), detectaram o DNA de *M. haemofelis* e de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* em ovos, larvas e adultos de *C. felis* experimentalmente infectados. Esses mesmos autores também comprovaram a transmissão de *M. haemofelis* através do hábito de hematofagia dessa espécie de pulga.

Apesar de ser uma importante causa de anemia em gatos, ainda existem poucas informações disponíveis em relação à epidemiologia de *Mycoplasma* spp. Um dos principais fatores limitantes à investigação desse organismo é que ainda não há sucesso no seu cultivo fora do hospedeiro. Contudo, mais recentemente, estudos moleculares têm contribuído para o entendimento sobre os aspectos epidemiológicos e patogênicos de micoplasmas em felinos (ISHAK, RODECKI e LAPPIN, 2007; MORAES et al., 2007; NOVACCO et al, 2012).

2.6. DIAGNÓSTICO

O insucesso no cultivo de *M. haemofelis* fez com que durante muito tempo o diagnóstico da infecção fosse baseado na detecção do parasito na superfície do eritrócito, mas muitos fatores influenciam na capacidade diagnóstica desse teste (TASKER e LAPPIN, 2002). O esfregaço deve ser cuidadosamente examinado para evitar confusões com corpúsculo de Howell-Jolly, corpúsculo de Heinz, precipitados de corante ou até mesmo outros hemoparasitos como *Cytauxzoon* spp. (BUTT, 1990; SYKES, 2003; HARVEY, 2006).

Outro problema na detecção de *M. hemofelis* é a sua parasitemia cíclica. Por isso os esfregaços sanguíneos devem ser examinados em dias consecutivos entre pelo menos 10 a 14 dias. Além disso, *M. hemofelis* é

removido dos eritrócitos por agentes quelantes, como o ácido-etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), assim, em amostras de sangue armazenadas com EDTA, o número de eritrócitos com *M. haemofelis* decresce com o tempo e em alguns casos pode desaparecer em até 3 horas após o armazenamento. Desta forma, os esfregaços devem ser feitos com sangue fresco, para evitar resultados falso-negativos. (HAGIWARA, 2003; GRACE. 2011).

Quando *M. haemofelis* é observado não se deve resultar em um diagnóstico de micoplasmose, pois após a identificação do parasito deve-se associar o diagnóstico aos sinais clínicos do paciente, deve-se também investigar alguma causa adjacente, pois a micoplasmose pode ocorrer secundariamente à outra doença ou um evento gerador de estresse (GRACE, 2004).

A alta frequência de falso-negativos na avaliação microscópica de esfregaços sanguíneos resulta em subnotificação dessa infecção. A sensibilidade do diagnóstico utilizando-se o esfregaço sanguíneo é bem menor quando comparada com os resultados obtidos pela PCR (WESTFALL et al., 2001).

A técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é notadamente mais sensível do que o esfregaço sanguíneo para o diagnóstico e permite a diferenciação das espécies de micoplasmas (BERENT, MESSICK e COOPER, 1998; FOLEY et al., 1998; WESTFALL et al., 2001), sendo atualmente o teste de escolha para o diagnóstico da infecção por *M. haemofelis* devido ser comercialmente viável em muitos laboratórios. Sendo muitas vezes utilizados para avaliar a eficácia de tratamento (TASKER e LAPPIN, 2002).

O exame da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular sensível que permite a amplificação de um fragmento particular de DNA de um microorganismo (MESSICK 2003), e a amplificação do gene 16S do DNA ribossômico é a base para vários ensaios de PCR desenvolvidos para a detecção de hemoplasmas hemotrópicos (FOLEY et al., 1998, BERENT, MESSICK e COOPER 1998, JENSEN et al., 2001, GARY et al., 2006; MORAES et al., 2007; BIONDO et al., 2009)

Macieira et al. (2009) concluíram em seu estudo que a técnica de Southern Blot/Hibridização (SB) com sondas específicas foi mais sensível do

que a PCR realizada isoladamente, sendo um método complementar para o diagnóstico das infecções causadas pelos hemoplasmas felinos.

2.7. PROFILXIA

Tratamento para prevenção de infestações por ectoparasitas previnem a infecção por micoplasmas e outros patógenos (HARVEY, 2006). Minimizar fatores de risco evitando que animais tenham acesso a rua, reduzindo risco de brigas, conseqüentemente diminuem as chances de infecção (TASKER, 2006). Segundo Harvey (2006) a transmissão iatrogênica pode ser evitada usando-se exames de triagem em animais doadores, como os testes moleculares.

2.8. TRATAMENTO

O tratamento se faz necessário devido mais de um terço de animais com infecção aguda por *M. haemofelis*, não tratados virem a óbito devido à anemia grave (HARVEY, 2006)

A literatura recomenda o uso de tetraciclina na dosagem de 20 mg/kg/8x8 horas/21 dias, porém esta droga não elimina totalmente o parasita e desta forma pode fazer com que os animais recuperados permaneçam infectados de forma crônica (BERENT, MESSICK e COOPER, 1998 ; GAUNT, 2000).

A Doxiciclina (5-10 mg/12 ou 24 horas) falhou no tratamento de gatos infectados experimentalmente por *Candidatus Mycoplasma haemominutum*., mas para *Candidatus Mycoplasma turicensis* fez com que o parasita fosse eliminado após 2 semanas e estes animais permaneceram PCR negativos até 1 ano após o tratamento (WILLI et al., 2006).

A Azitromicina tem se mostrado eficaz em surtos de hemoplasmas no trato respiratório de humanos, mas foi ineficaz no tratamento do parasita nos eritrócitos na dose de 15 mg/kg/12 x 12 horas (WESTFALL et al., 2001).

Lappin et al. (2002) relataram que estudos demonstraram que o uso do dipropionato de imidocarb na dose de 5 mg/kg/IM/2 aplicações não é eficaz para erradicar a infecção por *M. haemofelis* ou por *Candidatus M. haemominutum*.

Segundo Ishak, et al. (2008) que usaram a Marbofloxacina, na dose de 2,75mg/Kg/24 horas/14dias no tratamento de gatos infectados, concluíram que a droga foi segura e resultou em uma melhora hematológica rápida nos animais infectados experimentalmente com *M. haemofelis*, mas não alterou escore clínico e não eliminou a infecção de forma consistente.

Administração de fluidos parenteral se faz necessário em casos de desidratação severa, como terapia de suporte. Hematócritos em queda rápida ou abaixo de 12% sugerem a necessidade de transfusão (TASKER, 2006)

Willi et al. (2005), não recomendam o uso de corticosteroide no tratamento da infecção por micoplasmas, pois os corticosteroides podem aumentar a parasitemia, como foi observado pelos autores em gatos infectados experimentalmente por *Candidatus M. turicensis*; porém Norsworthy (2004) sugere que o uso de prednisolona na dose de 1 a 2 mg/kg cada 12 ou 8 horas, pode ajudar a reduzir a eritrofagocitose, mas é necessário fazer um apoio nutricional com sonda oro ou nasogástrica.

3. OBJETIVO

3.1. GERAL

Determinar a ocorrência de *Mycoplasma* spp. em felinos domésticos da cidade de Belém - Pará.

3.2. ESPECÍFICOS

- Determinar as espécies de *Mycoplasma* spp. que acometem felinos da cidade de Belém-Pará.
- Identificar grupos de risco para a infecção por *Mycoplasma* spp.
- Comparar a eficiência diagnóstica das técnicas de esfregaço sanguíneo e reação em cadeia pela polimerase para o diagnóstico de *Mycoplasma* spp.
- Relacionar alterações hematológicas dos animais estudados, com a infecção por *Mycoplasma* spp.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COMITÊ DE ÉTICA

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Pará (CEUA-CCBS-UEPA) tendo sido aprovado em 22/06/2012, sob o número de protocolo 06/12. (Apêndice 1).

4.2. LOCAL DE ESTUDO

O local escolhido para o estudo foi a cidade de Belém, capital do estado do Pará, que se localiza na região norte do Brasil, com uma área de aproximadamente 1.059,406 km².(IBGE, Censo 2010).

Com uma população de 1.393.399 habitantes e maior densidade demográfica da região norte com 1.315,27 hab/km², (IBGE/2010), conta com uma população aproximada de 54.121 felinos (CCZ. 2012).

O relevo de Belém é de planície, possui clima equatorial e é banhada pelos rios Guamá, Amazonas e Maguari, possui temperatura média de 25^o C, mas nos meses de julho a novembro as temperaturas podem atingir mais de 35^o e o índice pluviométrico é de 2889 mm/ano (www.achetudoeregiao.com.br/pa/belem/localizacao.htm).

Os locais escolhidos para as coletas foram o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ-Belém), Projeto Vida Digna e Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia, todos situados na cidade de Belém (Figura 5)|

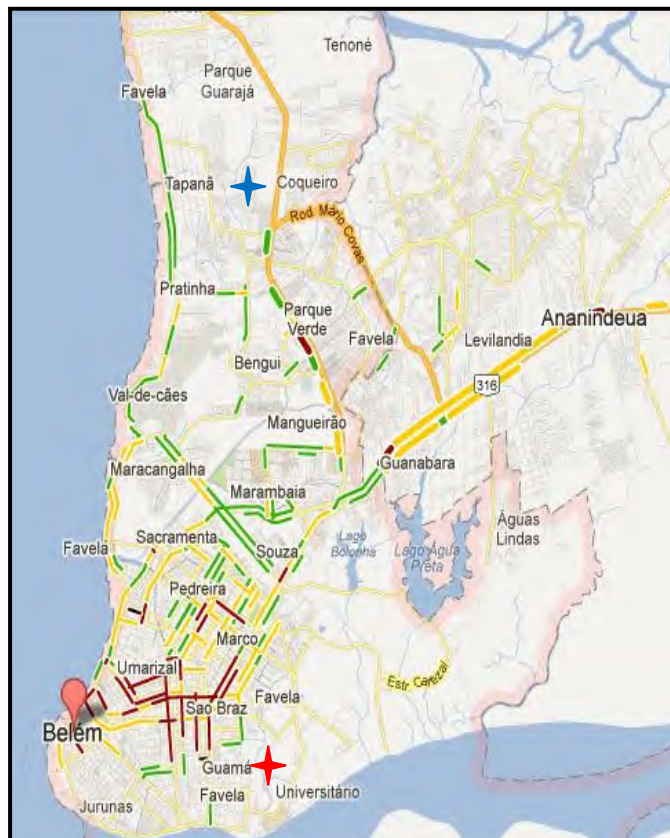


Figura 5: Parte da área de Belém (Balão) e local aproximado das coletas, UFRA (estrelas vermelha) e CCZ (estrela azul).

