

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIA CLÍNICAS)**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação hematológica, bioquímica, clínica e diagnóstico
molecular de agentes micoplasmas hemotróficos em cães domésticos
oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro**

Aline Tonussi da Silva

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA VETERINÁRIA (PATOLOGIA E CIÊNCIA CLÍNICAS)**

**AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA, CLÍNICA
E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE AGENTES MICOPLASMAS
HEMOTRÓFICOS EM CÃES DOMÉSTICOS ORIUNDOS DE ABRIGOS
DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO**

ALINE TONUSSI DA SILVA

Sob a Orientação da Professora
Cristiane Divan Baldani

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
2016

636.7089696

S586a

Silva, Aline Tonussi da, 1986-

T

Avaliação hematológica, bioquímica, clínica e diagnóstico molecular de agentes micoplasmas hemotróficos em cães domésticos oriundos de abrigos da região metropolitana do Rio de Janeiro / Aline Tonussi da Silva - 2016.

85 f.: il.

Orientador: Cristiane Divan Baldani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia Animal.

Bibliografia: f. 53-63.

1. Cão - Parasito - Teses. 2. Cão - Doenças - Teses. 3. Micoplasma - Teses. 4. Hematologia veterinária - Teses. I. Baldani, Cristiane Divan, 1978-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia Animal. III. Título.

Folha daprovação pela banca

DEDICATÓRIA

Á Deus, que nos fortalece nas adversidades.

Dedico este trabalho, aos meus pais, Júlio e Elizabeth, base da minha formação, vocês são os orientadores do meu caráter.

Ao Leone e Olívia pelo apoio e confiança que depositaram em mim.

‘Hoje não! Amanhã eu fico triste...

Amanhã! hoje não.

Hoje eu fico alegre!

E todos os dias por mais amargos que sejam, eu digo:

-Amanhã eu fico triste, hoje não!’

Poema anônimo encontrado na parede de um dormitório infantil em Auschwitz.

‘O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho’.

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me proporcionado o privilégio de conviver com pessoas extremamente diferentes, mas cada uma com sua peculiaridade.

Aos meus pais Julio Cesar da Silva e Elizabeth Tonussi e a minha irmã, Olívia Carolina pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu namorado Leone Prezoti Tonussi pelo incentivo, carinho, apoio, amizade e compreensão durante a minha graduação e pós-graduação.

À minha orientadora Professora Dr.^a Cristiane Divan Baldani, pela oportunidade, apoio e orientação.

Ao meu orientador de iniciação científica Professor Dr. Fernando Queiroz de Almeida pelos anos que participei do seu grupo de pesquisa.

Aos Professores Dr. Carlos Luiz Massard e Huarrisson Azevedo Santos, por ter disponibilizado seus laboratórios para a execução de partes do meu projeto.

Aos Professores Marcos Rogério André e Carlos Henrique Machado, por terem disponibilizado parte do seu tempo na correção da minha qualificação.

Aos componentes do laboratório da Estação para pesquisa parasitológica da UFRRJ, pelo auxílio durante a minha pesquisa e incentivo nos momentos difíceis. Especialmente pós-doutorando Marcus Sandes Pires, sempre disposto a sanar minhas dúvidas.

À Professora Dr.^a Rosangela Zacarias Machado e ao Professor Dr. Marcos Rogério André ambos da instituição (UNESP/Jaboticabal) por cederem os controles positivos dos ensaios moleculares essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas e companheiras de laboratório pelo auxílio em todas as etapas deste projeto, sem as quais este resultado não seria alcançado: Juliana Macêdo Raimundo, Andresa Guimarães, Gleice Marques Amaro, Camila Flávia Botelho Magalhães.

Agradeço as alunas de iniciação científica Luana e Esmeralda pela colaboração no processamento das amostras.

Aos colegas Clarice Gonring Corrêa e Caio Junior Balduino Coutinho Rodrigues agradeço o auxílio na coleta das amostras.

À minha amiga Juliana Macedo Raimundo, pela paciência para me ensinar e ajudar em todos os momentos, por todas as horas que passamos juntas, por todo incentivo.

À minha amiga Andresa Guimarães, pelo apoio mesmo quando estive longe e por me ajudar e incentivar na execução de grande parte deste trabalho.