Fonte: Google Maps acesso em 02 de Janeiro de 2013

4.3. OS ANIMAIS

Foram incluídos no presente estudo 201 gatos domésticos, com idades variadas, sem preferência de sexo ou raça. Estes animais foram divididos em 3 grupos. O grupo A foi composto por animais errantes recolhidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Belém; o grupo B foi composto por animais clinicamente saudáveis que eram encaminhados a castração eletiva na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). O grupo C foi composto por animais oriundos do atendimento clínico do Hospital Veterinário da UFRA e que eram portadores de alguma afecção clínica. Os animais foram escolhidos de forma aleatória e as informações referentes aos grupos experimentais estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1: Quantidade de animais estudados em função do local de coleta e sexo.

Grupo	Machos	Fêmeas	Total
A	48	53	101
B	11	51	62
C	09	29	38

Os animais componentes desse estudo foram identificados em ficha de registro e seus proprietários assinaram um termo de autorização para a inclusão dos mesmos no projeto (Apêndices 2 e 3).

4.4. COLETA DO MATERIAL

A coleta de material ocorreu no período de setembro/2011 a abril / 2012 com todos os animais sendo submetidos à contenção física, tendo seu vaso garroteado por meio de pressão manual e a veia puncionada para a coleta do sangue. As punções foram realizadas nas veias cefálica ou femoral ou jugular, utilizando-se um scalp nº 25 ou nº 23 ou ainda agulha hipodérmica 25 x 7 acoplado a uma seringa de 5 ou 10 ml. Foram coletados em média 1,5 ml de sangue por gato, que foi armazenado em frasco tipo Vacutainer[®] contendo EDTA.

4.5. ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Imediatamente após a coleta do sangue, realizava-se a punção da ponta da orelha para a confecção do esfregaço sanguíneo. Realizava-se a antissepsia do local e com auxílio de uma agulha hipodérmica 25 x 7 perfurava-se a ponta da orelha com posterior pressão para saída do sangue e a gota exteriorizada era colocada em lâmina e o esfregaço era confeccionado (Figuras 5-A,B,C,D).

Os esfregaços de ponta de orelha foram fixados com metanol por 3 a 5 minutos, corados com Panótico Rápido[®], e analisado no microscópio óptico em objetiva de imersão, para detecção do parasita.

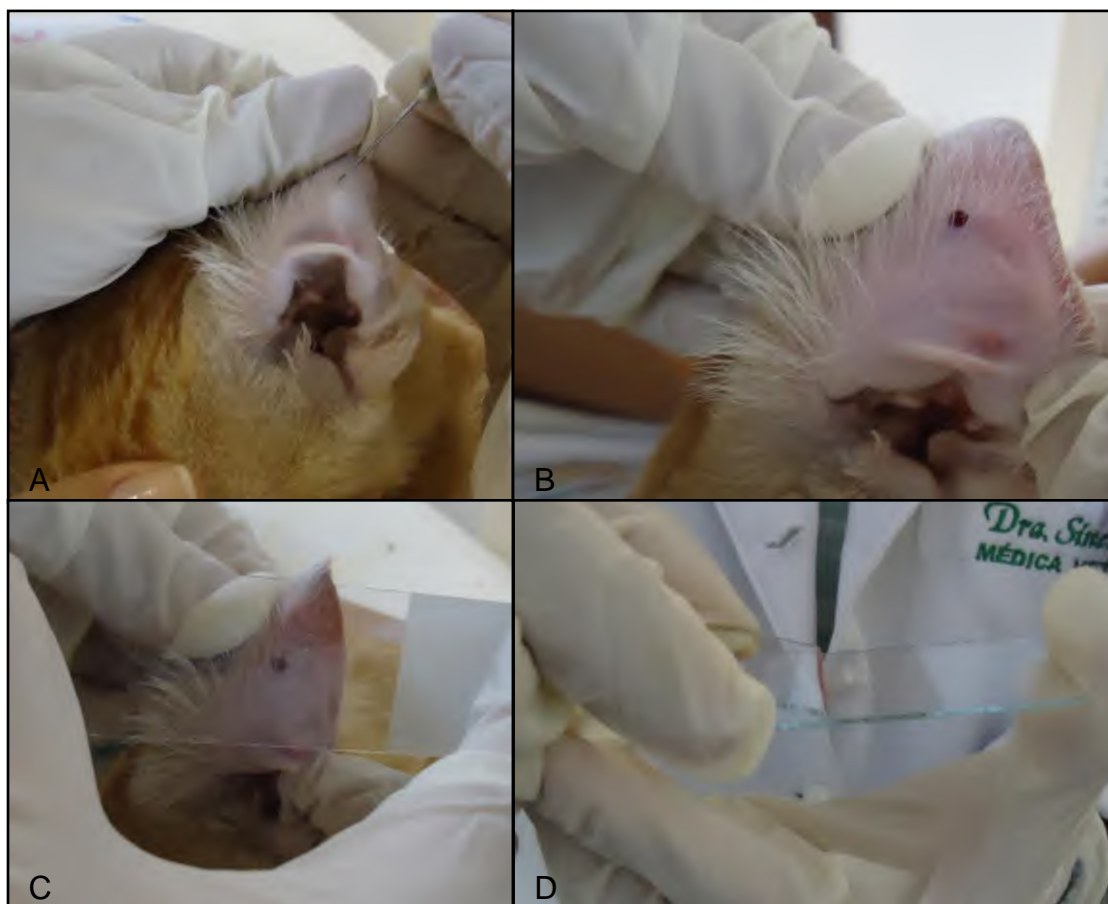


Figura 6: Perfuração da ponta da orelha com agulha hipodérmica 25 x 7 (A), exteriorização da gota de sangue após pressão no local da perfuração (B). Transferência da gota para a lâmina (C) e confecção do esfregaço (D).

4.6. HEMOGRAMA

Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFRA (LAC-HOVET-UFRA), em no máximo 24 horas após a coleta, realizados de forma manual, segundo Garcia – Navarro (2005).

Para a contagem de leucócitos e hemácias utilizava-se 0,4 ml de Solução de Turkey (Contagem de hemácias) e 4 ml de Solução de Gowen (Contagem de Leucócitos) em tubos de ensaio, em cada tubo era acrescentado 20 μ l de sangue. Uma quantidade desta mistura era retirada e colocada na câmara de Neubauer para contagem em microscópio óptico. Os resultados obtidos foram multiplicados pelos fatores de diluição e expressos em número de células/ μ l de sangue.

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido (Renylab Química e Farmacêutica),

contava-se 100 células, diferenciadas em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Os resultados obtidos foram expressos em valores relativos (%) e absolutos (células/ μ l de sangue). A contagem total de plaquetas foi realizada também no esfregaço sanguíneo por estimativa, onde se contava cinco campos e após, realizava-se a soma dos mesmos e o resultado obtido era multiplicado por 20.000 obtendo-se finalmente o número total de plaquetas.

.O hematócrito (Ht) foi determinado utilizando-se tubos capilares que foram preenchidos com sangue e centrifugados a 12.000 rpm /5 minutos e a determinação do Ht foi realizada em cartão de leitura de microhematócrito. Os resultados do hematócrito foram expressos em percentual.

A dosagem de hemoglobina foi realizada em aparelho de espectrofotômetro, e os resultados foram expressos em g/dL.

O Volume Globular Médio (VGM) e Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) foram calculados a partir dos resultados obtidos para hemácias, hemoglobina e hematócrito.

4.7. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As PCRs foram realizadas no laboratório de Parasitologia Animal da Universidade Federal do Pará (LPA-UFPA - Campus de Castanhal).

As reações ocorreram em um termociclador Multigene Labnet[®] da Labnet International. Inc e os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5 e 2% e corados com brometo de etídio (0,5 μ g/ml). O comprimento dos produtos amplificados foi estimado utilizando-se um padrão de 100 pares de base (100 Base-Pair-Ladder - GE Healthcare) em cada gel de corrida. A visualização dos produtos amplificados foi realizada em sistema de fotodocumentação com transiluminador UV Quantum ST41000/26M.

Inicialmente foram extraídos os DNAs a partir de 250 μ L do sangue coletado, utilizando-se o kit de extração de DNA genômico da Axygen Biosciences[®] seguindo-se as recomendações do fabricante.

As soluções de DNA foram armazenadas em alíquotas de 50 μ L em minitubos estéreis e livres de DNase`s, identificadas e estocadas em freezers.

Na primeira PCR para detecção de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* utilizou-se os iniciadores 1183F (5'-GCATAATGTGTC

GCAATC - 3') e 1290R (5'- GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC -3') que amplificam um produto de aproximadamente 180 pares de base do gene 16SrRNA, segundo Foley et al (1998). A temperatura de desnaturação foi de 94° C por 1 minuto, o anelamento ocorreu em 53° C por 1 minuto, extensão a 72° por 1 minuto e extensão final a 72° por 10 minutos, em 35 ciclos com um tempo final de 2 h e 22 minutos. O mix utilizado foi de 12,6 µL de água, 2,5 µL de tampão, 1,5 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1,0 µL de dntp 0,2 Mmol, 1,0 µL do par de primers diluídos a 20 pmol, 0,4 µL de Taq DNA polimerase 1000 U (Ludwig Biotec) e 5 µL de DNA totalizando uma solução final de 25 µL.

Para a detecção de *Mycoplasma haemofelis* utilizou-se os iniciadores Hfelis-fl (5'- GACTTTGGTTTCGGCCAAGG -3') e Hfelis-r3 (5'- CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC-3'), os quais amplificam um produto de 400pb do gene 16srRNA segundo Dos Santos (2008). As reações ocorreram com as seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial de 94°C em 45 segundos, anelamento a 54°C em 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos em 40 ciclos; O mix utilizado para esta reação foi de 12,6 µL de água, 2,5 µL de tampão, 1,5 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1,0 µL de dntp 3,0 Mmol, 1,0 µL do par de primers Hfelis fl e Hfelis R3, 0,4 µL de Taq DNA polimerase 1000 U (Ludwig Biotec) e 5 µL de DNA totalizando uma solução final de 25 µL.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concordância dos resultados obtidos nos exames de esfregaço sanguíneo e PCR foi avaliada através do indicador *Kappa* (*k*), conforme Andrade & Zicker (1997) (Quadro1).

O Qui-Quadrado foi aplicado para analisar a influência do sexo e o manejo, sobre a detecção do DNA de *Mycoplasma* spp. nos animais estudados, de acordo com Serra- Freire (2002), com nível de significância de 5%.

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a ocorrência dos hemoplasmas na população através da PCR com um nível de significância de 5%.

O risco relativo foi aplicado para avaliar a influência das características de cada grupo amostral em relação a presença do DNA de *Mycoplasma* spp. conforme Medronho (2006).

O teste t de Student foi empregado para comparar as diferenças entre as médias dos valores do hemograma dos animais positivos e negativos com nível de significância de 5%.

<i>Kappa</i>	Concordância
<0,00	Nenhum
0,00 – 0,20	Fraco
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Quadro 1: Escala de concordância do indicador Kappa (ANDRADE e ZICKER, 1997).

5. RESULTADOS

5.1. ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Do total de 201 amostras examinadas, 5,47 % (11/201) foram consideradas positivas no esfregaço sanguíneo (Figura 6), e a distribuição dessas amostras em função do grupo experimental e do sexo dos animais está disposta na Tabela 2.

Tabela 2: Frequência das amostras positivas no esfregaço sanguíneo de acordo com grupo experimental e sexo dos animais.

Grupo Experimental	Sexo		Total
	Macho	Fêmea	
A	0(0/48)	5,66% (3/53)	2,97% (3/101)
B	0(0/11)	9,80% (5/51)	8,06% (5/62)
C	11,11%(1/9)	6,89% (2/29)	7,89% (3/38)
Total	1,47%(1/68)	7,51%(10/133)	5,47% (11/201)



Figura 7: Presença de *Mycoplasma* spp. em esfregaço sanguíneo de gato. (Seta Preta).

5.2. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

Das 201 amostras testadas, em 9,45% (19/201) foi detectado DNA de pelo menos um dos parasitos estudados.

Houve diferença significativa quando se averiguou a influência do sexo do animal sobre a infecção por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* através da detecção do DNA do parasito pela PCR ($p= 0,002$), sendo mais frequente nos machos.

A distribuição das amostras em que foi detectado o DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* está disposta na tabela 3, e a figura 7 mostra os produtos de PCR para o referido parasito após eletroforese.

Tabela 3: Distribuição das amostras positivas para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* de acordo com grupo experimental e sexo dos animais.

Grupo Experimental	Sexo		Total
	Macho	Fêmea	
A	22,91% (11/48)	5,66% (3/53)	13,86% ^c (14/101)
B	0	1,96% (1/51)	1,61% ^d (1/62)
C	0	3,44% (1/29)	2,63% ^d (1/38)
Total	16,17% ^a (11/68)	3,75% ^b (5/133)	7,96% (16/201)

- Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.



Figura 8: Gel de agarose 2% corado com Brometo de etídio, os amplicons com 180 pb mostrados na foto são de DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Onde M: Marcador molecular de 100 pb; C+: Controle positivo; 1-9 amostras teste, sendo a amostra 7 negativa, 8-10 amostras positivas, 11-14 amostras negativas, 15-C-, 16- NO.

O DNA de *Mycoplasma haemofelis* foi detectado em 1,49% (3/201) dos animais, sendo dois animais pertencentes ao grupo A e um ao grupo C, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($p= 0,813$). Também não se observou diferença estatística significativa entre o sexo dos animais nos quais se detectaram o DNA de *Mycoplasma haemofelis* ($p=0,225$). A distribuição dessas amostras em função do grupo experimental e do sexo dos animais está disposta na tabela 4. A figura 8 mostra os produtos de PCR para *Mycoplasma haemofelis* após eletroforese.

Tabela 4: Distribuição das amostras positivas para *Mycoplasma haemofelis* de acordo com grupo experimental e sexo dos animais.

Grupo Experimental	Sexo		Total
	Macho	Fêmea	
A	2,08%(1/48)	1,88% (1/53)	1,98% ^a (2/101)
B	0	0	0
C	11,11% (1/9)	0	2,63% ^a (1/38)
Total	2,94% (2/68)	0,75% (1/133)	1,49% (3/201)

- Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

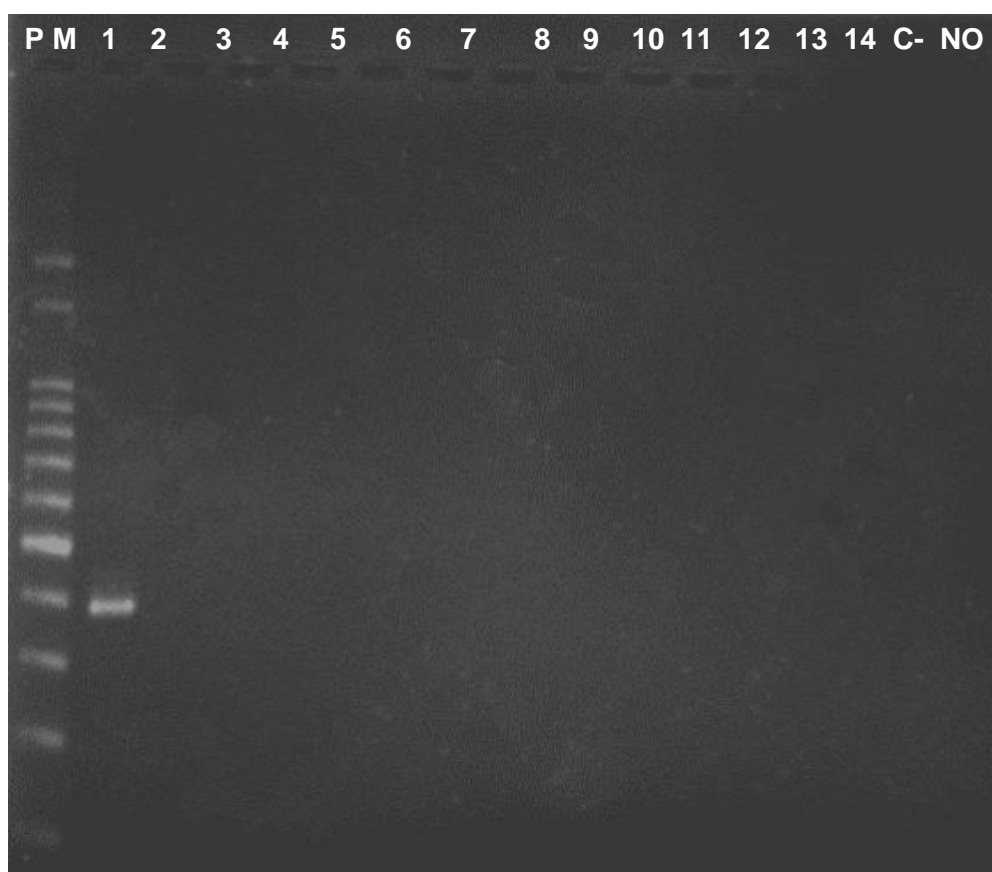


Figura 9: Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio, o amplicom com 400 pb mostrados na foto são de DNA de *Mycoplasma haemofelis*. Onde M: Marcador molecular de 100 pares de base, poço 1 com controle positivo e poços de 2-14 com amostras negativas, 15- C-, 16- NO.

Comparando-se a ocorrência dos hemoparasitos estudados, identificou-se que *Candidatus Mycoplasma haemominutum* foi mais frequente que *Mycoplasma haemofelis* ($p=0,036$).

O teste do indicador *Kappa* mostrou não haver concordância entre os resultados observados nos métodos de esfregaço sanguíneo e PCR aplicados na presente pesquisa ($K= -0,47368$), pois somente uma amostra foi positiva em ambos os exames.

O risco relativo mostrou que as chances de se detectar o DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* nos animais pertencentes ao grupo A do presente estudo foram 8,59 e 5,26 vezes maiores do que nos animais dos grupos B e C, respectivamente.

5.3. ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Nos animais considerados positivos, independente da técnica, foram detectadas diferentes alterações hematológicas. A descrição das alterações hematológicas dos animais considerados positivos no exame de esfregaço sanguíneo está disposta na tabela 5. Já as alterações hematológicas dos animais nos quais foram detectados o DNA de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Mycoplasma haemofelis* estão dispostos nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5: Descrição das alterações hematológicas dos animais considerados positivos no exame parasitológico em função do sexo e do grupo experimental.