Não posso deixar de mencionar os “meus” cavalos (*in memoriam*), que me ensinaram muito sobre o quanto eram valiosos e não apenas animais meramente experimentais. Esses quatro guerreiros (Coelhinha, Fiona, Palatina e Shrek) que convivi durante cinco anos de graduação, fica a gratidão e saudade.

Aos proprietários dos abrigos, que nos receberam sempre com muita gentileza, muitas das vezes atrapalhando a sua rotina ou final de semana.

Aos cães que participaram desta pesquisa, que sem eles não seria possível que a mesma estivesse concluída.

Aos moradores e ex-moradores da vila mais cheia de histórias da Rural, que se tornaram companheiros dessa vida ruralina.

Aos meus amigos Uiara Raiana, Douglas Mena, Luciano Bertolino, Taciana Dorneles, Robson Goulart, Mário Santos, Wagner, Rebecca Barbosa, Marcos Barreto, Feranda Taran, Fernanda Godoi, Viviane, Leidiane Batista e Vanessa Vitalque mesmo à distância sempre me apoiaram e incentivaram.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de realização da minha Graduação e Curso de Mestrado.

A Coordenação de pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, que foi essencial nesta jornada.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização dessa pesquisa, mas por esquecimento não mencionei.

BIOGRAFIA

Aline Tonussi da Silva, filha de Júlio Cesar da Silva e Elizabeth Tonussi, nasceu no dia 05 de novembro de 1986, na cidade de Barbacena, MG. Iniciou sua trajetória educacional cursando o ensino infantil no Colégio Padre Mestre Corrêia, ensino fundamental e médio no Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais.

Em 2008 ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, permanecendo no mesmo por três períodos. Em 2010 ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo o curso de graduação no dia 11 de abril de 2014.

Em 2009 foi estagiária no Departamento de Medicina e Cirurgia na área de experimentação animal sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida.

Em 2010 foi bolsista de Apoio Técnico Acadêmico na área de Avaliação Animal sob orientação do professor Victor Cruz Rodrigues. No mesmo período foi estagiária no Hospital de Grandes Animais da UFRRJ, sob a orientação do Médico Veterinário Gilberto dos Santos Seappa.

Em 2011 foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida, com o projeto intitulado “Utilização da técnica in vitro semi-automática com produção de gases na avaliação de forrageiras para equinos.”

Em 2012 foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida, com o projeto intitulado “Análise morfométrica e do desempenho de equinos em salto.”

Foi monitora voluntária da disciplina de Doenças Infecciosas no período 2012 a 2013, sob a orientação dos professores Clayton Gitti e Edson Souza.

Em 2013 foi bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC sob a orientação do professor Fernando Queiroz de Almeida, com o projeto intitulado “Avaliação do metabolismo muscular em equinos de concurso completo de equitação em treinamento.” No mesmo período foi aprovada no concurso de monitoria de Patologia Clínica do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária.

Realizou em 2013, o estágio supervisionado de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária com a supervisão da professora Cristiane Divan Baldani. Foi treinada para execução das principais técnicas hematológicas, bioquímicas e de urinálise utilizadas no laboratório clínico e acompanhou projetos de Medicina Preventiva Veterinária.

Em março de 2014 ingressou no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ em nível de mestrado, sendo contemplada com bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Período no qual participou de cursos e eventos relacionados à área, realizou estágio docência na disciplina de patologia clínica e publicou os resultados parciais da dissertação em congressos e eventos da área. Participou da organização da Semana acadêmica do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ.

Aprovada em concurso público para o cargo de Médica Veterinária da Prefeitura Municipal de Carandaí – Minas Gerais, tomou posse do cargo no dia 05/01/16.