Identificação do Animal	Hemograma	Sexo	Grupo Experimental
21	Anemia macrocítica hipocromica. Leucocitose com neutrofilia e eosinofilia	F	A
22	Leucocitose com neutrofilia e eosinofilia	F	A
29	NDN	F	A
94	NDN	F	B
126	NDN	F	B
139	Anemia macrocítica normocromica, trombocitopenia e leucopenia	F	B
170	NDN	F	B
01	Trombocitopenia	F	B
190	NDN	F	C
193	Anemia normocítica hipocrômica e trombocitopenia	M	C
33	Trombocitopenia	F	C

NDN- Nada Digno de Nota

Tabela 6: Descrição das alterações hematológicas dos animais positivos na PCR para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* em função do sexo e grupo experimental.

Identificação do Animal	Hemograma	Sexo	Grupo Experimental
15	Leucocitose com neutrofilia e eosinofilia	M	A
18	NDN	M	A
23	Anemia macrocítica hipocromica	M	A
37	Anemia macrocítica hipocromica	F	A
39	Leucocitose com neutrofilia	M	A
44	Macroplaquetas	M	A
53	Trombocitopenia	M	A
55	Aumento de hb e VG	M	A
58	Aumento de hb e VG	M	A
72	Diminuição de plaquetas	F	A
77	Trombocitose	M	A
120	Leucocitose com neutrofilia e eosinofilia	M	A
140	Leucocitose com neutrofilia e eosinofilia	M	A
146	Leucocitose com eosinofilia, monocitose e neutrofilia	F	A
47	NDN	F	C
128	Trombocitopenia	F	B

NDN – Nada digno de nota

Tabela 7: Descrição das alterações hematológicas dos animais positivos na PCR para *Mycoplasma haemofelis* em função do sexo e grupo amostral.

Identificação do Animal	Hemograma	Sexo	Grupo Experimental
30	Leucocitose com neutrofilia e eosinofilia	F	A
86	Anemia Macroscítica hipocrômica, Leucocitose com monocitose e neutrofilia	M	A
193	Anemia macroscítica hipocrômica trombocitopenia	M	C

O teste T de Student mostrou significância estatística apenas quando comparou os valores médios dos eritrócitos ($p=0,005$), volume globular ($p=0,001$) e hemoglobina ($p= 0,001$) dos animais em que se detectou o DNA de *Mycoplasma haemofelis*, quando comparados aos mesmos parâmetros de animais negativos.

6. DISCUSSÃO

Proporcionalmente ao número de felinos domésticos no Brasil, existem poucos trabalhos investigando os diferentes aspectos da infecção por *Mycoplasma* spp. em gatos realizados no país, principalmente utilizando ferramentas de biologia molecular. Essa escassez se torna mais evidente quando se pesquisa trabalhos dessa natureza realizados na região norte (BIONDO et al., 2009).

Embora hemoplasmas sejam frequentemente detectados em lâminas de sangue de gatos no Brasil, os trabalhos que investigam a ocorrência desses agentes apontam a PCR como método de eleição para o diagnóstico direto do parasito, em virtude da maior sensibilidade e especificidade quando comparado ao esfregaço sanguíneo (SYKES, 2003), podendo revelar infecções críticas, comuns em estudos epidemiológicos onde os animais são selecionados de forma randômica conforme o observado por Foley et al., (1998).

As três espécies de hemoplasmas de felinos atualmente reconhecidas, já foram diagnosticadas no Brasil, contudo, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* foram detectadas apenas através de ferramentas moleculares (MORAES et al., 2007; SANTOS, 2008; BIONDO et al., 2009).

A maior sensibilidade da PCR ocorre em virtude das dimensões diminutas de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis* (FOLEY & PEDERSEN, 2001; WILLI et al., 2011). Até mesmo *Mycoplasma haemofelis*, que é maior que as duas espécies citadas anteriormente, é de difícil diagnóstico através da microscopia óptica, principalmente em animais sem sinais clínicos, devido ocorrerem em baixa parasitemia, além do fato de poderem ser facilmente confundidos com artefatos ou detritos celulares, o que provavelmente ocorreu no presente estudo, pois não houve concordância alguma entre os resultados do esfregaço sanguíneo e das PCRs.

Baseado nesses fatos buscou-se utilizar no presente estudo, além do esfregaço sanguíneo, a técnica molecular, pois com o emprego de ferramentas de diagnóstico molecular aumenta-se a acurácia da observação, o que é de grande interesse em estudos de cunho epidemiológico (SANTOS, 2008).

A partir desses preceitos, a taxa de infecção por hemoplasmas no presente estudo (9,45%) está de acordo com o reportado por Souza e Almosny (2002), que citaram que a ocorrência deste parasito na população felina é estimada entre 4,9 a 23,3%. Entretanto estes resultados são menores que as taxas observadas em estudos moleculares realizados em outras capitais do Brasil como: 21,3% em Porto Alegre (SANTOS et al., 2008), 12,1% no Rio de Janeiro (MACIEIRA et al., 2009); 14,5% em São Luís (BRAGA et al., 2012). Essa diferença aumenta quando se comparam o índice de infecção observado no presente estudo através da PCR, com os reportados por Mendes-de-Almeida (2004) que detectou 38% de amostras positivas de gatos no Rio de Janeiro, e Miranda (2008) que encontrou um índice de amostras positivas de 26,6% de felinos do município de Belém, ambos através do esfregaço sanguíneo.

A análise comparativa entre as taxas de infecção por *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e os diferentes grupos amostrais, que identificou o maior número de animais positivos no grupo A, indica que o comportamento errante ou o manejo dos animais no CCZ, caracterizado pelo confinamento de vários animais em uma mesma gaiola, são fatores de risco para essa infecção.

Sykes (2003) relatou que a infecção nos machos foi 2,5 vezes maior que nas fêmeas em um estudo com 374 gatos, semelhante ao observado na presente pesquisa fundamentando a informação da literatura de que felinos machos estão mais expostos devido a hábitos de deambulação e brigas.

Apesar de se ter observado diferença significativa entre as taxas de infecção por *Mycoplasma haemofelis* em função dos grupos amostrais, não se pôde realizar a análise de risco em função do pequeno número de amostras reagentes. Desse modo, também se deve encarar essa diferença com cautela, sem determinar um grupo de risco para essa infecção.

A análise comparativa da ocorrência dos hemoparasitos estudados demonstrou uma maior ocorrência de *Candidatus M. haemominutum* em comparação com *Mycoplasma haemofelis* ($p=0,0036$). Estudos realizados no Brasil, e que utilizaram a PCR como ferramenta diagnóstica, também demonstrou a mesma tendência (DOS SANTOS, 2008; BRAGA, 2010; BARTOLI et al., 2012).

Esse fato pode se dar pela diferença de patogenicidade entre esses agentes, sendo *Candidatus M. haemominutum* menos patogênico, portanto é mais bem sucedido no estabelecimento do equilíbrio da relação parasito-hospedeiro, conseguindo manter a infecção sem desencadear doença grave, fato que é mais associado ao parasitismo por *M. haemofelis* (SYKES, 2010). Desse modo, os animais parasitados por essa bactéria necessitam estabelecer baixos níveis de parasitemia para continuarem vivos. Essa teoria também encontra fundamento na comparação dos parâmetros hematológicos observados nos animais infectados pelos hemoplasmas estudados.

Alterações no eritrograma como anemia, diminuição do volume globular e trombocitopenia (MORAES et al., 2007), e alterações no leucograma como leucocitose são considerados achados comuns nos quadros de hemoplasmosse felina (FOLEY et al., 1998; SYKES, 2010; GRACE, 2011).

A diferença dos valores médios dos parâmetros hematológicos observados foi encontrada apenas nos padrões hematológicos dos animais nos quais foi detectado o DNA de *M. haemofelis*, contudo, apesar do teste *t* ter aceitado a amostragem e indicado diferença significativa nos valores médios dos eritrócitos ($p=0,005$), volume globular ($p=0,001$) e hemoglobina ($p=0,005$), deve-se fazer a ressalva de que se identificaram apenas três amostras positivas para esse hemoparasito no presente estudo. Segundo Souza e Almosny (2002), gatos inoculados com *M. haemofelis* mostram alterações do Ht, Hb e hematimetria durante o período em que os parasitas aparecem nos eritrócitos.

Em virtude do exposto anteriormente, a anemia infecciosa felina deve entrar na lista de enfermidades a ser considerada pelos clínicos nos casos de alterações nos parâmetros do eritrograma ou em situações que podem levar os gatos a imunossupressão, como infecções por alguns retrovírus (MACIEIRA, 2008), visto que os agentes etiológicos dessa enfermidade infectam os animais da região metropolitana de Belém.

7. CONCLUSÕES

A partir da análise crítica dos resultados, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- *Mycoplasma* spp. circula entre os gatos domésticos da região metropolitana de Belém, sendo *Candidatus Mycoplasma haemominutum* mais frequente que *Mycoplasma haemofelis*.
- Gatos machos e mantidos no CCZ formam um grupo de risco para a infecção por *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.
- O esfregaço sanguíneo mostrou ser um método diagnóstico inapropriado para ser empregado em estudos epidemiológicos de *Mycoplasma* spp.
- Apenas a infecção por *Mycoplasma haemofelis* influenciou nos parâmetros hematológicos dos animais.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F. (Org.). Avaliação de testes diagnósticos. In: **Métodos de Investigação Epidemiológica Em Doenças Transmissíveis**. Brasília: OPAS: FNS, 1997, v. 1, p. 9-30.

BARTOLI, C. P.de ; ANDRÉ, M.R.; SEKI, M.C.; PINTO, A.A.MACHADO, S.T.Z.; MACHADO, R.Z. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.21 n.3, p.219-223, jul / set. 2012.