RESUMO

SILVA, Aline Tonussi. **Avaliação hematológica, bioquímica, clínica e diagnóstico molecular de agentes micoplasma hemotróficos em cães domésticos oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.** 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Os hemoparasitos micoplasmas hemotróficos são bactérias gram-negativas, que se fixam obrigatoriamente na superfície dos eritrócitos, levando a deformação desta. O objetivo do presente estudo foi detectar molecularmente a infecção por hemoplasmas em cães de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, associando-a aos dados hematológicos, bioquímicos e alterações clínicas. Dos 222 cães amostrados, 20,27% (45/222) foram positivos pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para *Mycoplasma* spp.. A frequência de infecção das espécies de hemoplasma pela PCR, utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos, foi 13,06% (29/222), 0% (0/222) e 2,25% (5/222), respectivamente para *M. haemocanis* (Mhc), ‘*Candidatus M. turicensis* (CMt) e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/ haemominutum*’ (CMhp/m). *M. haemocanis* constitui, portanto, a espécie de maior ocorrência na população de cães estudada. Foram identificadas coinfeções entre CMhp/m e Mhc em 1,35% (3/222) dos cães. No tocante às alterações hematológicas associadas à infecção por *Mycoplasma* spp., constatou-se hiperproteinemia plasmática refratométrica ($p=0,0010$). Não foi observada associação entre a infecção por hemoplasmas e a ocorrência de anemia ou alterações leucocitárias. Nas alterações da bioquímica sanguínea, evidenciou-se diferença significativa na proteína sérica ($p=0,0291$), globulina ($p=0,0253$), creatinina ($p=0,0279$), fosfatase alcalina ($p=0,0242$). Adicionalmente, a azotemia foi estatisticamente ($p=0,0023$) associada à infecção. Os resultados observados na avaliação de cães positivos para Mhc demonstram haver diferença significativa na proteína plasmática total ($p=0,0012$) e hiperproteinemia foi associada à infecção ($p=0,0238$). Houve diferença significativa no parâmetro fosfatase alcalina ($p=0,0173$) e uréia ($p=0,0401$), com a azotemia sendo associada á infecção ($p=0,0061$). Os resultados observados na avaliação de cães positivos para CMhp/hm demonstram que a ALT (alanina aminotransferase) foi associada à infecção ($p=0,0301$). Quanto aos fatores associados à infecção por *Mycoplasma* spp., apenas gênero ($p=0,0062$) e idade ($p=0,0041$) foram associadas à infecção. Não apresentaram associação estatística com o agente histórico de brigas, acesso a rua, castração, histórico de pulgas, histórico de carrapatos, presença de pulgas e presença de carrapatos. A frequência dos principais achados de anamnese e exame clínico dos cães positivos para *Mycoplasma* spp. foram a linfadenopatia (37,8%), lesões de pele compatíveis com sarna (28,9%), TPC >2 (31,1%), afecções bucais (15,5%) e histórico de erlichiose (13,3%). Conseqüentemente, o conhecimento da doença bem como dos fatores relacionados à sua ocorrência são necessários para a adoção de medidas preventivas visando à saúde animal.

Palavras-chave: Cães domésticos; Hemoplasmas; Abrigos.

ABSTRACT

SILVA, Aline Tonussi. **Avaliação hematológica, bioquímica, clínica e diagnóstico molecular de agentes micoplasma hemotróficos em cães domésticos oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.** 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The hemotropic hemoparasites mycoplasmas are gram-negative bacteria, which must attach to the wall of erythrocytes, causing deformation in the membrane of the infected erythrocytes. The goal of this study was to detect molecularly hemoplasmas infection in sheltered dogs in Metropolitan region of Rio de Janeiro, linking it to hematological, biochemical and clinical data changes. Of 222 dogs sampled, 20,27% (45/222) were positive by the Polymerase Chain Reaction Real Time (qPCR) for *Mycoplasma* spp.. The frequency of hemoplasma species infection by PCR using species-specific oligonucleotides, was 13,06% (29/222), 0% (0/222) and 2,25% (5/222) respectively for *M. haemocanis* (Mhc), '*Candidatus M. turicensis*' (Cmt) and '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum / haemominutum*' (Cmhp / m). There for e *M. haemocanis* presented the highest incidence in the dogs population studied. Coinfections were identified between Cmhp/m and Mhc 1,35% (3/222). Regarding hematological alterations associated with infection by *Mycoplasma* spp., hyperproteinemia on plasma was detected (p = 0,0010). It was not observed an association between hemoplasmas infection and the occurrence of anemia and leukocyte changes. Changes in serum biochemistry showed a significant difference in serum protein (p = 0,0291), globulin (p = 0,0253), creatinine (p = 0,0279) and alkaline phosphatase (p = 0,0242). Additionally the azotemia was statistically (p = 0,0023) associated with the infection. The results obtained in the evaluation of Mhc positive dogs demonstrated no significant difference in plasma total protein (p = 0,0012) and hyperproteinaemia was associated with infection (p = 0,0238). There were significant differences in alkaline phosphatase parameter (p = 0,0173) and urea (p = 0,0401), with azotemia is associated shall infection (p = 0,0061). The results observed in the evaluation of positive dogs for (Cmhp / m) show that ALT (alanine aminotransferase) was associated with infection (p = 0,0301). As for factors associated with infection by *Mycoplasma* spp., only gender (p = 0,0062) and age (p = 0,0041) were associated with infecção. Não are statistically associated with the historical agent of fights, access to street, castration, history fleas, ticks history, presence of fleas and ticks. The frequency of the main findings of anamense and clinical examination of the dogs positive for *Mycoplasma* spp . were lymphadenopathy (37,8%) , skin lesions compatible with scabies (28,9%) , TPC > 2 (31,1%) , oral affections (15,5%) of histórico ehrlichiosis (13,3%) . Consequently, knowledge of the disease and the factors related to their occurrence are necessary for the adoption of preventive measures aimed at animal health.