BEAUCHAMP, D. J; COSTA, R. C.; PREMANANDAN, C.; BURNS, C. G.; CUI, J.; DANIELS, J. D. Mycoplasma felis-associated meningoencephalomyelitis in a cat (Case Report). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Columbus, v. 13, n.2, p.139-143, feb.. 2011.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B.; COOPER, S. K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 59, n.10, p.1215–20, 1998.

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

BRAGA, M. S. O. **Diagnóstico molecular de hemoparasitas e frequência de anticorpos anti-toxoplasma gondii e anti-neospora caninum, em gatos peridomiciliados na cidade de São Luís, Maranhão**. 2010. 107f. Tese de Doutorado em medicina Veterinária – UNESP, Jaboticabal, SP, 2010.

_____; ANDRÉ, M.R. ; FRESCHI, C.R.; TEIXEIRA, M.C.A.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of hemoplasma infection among cats from São Luis Ireland, Maranhão, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.43, n.2, p. 569-575, apr/june, 2012.

BUTT, M. T. Diagnosing erythrocytic parasitic diseases in cats. In: **Compendium of continuing education for the practising veterinarian.**, v. 12, p.628–38, 1990.

CARNEY, H. C.; ENGLAND, J. J. Feline hemobartonellosis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 23, n.1, p. 79-90, jan, 1993.

DEAN, R. S.;HELPS, C. R.; JONES, T. J. D.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. **Journal of feline medicine and surgery (Short Communication)**, v.10, n.4, p.413-417, Aug, 2008.

SANTOS, A. P dos. **Infecção por hemoplasmas felinos na região de Porto Alegre – RS – Brasil.** 2008. 162f. Tese de Doutorado em ciências veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

_____; SANTOS, R.P.dos.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H.A.de.; GONZALEZ, F.H.D.; MESSICK, J.B. Hemoplasma Infection in HIV – Positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid**, v. 14, n. 12, 2008.

FELDMAN, F. B.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm`s veterinary hematology.** 5. ed. California: Lippincott Williams & Wilkins Davis, 2000.

FIRMINO, F. P. **Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos do Distrito Federal.** 2008. 56f. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

FOLEY, J. E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C.. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 12, p.1581- 8, 1998.

FOLEY, J. E.; PEDERSON, N.C. Candidatus *Mycoplasma haemominutum* a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology**, n.51, p. 815 – 817, 2001.

GARCIA-NAVARRO, C.E K.; Manual de hematologia veterinária. 2ed. Livraria Varela, 205p. 2005.

GARY, A.T.; RICHMOND, H.L.; TASKER, S.; HACKETT, T.B.; LAPPIN, M.R.. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in blood of cats used for transfusions. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, p.321- 326, 2006.

GAUNT, S. D. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and Protozoa. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. cap. 27, p. 154-162.

GEOGRAFIA da região de Belém: Disponível em: <<http://www.achetudoeregiao.com.br/pa/belem/localizacao.htm>>. Acesso em: 02 jan. 2013.

GRACE, S. F. Anemia In: GARY, D. **O paciente felino**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2004. cap. 69, p. 08-13.

_____. Anemia. In: GARY, D.; NORSWORTHY, MITCHELL A.; CRYSTAL, SHARON FOOSHEE; GRACE, LARRY P. TILLEY. **Feline patient** . 4. ed. Willey – Blackwell, p.19. 2011.

_____. NORSWORTHY, G. D.; Hemoplasmosis. In: GARY, D.; NORSWORTHY, MITCHELL A.; CRYSTAL, SHARON FOOSHEE GRACE; LARRY, P. TILLEY. **Feline patient**. 4. ed. Willey – Blackwell, p. 218. 2011.

HAGIWARA, M. K. Anemia. In: SOUZA, H. J. **Coletâneas em medicina e cirurgia felina**. Rio de Janeiro: LF Livros, 2003. cap. 2, p.15-24. 2003.

HARVEY, J. W. Haemobartonellosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, chap.3. p. 252- 265. 2006.

HOELZLE, L. E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in mycoplasma suis. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 215–226. 2008

HORA, A. S. **Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos**. 2008. 77f. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

INFORMAÇÕES sobre a cidade de Belém: Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 02 jan. 2013.

INFORMAÇÕES sobre população de cães e gatos no Brasil e no mundo: Disponível em:<<http://www.petshopmagazine.com.br/tag/anfalpet/>>. Acesso em: 15 nov. 2012.

ISHAK, A. M.; STEVE Rodecki; MICHAEL, R. Lappin. Prevalence of *mycoplasma haemofelis*, *candidatus mycoplasma haemominutum*, bartonella species, *erlichia* species, and *anaplasma phagocytophilium* dna in the blood of cats with anemia. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 9, p.1-7, 2007.

ISHAK,A.M.; DOWERS, K.L.; CAVANAUGH, M.T.; POWELL, C.C.; HAWLWY, J.R.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Marbofloxacin for the treatment of

experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. **Journal Veterinary Internal Medicine**, n.22, p. 288-292. 2008.

JENSEN, W. A.; LAPPIN, M.R.; SHERWIN KAMKAR ,B.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 Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 604-8, 2001.

LAPPIN, R. M.; BREWER, M.; RADECKI, S. Effects of imidocarb dipropionate in cats with chronic haemobartonellosis. **Veterinary Therapeutics**, v. 2, p. 144-9. 2002.

LEAL, M. L. G. **Avaliação da frequência da infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos com linfoma**. 2009. 87f. Dissertação em Medicina veterinária - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MACIEIRA, D. B. **Hemoplasmas em gatos domésticos: prevalência e sua associação à infecção natural pelo vírus da Imunodeficiência e / ou leucemia felina**. 2008. 108f. Tese em Ciências Veterinárias - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R.C.A.A.de.; DAMICO, C.B.; ALMOSNY N.R.P.; MESSICK, J.B.. Uso da técnica de Southern Blot/Hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 1-6, 2009. Suplemento.

MAPAS da cidade de Belém: Disponível em: <<http://maps.google.com.br/>>. Acesso em: 02 jan. 2013.

MASSARD. C. L.; et al. *Haemobartonella felis* Flint and McKelvie, 1955 (Rickettsiales: Anaplasmateceae) em hemáceas de *Felis catus domesticus* L. no continente Sul Americano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15. 1976, **Anais...** Rio de Janeiro, p. 1. 1976

MEDRONHO, R.A.; et al. **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu, 2006, 493p.

MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M.C.F.; BRANCO, A.S.; SERRÃO, M.L.; SOUZA, A.M.; ALMOSNY, N.; CHAME, M.; LABARTHE, N.. Sanitary conditions of a colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.5, p. 269-274, 2004.

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

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

METZGER, B. **Diagnóstico de hemoparasitas em felídeos neotropicais provenientes de vida livre no Brasil**. 2009.116f. Dissertação de Mestrado em Medicina veterinária – UNESP. Botucatu 2009.

MIRANDA, C. F. **Prevalência de *Mycoplasma haemofelis* (*Hemobartonella felis*) em gatos domésticos (*Felis catus*, LINAEUS, 1759) na região metropolitana de Belém**. 2008. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Clínica médica de Pequenos animais)- Universidade Castelo Branco. Belém, 2008.

MORAES. H. A.; GUIMARÃES, A.M.S.; VIDOTTO, O.; BAUMMAN, A.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* in three cats from Brazil (Short communication). **Journal of feline medicine and surgery**, v. 9, p. 518-520 2007.

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**, Brooklyn, v. 51, n. 3, p. 891–9, 2001.

NEIMARK, H.; et al. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, New York, v. 52, n. 2, p.683-4, 2002.

NORSWORTHY, G. D. In: GARY, D. **O paciente felino**, 2. ed. São Paulo: Manole, 2004. cap. 69, p. 299-302.

NOVACCO, M.; JÄCKEL, G.W.; RIOND, B.; HOFMANN-LEHMANN, R. Humoral immune response to a recombinant hemoplasma antigen in experimental *Candidatus Mycoplasma turicensis* infection (Short communication). **Veterinary Microbiology**, v.154, n.3-4 , p.7, June, 2012.

PAGE R. L. Hematologia/Oncologia: hemácias, leucócitos e plaquetas. In: **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. 2. ed. cap. 20, p.174. 2003.

PITCHER, D. G.; NICHOLAS. R. A. J. Mycoplasma host specificity: fact or fiction. **The veterinary journal**, v.170, p.300-306, 2005.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, BOHAI.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F. SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M.. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA sequences of *H. muris*, *H.felis* e *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.4, p. 823-829, 1997.

RISCO relativo. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Risco_relativo>. Acesso em: 09 fev. 2013.

RODAN, L. Understanding the Cat and Feline-Friendly Handling. In: LITTLE, S. **The cat clinical medicine and management**, Elsevier Saunders, v.15, n.3, p. 2-19, 2012.

SERRA-FREIRE, N. M. Testes de significância. In: _____. **Planejamento e análise de pesquisas parasitológicas**. Niteroi,RJ: Ed. Universidade Federal Fluminense, 2002. p. 169-173.

SMALL, E.; RISTIC, M. Hemobartonelosis. In: HOLZWORTH, J. **Disease of the cats: medicine & surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987. p.301-308.

SOUZA, A. M.; ALMONNY, N. R. P. Hemobartonelose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: ALMONSY, Nadia R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de veterinária, 2002. cap.5, p.90-101.

SYKES, J. E. Feline Hemotropic Mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Veterinary Clinics North America (Small Animal Practice.)**, v. 33, n. 4, p. 773-787, 2003.

_____. Feline Hemotropic Mycoplasmas. **Veterinary Clinics of Small Animal**, v. 40, p .157–1170, 2010.

TASKER, S.; HELPS, C.R.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A.. Use of Real-Time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” DNA. **Journal of clinical microbiology**, v.43, n.1, p.439–441, 2003.

_____. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In practice**, v.28, n.3, p.136-141, 2006.

_____; LAPPIN, M. R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 4, n. 1, p. 3–11, 2002.

URQUHART, G. M. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 1998.

WANDER, A. W. **Hemoplasmose felina**: relato de caso. 2009. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Universidade Castelo Branco, Porto Alegre, 2009.

WESTFALL, D. S.; JENSEN, A.W.; REAGAN, W.J.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R.. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p.687–691, 2001.

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.

_____; BORETTI, F.S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 961-969, 2006.

_____; 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**, n.125, p.197-209, 2007.

_____; MUSEUX, K.; NOVACCO, M.; SCHRANER, E.M.; WILD, P.; GROEBEL, K.; ZIEGLER, U.; WOLF-JACKEL, G.A.; KESSLER, Y.; GERET, C.; TASKER, S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First morphological

characterization of '*Candidatus mycoplasma turicensis*' using electron microscopy. **Veterinary Microbiology**, n.149, p. 367-373, 2011.

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

ANEXOS

Anexo 1: Quadro de valores de referência para hemograma felino.

	Felinos
Eritrócito(x 10 ⁶)	5.0 – 10.0
Hemoglobina (g/dl)	8.0- 15.0
VG (%)	24 – 45
VGM (fl)	39 – 55
CHCM (%)	31 – 35
Leucócitos totais	5.500 – 19.500
Bastonete µL/%	0-300 0-3
Neutrófilo µL/%	2.500 – 12.500 35 – 75
Linfócito µL/%	1.500- 7.000 25 – 55
Eosinófilo µL/%	0 – 1.500 2 – 12
Monócito µL/%	0 – 850 1 – 4
Basófilo µL/%	Raros
Plaqueta (x10 ³)	300 – 800

Fonte: Adaptado Schalm, 2000.

APÊNDICE

Apêndice 1: Certificação do Comitê de Ética.



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo N° 06/12.

Título do Projeto de Pesquisa: **Ocorrência de *Mycoplasma haemofelis* em felinos domésticos da região metropolitana de Belém-Pará.**

Pesquisador Responsável: **Prof. Dr. Gustavo Góes Cavalcante.**

Instituição: **Universidade Federal do Pará.**

Data do Parecer: 26/04/12.

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

LIBERADO para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega neste CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 22 de junho de 2012.

Rosa Helena de F. Chaves
MÉDICA VETERINÁRIA
CRMV/PA 2029

M.V. Esp. ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES
VICE-COORDENADORA DO CEUA/UEPA

Apêndice 2: Ficha de identificação para coleta de material.

Universidade Federal do Pará
 Programa de Pós Graduação em Saúde Animal na Amazônia
 Orientador: Prof. Dr. Gustavo Góes Cavalcante
 Aluna: Sinerey Karla Salim Aragão de Sousa

Tema: Pesquisa de *Mycoplasma haemofelis* em felinos da região metropolitana de Belém-Pará

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO PARA COLETA DE MATERIAL

NOME:.....IDADE:.....
 RAÇA:..... SEXO:.....
 PROPRIETÁRIO:.....
 ENDEREÇO:.....
 BAIRRO:.....TELEFONE:.....
 ECTOPARASITAS: PULGAS () CARRAPATOS () OUTROS ()
 MATERIAL:
 - LÂMINA:.....
 - HEMOGRAMA:.....
 - SANGUE C/ EDTA:
 OBSERVAÇÕES:.....

 DATA DA COLETA:...../...../.....

Apêndice 3: Termo de autorização para inclusão do animal na pesquisa.



Universidade Federal do Pará

Programa de Pós Graduação em Saúde Animal na Amazônia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Góes Cavalcante

Aluna: Sinerey Karla Salim Aragão de Sousa

Tema: Pesquisa de *Mycoplasma haemofelis* em felinos da região metropolitana de Belém-Pará

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Nome do animal:.....

Idade:.....

Raça:.....

Sexo:.....

Proprietário:.....

Endereço:.....

Bairro:..... Fone:.....

Autorizo a coleta de sangue do animal de minha propriedade acima identificado para compor amostra do projeto “Ocorrência de *Mycoplasma haemofelis* em felinos domésticos da região metropolitana de Belém- Pará”.

Belém,/...../.....

.....

Apêndice 4: Tabelas de análises estatísticas.

- Teste t

Tabela 1: Teste t entre os valores hematológicos e os animais positivos na PCR.

	Eritrócito	VG	Plaquetas	Hb	Leucócito Total
CMHXNEG	0,821	0,099	0,784	0,807	0,305
MHXNEG	0,005	0,001	0,134	0,001	0,345

Mostrou alteração em Eritrócito, VG e Hb dos animais afetados por *Mycoplasma haemofelis*.

- Índice Kappa

Tabela 2: Índice Kappa entre os Métodos parasitológicos e PCR

	P	N	TOTAL
P	1	18	19
N	10	172	182
TOTAL	11	190	201

Kappa = -0,473 Não há concordância entre os métodos.

- Risco Relativo

Tabela 03: Risco Relativo entre grupos A e B para *C.M. haemominutum*

	+	-	Total
A	14	87	101
B	1	61	62
Total	15	148	163

RR = 8,59 entre os grupos A e B

Tabela 04: Risco Relativo entre grupos A e C para *C.M. haemominutum*

	+	-	Total
A	14	87	101
C	1	37	38
Total	15	124	139

RR = 5,26 entre grupos A e C

Tabela 05: Risco Relativo entre grupos A e C para *C.M. haemominutum*

	+	-	Total
C	1	37	38
B	1	61	62
Total	2	98	100

RR = 1,63 entre os grupos C e B

Tabela 06: Risco Relativo entre os grupos C e B para *M. haemofelis*

	+	-	Total
C	1	37	38
B	0	62	62
Total	1	99	100

RR= 0

Tabela 07: Risco Relativo entre os grupos A e C para *M. haemofelis*

	+	-	Total
A		2	99
C		1	37
Total		3	136

RR= Deu zero inverte os grupos

Tabela 08: Risco Relativo entre os grupos C e A para *M. haemofelis*

	+	-	Total
C		1	37
A		2	99
Total		3	136

RR = 1,32 do Hovet ter *Mhf* que CCZTabela 09: Risco Relativo entre os grupos A e B para *M. haemofelis*

	+	-	Total
A		2	99
B		0	62
Total		2	161

RR= 0. Não há relação

- Qui quadrado

Tabela 10: Qui quadrado para prevalência entre machos e fêmeas com *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

	Positivos	Negativos	Total
M	11	57	68
F	5	128	133
Total	16	185	201

p= 0,002 (Machos são mais prevalentes quer as fêmeas)

Tabela 11: Qui quadrado para prevalência entre machos e fêmeas com *Mycoplasma haemofelis*.

	Positivos	Negativos	Total
M	2	66	68
F	1	132	133
Total	3	198	201

P= 0,225 (Não houve prevalência entre machos e fêmeas com *Mycoplasma haemofelis*)Tabela 12, 13 e 14: Qui quadrado para prevalência entre os grupos com *Mycoplasma haemofelis*.

Tabela 12

	PositivosMHF	Negativos MHF	Total	M e F
A	2	99	101	68
C	1	37	38	133
Total	3	136	139	201

p=0,813

Tabela13

	PositivosMHF	Negativos MHF	Total	M e F
A	2	99	101	68
B	0	62	62	133
Total	2	161	163	201

P=0,0009

Houve significância entre os grupos A/B

Tabela 14

	PositivosMHF	Negativos MHF	Total	M e F
B	0	62	62	68
C	1	38	39	133
Total	1	100	101	201

p=0,237

Não houve significância entre os grupos B/C.

Tabela 15: Qui quadrado para prevalência entre os grupos com C. M. haemominutum.

	Positivos	Negativos	Total	M e F
A	11	57	68	68
C	5	128	133	133
Total	16	185	201	201

P=0.002

	Positivos	Negativos	Total	M e F
B	11	57	68	68
C	5	128	133	133
Total	16	185	201	201

p=0,002

	Positivos CMH	Negativos CMH	Total	M e F
A	14	87	101	68
C	1	37	38	133
Total	15	124	139	201

P=0,05.

Apêndice 5: Tabela de valores hematológicos dos animais do experimento.

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10 ⁶	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm ³	LEUC, TOTAL x 10
1	B	524/11 VD NEGA	8.72	15	45	54	33.3	112	6,950
2	B	509 / 11 VD M, NEGRA	9.81	12.99	45	49.9	26.5	172	11,600
3	B	510 / 11 VD OLIVIA	8.47	12.95	46	54.3	28.15	324	12,400
4	B	530 / 11 DOCINHO	8.55	14.6	44	51.46	33.18	312	10,050
5	B	470 / 11 VD GIGI	7.35	11.6	24	15.78	48.33	312	14,550
6	B	450 / 11 VD TOFU	6.08	14	42	69.08	33.33	692	15,900
7	B	453 / 11 NINA	9.79	15.6	47	48	33.19	276	11,900
8	B	673 / 11 VD PRETINHA	7.03	11.6	35	49.03	33.14	100	13,800
9	B	483 / 11 VD / BOLINHA	7.47	11.6	35	46.85	33.14	492	11,500
10	B	531 / 11 FLORZINHA	7.84	19.67	59	75.25	33.33	504	16,200
11	A	CCZ 01 DE 17 / 11	3.15	9.67	29	92.06	30.69	740	22,700
12	A	CCZ 02 DE 17 / 11	6.44	11	33	51.24	33.33	424	21,900
13	A	CCZ 03 DE 17 / 11	6.44	9.67	29	45.03	33.34	632	19,700
14	A	CCZ 04 DE 17/11	6.23	11	33	52.96	33.33	436	29,600
15	A	CCZ 05 DE 17/11	5.19	10	30	57.8	33.33	624	27,500
16	A	CCZ 01 DE 07 / 12	5.84	11	33	56.5	33.33	496	19,600
17	A	CCZ 02 DE 07 / 12	7.21	14.33	43	59.63	33.32	520	14,000
18	A	CCZ 03 DE 07 / 12	8.35	14.33	43	51.4	33.32	460	17,300
19	A	CCZ 04 DE 07 / 12	7.24	12	36	49.72	33.33	320	20,700
20	A	CCZ 05 DE 07 / 12	4.98	12.33	37	74.29	33.32	740	21,600

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
21	A	CCZ 01 DE 09/12	4.39	5.55	28	63.7	19.82	468	21,300
22	A	CCZ 02 DE 09 / 12	7.34	14.07	31	42.33	45.38	676	27,000
23	A	CCZ03 DE 09 / 12	4.44	9.17	30	67.56	30.56	720	15,200
24	A	CCZ 04 DE 09 / 12	8.03	10.11	34	42.3	29.73	944	24,300
26	A	CCZ 01 DE 14/12	5.86	11	33	56.31	33.33	320	16,500
28	A	CCZ 03 DE 14 / 12	9.13	15	45	49.28	33.33	344	13,800
29	A	CCZ 04 DE 14 / 12	7.41	11	33	44.53	33.33	424	13,900
30	A	CCZ 05 DE 14 / 12	7.05	11.33	34	48.23	34.33	332	26,600
31	C	UFRA 01	4.8	9.33	28	58.33	33.21	252	51,600
32	C	UFRA 02	7.84	9.33	28	35.71	33.21	100	37,200
33	C	FC 12911 MIMI	6.51	9.3	28	43.01	33.21	260	17,100
34	A	CCZ 04 DE 10 / 01	6.42	6.67	31	48.2	21.33	556	22,400
35	A	CCZ 05 DE 10 / 01	6.62	12.23	38	57.4	32.2	324	15,400
36	A	CCZ 01 DE 16 / 01	7.81	7.18	33	42.25	21.75	412	17,400
37	A	CCZ 02 DE 16 / 01	4.07	7.08	27	66.34	26.22	604	12,700
38	A	CCZ 03 DE 16 / 01	5.29	8.74	33	62.38	26.48	432	15,600
39	A	CCZ 04 DE 16 / 01	7.92	9.61	41	51.77	23.44	620	20,500
40	A	CCZ 06 DE 16 / 01	3.33	7.12	27	81.08	26.37	404	10,000
41	A	CCZ 01 DE 17 / 01	5.8	10.7	30	51.72	35.67	440	11,600
42	A	CCZ 02 DE 17 / 01	6.78	14.04	38	56.05	36.95	524	21,700
43	A	CCZ 03 DE 17 / 01	4.97	10.95	28	56.34	39.1	620	38,400
44	A	CCZ 04 DE 17 / 01	7.28	14.23	44	60.44	32.34	428	9,900
45	A	CCZ 05 DE 17 / 01	6.65	13.42	37	55.64	36.27	1,004,000	48,700
46	A	CCZ 06 DE 17 / 01	5.09	11.17	27	53.04	41.37	360	32,400
47	C	FC 12977 PRETINHA	7.77	11	41	52.76	26.82	540	8,750
48	A	CCZ 01 DE 19 / 01	6.37	11.92	36	56.51	33.11	592	40,300
49	A	CCZ 02 DE 19/01	5.93	10.55	37	62.39	28.51	580	15,600

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
50	A	CCZ 03 DE 19 / 01	6.96	10.17	34	48.85	29.91	360	10,900
51	A	CCZ 01 DE 24 / 01	8.39	25.09	53	63.17	47.33	116	19,100
52	A	CCZ 02 DE 24 / 01	4.63	17.04	39	84.23	43.7	172	8,900
53	A	CCZ 03 DE 24 / 01	9.54	16.69	49	51.36	34.06	76	15,200
54	A	CCZ 04 DE 24 / 01	8.21	16.41	45	54.81	36.46	220	12,900
55	A	CCZ 05 DE 24 / 01	8.47	16.22	47	55.48	34.51	204	6,600
56	B	561/11 VD FREDERICO	9.49	12.45	46	48.47	27.06	372	9,400
57	A	CCZ 01 DE 25/01	6.58	14.41	50	75.99	28.82	144	13,000
58	A	CCZ 02 DE 25/01	7.02	15.07	48	68.37	31.4	78	11,900
59	A	CCZ 03 DE 25 / 01	6.27	21.28	45	71.77	47.28	176	18,900
60	A	CCZ 04 DE 25/ 01	8.93	13.95	50	55.99	27.9	8	13,900
62	A	CCZ 06 DE 25 / 01	7.72	8.95	23	29.8	38.91	184	19,300
63	A	CCZ 01 DE 26 / 01	7.18	10.33	36	50.14	28.69	204	13,000
64	A	CCZ 02 DE 26/01	8.46	13.3	43	50.83	30.93	356	17,200
65	A	CCZ 03 DE 26 / 01	7.98	9.36	31	38.85	30.19	340	9,000
66	A	CCZ 04 DE 26 / 01	4.07	9.92	33	81.08	30.06	216	14,900
67	A	CCZ 05 DE 26 / 01	4.92	9.27	30	60.98	30.9	280	11,000
68	A	CCZ 01 DE 30 / 01	5.37	7.86	26	48.42	30.23	200	11,400
69	A	CCZ 02 DE 30 / 01	7.17	12.33	37	51.6	33.32	208	9,400
70	A	CCZ 03 DE 30 / 01	3.87	11.79	32	82.68	36.84	312	8,600
71	A	CCZ 04 DE 30 / 01	12.48	11.76	37	29.65	31.78	216	7,500
72	A	CCZ 05 DE 30 / 01	5.36	10.29	30	55.97	34.3	1,028	7,000
73	C	FC 13080 PRINCESA	5.34	12	36	67.41	33.33	420	8,500
74	B	620 / 11 VD MIMI	4.58	18.1	44	96.06	41.14	352	4,750
75	B	580 / 11 VD CLARK	5.54	16.13	42	75.81	38.4	256	8,500
76	A	CCZ 01 DE 01/02	5	9.26	30	60	30.86	344	10,400

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
78	A	CCZ 03 DE 01/02	8.56	10.67	30	35.04	35.56	252	17,300
79	A	CCZ 04 DE 01/02	6.39	10.39	32	50.07	32.46	320	30,300
80	A	CCZ 05 DE 01/02	5.7	9.89	35	61.4	28.25	430	23,750
81	C	FC 13106 LILA	4.83	8.95	28	57.97	31.96	616	22,100
82	B	634/11 VD LUANA	6.76	10.89	38	56.21	28.65	524	1,800
83	B	574 / 11 VD LEON	9.8	13.26	45	45.29	29.47	332	13,700
84	B	498/11 VD MILORDE	6.68	14.41	45	67.37	32.02	328	6,050
85	A	CCZ 01 DE 02 / 02	5.93	11.23	27	45.53	41.59	568	43,100
86	A	CCZ 02 DE 01/02	7.49	12.42	39	52.06	31.86	160	34,250
86	A	CCZ 02 DE 02/02	2.01	3.02	17	84.57	17.76	236	19,800
87	B	ONCINHA / MARCIA	11.58	9	37	31.95	24.32	300	7,500
88	A	TIGRADA / MARCIA	8.43	8.96	39	46.26	22.97	384	5,600
89	A	NEGÃO/MARCIA	6.86	6.71	24	34.98	27.95	352	15,900
90	B	512/11 VD FRAJOLA	7.05	14.3	43	60.99	33.25	364	20,300
91	B	442/11 VD MIA	8.32	10.58	35	42.06	30.22	492	12,300
92	B	705/11 VD NANI	5.17	11.89	35	67.69	33.97	512	10,300
93	B	380/11 VD MENINA	4.97	13.3	40	80.48	33.25	264	7,251
94	B	511/11 VD YASMIN	6.75	14	42	62.22	33.33	340	11,000
96	A	CCZ 02 DE 07 / 02	7.5	10.33	34	45.33	30.38	276	11,050
97	A	CCZ 03 DE 07 / 02	6.35	14.63	35	55.11	41.8	252	7,300
98	A	CCZ01 DE 07 / 02	5.91	15.6	37	62.6	42.16	368	14,600
98	A	CCZ 04 DE 07 / 02	5.38	13.29	35	65.05	37.97	360	7,300
99	B	731 / 11 VD MIA	6.74	13.3	40	59.37	33.25	196	10,200
100	B	810 / 11 VD DANDARA	6.37	10.67	33	51.8	32.33	264	10,100
101	B	698 / 11 VD PENELOPE	6.35	14.3	43	67.71	33.25	216	14,700

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
102	B	672 / 11 VD PEDRITA	6.29	13.51	37	58.82	36.51	372	16,200
103	B	482 / 11 VD LALINHA	5.95	13.57	30	50.42	42.23	684	4,700
104	B	513 / 11 VD FILÓ	7.02	13.7	40	55.17	34.25	388	18,700
105	B	514/11 VD MARIA	7.51	12.71	30	39.94	40.56	312	11,200
106	A	CCZ 01 DE 13/02	4.29	16.41	29	67.59	56.58	216	13,800
107	A	CCZ 02 DE 13/02	3.4	9.61	25	73.52	38.44	316	18,700
108	A	CCZ 03 DE 13/02	5.86	7.24	24	33.14	30.16	324	13,300
109	A	CCZ 04 DE 13 / 02	8.74	9.05	37	42.33	24.45	296	13,600
110	A	CCZ 05 DE 13/02	4.24	12.67	32	74.94	39.59	304	8,300
111	C	FC 13207 RONALD	6.68	16.82	60	89.82	28.03	296	25,700
112	C	FC 10267 POMPOM	6.3	9.64	38	60.31	25.36	412	4,200
113	B	578 / 11 VD LAYON	6.07	11.66	35	57.66	33.31	484	7,900
114	B	687 / 11 VD PANDA	5.34	11.29	40	74.9	28.25	1,052	4,600
115	B	676 / 11 VD FIONA	5.82	12.45	36	61.81	34.58	560	13,200
116	B	675/11 VD PANDORA	6.5	14.41	41	60.07	35.14	492	2,700
117	A	CCZ 01 DE 28/02 (1PB)	6.81	13.85	33	48.45	41.96	504	18,300
118	A	CCZ 02 DE 28/02(2TIG)	4.89	12.45	38	77.7	32.76	420	15,150
119	A	CCZ 03 DE 28/02 (3PB)	6.66	13.42	37	55.55	38.27	420	6,100
120	A	CCZ 01 DE 29/02	6.22	14.6	44	70.73	33.18	627	51,000
121	A	CCZ 02 DE 29/02	5.65	10.33	31	54.86	33.32	524	12,100
122	A	CCZ 03 DE 29/02	5.12	9.33	28	54.68	33.32	272	13,500
123	A	CCZ 04 DE 29 /02	6.78	13.85	30	44.11	46.16	264	28,270

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
124	A	CCZ 05 DE 29 / 02	9.18	13.33	40	43.57	33.32	356	17,900
126	B	626 / 11 VD MAGALI	7.58	9.79	34	44.85	28.79	352	5,500
127	B	638/11 VD SHAOLIN	7.96	13.33	40	50.25	33.32	376	17,900
128	B	627/11 VD JUNINHA	7.68	10.45	40	52.08	26.12	164	9,700
129	A	CCZ 01 DE 05 / 03(1TIG)	4.53	9.08	33	72.84	27.51	556	7,400
130	A	CCZ 02 DE 05 / 03(2PB)	5.23	6.68	28	53.53	23.85	480	8,800
131	A	CCZ 03 DE 05 / 03(3P)	5.81	9.86	25	43.02	39.44	472	8,500
133	A	CCZ 05 DE 05 / 03(5TIG)	5.82	10.42	35	60.13	29.77	528	3,900
134	A	CCZ 06 DE 05 / 03(6PB)	8.56	9.61	30	35.04	32.03	528	8,900
134	A	CCZ 04 DE 05/03(6PB)	2.79	8.86	27	96.77	32.81	464	5,900
135	A	CCZ 07 DE 05 / 03(7BEGE)	4.54	8.99	27	59.47	33.29	516	5,500
136	A	CCZ 08 DE 05 / 03(8P)	2.94	7.86	26	88.43	30.23	320	3,100
138	B	642 / 11 VD LILICA	7.54	9.92	32	42.44	31	752	16,100
139	B	584/11 VD PRENHA	4.09	11.7	38	92.9	30.78	248	2,700
140	A	CCZ 01 DE 07/03	8.07	11.7	29	35.93	40.34	360	38,500
141	A	CCZ 02 DE 07 / 03	5.85	11.61	25	42.73	46.44	488	30,700
142	A	CCZ 03 DE 07 / 03	5.25	10.98	27	51.42	40.66	332	15,600
143	A	CCZ 04 DE 07 / 03	4.95	14.25	29	58.58	49.82	332	21,400
144	A	CCZ 05 DE 07 / 03	7.38	12.67	25	33.87	50.68	580	13,800
145	A	CCZ 06 DE 07 / 03	6.15	12.92	38	61.78	34	448	4,400

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
146	A	CCZ 07 DE 07 / 03	5.55	11.92	24	43.24	49.66	500	20,400
147	A	CCZ 08 DE 07 / 03	6.64	10.36	27	40.66	38.37	468	12,200
148	B	690 / 11 VD PENNYLANE	8.72	10.77	34	38.99	31.67	368	7,200
149	B	691 / 11 VD SHANTI	7.53	11.42	40	53.12	28.55	556	7,200
150	B	647/11 VD NATHALY	6.8	12.67	38	55.88	33.34	184	4,600
151	B	599 / 11 PIPOCA	7.18	13.66	41	57.1	33.31	500	6,900
152	B	699/11 VD MIETHY	6.42	13.33	40	62.3	33.32	188	9,300
153	C	FC 13435 JADE	8.98	9	27	30.06	33.33	844	8,600
155	B	692/11 VD BRANQUI	8.49	12.66	38	44.75	33.31	548	9,300
156	B	484/11 VD PIMENTA	8.1	10.66	32	39.5	33.31	500	5,900
157	B	607/11 VD PRETINHA	5.32	11	33	62.03	33.33	536	8,400
158	A	CCZ 01 DE 15/03=14/03	4.99	9	27	54.1	33.33	204	29,000
159	A	CCZ 02 DE 15/03(14/3)	4.24	10	30	70.75	33.33	304	20,900
160	A	CCZ 03 DE 15/03 (14/3)	5.05	10.33	31	61.38	33.32	152	13,900
161	B	677/11 VD DENGOSA	9.51	13.33	40	42.06	33.3	264	32,600
162	B	678/11 VD SOZINHA	8.22	12.66	38	46.22	33.31	424	12,500
163	B	326 / 11 VD BISCOITO	6.18	13.33	40	64.72	33.32	362	6,300
164	B	649/11 VD P,NEGRA	6.64	14	42	63.25	33.33	320	3,300
165	B	740/11 VD RAJADIN	6.35	11.33	34	50.74	33.32	240	6,700
166	B	328 / 11 VD GATUSO	7.49	12.33	37	49.39	33.32	280	7,700

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
167	B	739 / 11 VD AMARELIN	7	10.83	32.5	46.42	33.32	460	7,500
168	B	722/11 MOLEKA(PIPOCA)	8.75	13.33	40	45.71	33.32	520	8,100
169	A	FC13512 M,EDUARDA	8	11.8	32.6	43.29	36.19	478	5,800
170	B	644/11VD MONIQUIN,	7.83	12.4	36.1	46.2	34.3	295	16,600
171	B	677/11 VD MEL	7.3	11	33	45.2	33.33	380	10,300
171	A	FC13638 MEL	7.99	14.3	40.7	50	35.13	269	8,400
172	B	586/11 VD MALU	10.04	17.6	49	48.9	35.9	364	27,200
173	B	550/11 LARA	9.15	15.4	42.7	46.47	36	144	8,400
174	C	FC13617 FOFINHA	6.89	11.6	31.4	45.57	36.94	590	22,100
175	C	FC13603 PRINCIPE	8.44	14	37.8	44.78	37	79	28
176	C	TIARA 1/11/04	6.46	10.2	29.5	45.8	34.5	213	33,900
177	C	FOFINHA3/11/04	5.91	10.1	28	47.4	36	168	30.7
178	C	PITA 2/11/04	6.97	11.3	31.9	45.9	35.4	103	29.5
179	B	641 / 11 NEGÓ	8.3	13.66	41	49.39	33.31	248	11,900
179	C	NEGÓ	8.3	13.66	41	49.39	33.31	248	11.9
180	B	104/10 FLOR	8.06	11.2	36	44.66	31.11	240	11,900
180	C	FLOR	8.06	11.2	36	44.66	31.11	240	11.9
181	B	534/11 VD ANA JULIA	9.58	13.23	42	43.84	31.5	312	15,500
181	C	ANA JULIA	9.58	13.23	42	43.84	31.5	312	15.5
182	B	577/11 VD TAIGRA	5.76	11	33	57.29	33.33	240	19,800
182	C	TAIGRA	5.76	11	33	57.29	33.33	240	19.8
183	C	MEQUEBA/ PIPA	7.28	12.33	37	50.28	33.33	180	19.2

AMOSTRA	GRUPO	ID / DATA	HEMACIA x 10	HB g/dl	VG %	VCM fl	CHCM %	PLAQUETA mm3	LEUC, TOTAL x 10
184	C	BIA	9.43	16	45	48.3	35.1	316	24.7
185	C	DALILA	9.42	15	43.6	46.3	34.8	392	22
186	C	FLOCO	7.65	14	40	52	35	480	13.2
187	C	MADONNA	8.69	15	44	51	35	130	18.5
188	C	ROMEU	7.39	12	35	49	34	170	18.3
189	C	001 UFRA GATIL	5.76	11	33	57	33	620	20.3
190	C	TOSTADINHA 002 UFRA	5.63	9.33	28	49.73	33.32	412	16.6
191	C	003 UFRA	9.18	11.66	35	38.12	33.31	568	19.25
192	C	FC 10944 BILLY	6.76	13	39	57.69	33.33	384	3,950
192	C	BILLY 11544/11549	0.97	1.6	5	51.54	32	100	8.45
193	C	KIABO 11598	1.53	4.66	14	91	33.28	188	15.07
194	C	MARIA 14523	6.36	6.33	19	29.87	33.15	248	26.8
195	C	MED 7366	19.88	14.6	44	22.13	33.18	268	53.9
196	C	CHARLOTE 14547	7.55	11	30	39	36	258	13.8
197	C	AGENOR 14555	11.56	21	59	51	35	289	17
198	C	SOFIA 14189	3.6	12	35	97	34	256	12.65
199	C	MIMOSA 14641	6.93	10.7	32	46.17	33.43	333	18.2
200	C	GATO 14655	9.83	15.3	45	45.77	34	114	15.8
201	C	SOFIA 14578	8.08	11.8	36.4	45.04	32.41	216	11