Keywords: Domestic dogs; Hemoplasmas; Shelters

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Frequência de cães domésticos positivos pela qPCR para *Mycoplasma* spp. oriundos de abrigos localizados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 21
- Tabela 2. Frequência de cães domésticos positivos pela PCR convencional baseada no gene 16S rRNA para *Mycoplasma haemocanis* oriundos de abrigos localizados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 21
- Tabela 3. Frequência de cães domésticos positivos pela PCR convencional baseada no gene 16S rRNA para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ oriundos de abrigos localizados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 22
- Tabela 4. Localização dos abrigos, condições estruturais, número de animais coletados e sua frequência de positividade associada aos animais contactantes..... 22
- Tabela 5: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) dos cães positivos e negativos na PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 24
- Tabela 6: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 24
- Tabela 7: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 25
- Tabela 8: Alterações no leucograma associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 26
- Tabela 9: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães desidratados oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....27
- Tabela 10:Alterações no leucograma associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães desidratados oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....28
- Tabela 11: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) dos cães positivos e negativos na PCR

convencional para <i>Mycoplasma haemocanis</i> , oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	29
Tabela 12: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na PCR convencional para <i>Mycoplasma haemocanis</i> , oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	30
Tabela 13: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por <i>Mycoplasma haemocanis</i> em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	31
Tabela 14: Alterações no leucograma associadas à infecção por <i>Mycoplasma haemocanis</i> em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	32
Tabela 15: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) dos cães positivos e negativos na PCR convencional para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum</i> ’, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	33
Tabela 16: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na PCR convencional para ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum</i> ’, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	34
Tabela 17: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum</i> ’ em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	35
Tabela 18: Alterações no leucograma associadas à infecção por ‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum</i> ’ em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	36
Tabela 19: Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na PCR em Tempo Real para <i>Mycoplasma spp.</i> , oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	37
Tabela 20: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por <i>Mycoplasma ssp.</i> em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	38
Tabela 21: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por <i>Mycoplasma ssp.</i> em cães desidratados oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	39
Tabela 22: Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na PCR convencional para <i>Mycoplasma haemocanis</i> , oriundos de	

abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro..... 40

Tabela 23: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por *Mycoplasma haemocanis* em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 41

Tabela 24: Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na PCR convencional para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro..... 42

Tabela 25: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’ em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 43

Tabela 26: Associação entre os dados de histórico de brigas, acesso a rua, castração, gênero, idade, histórico de pulgas, histórico de carrapatos, presença de pulgas e presença de carrapatos com o resultado da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) para o agente *Mycoplasma* spp..... 44

Tabela 27. Frequência dos principais achados de anamnese e exame clínico em cães positivos (n=45) pela PCR em Tempo Real (qPCR) para *Mycoplasma* spp. oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro..... 45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Árvore filogenética dos micoplasmas baseada no gene 16S rRNA.....3
- Figura 2. Municípios pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Locais de obtenção das amostras e total de animais coletados por localidade..... 14
- Figura 3. Esfregaço de sangue apresentando estruturas epieritrocíticas sugestivas de hemoplasmas em cadeia. (Corante Giemsa, 1000x)..... 18
- Figura 4. Curva de amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. obtidos pela PCR em tempo real (Sistema SYBRGreen). As linhas em cor de rosa indicam o controle positivo e as demais linhas, as amostras positivas..... 18
- Figura 5. Curva de dissociação do fragmento do gene 16S rRNA do controle positivo e das amostras positivas demonstrando a especificidade de amplificação de *Mycoplasma* spp. na PCR em tempo real. 19
- Figura 6. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 393 pares de base do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemocanis*, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1 a 4- 6 a 11- 14 a 16: Cães negativos; Canaleta 5 e 12: Cães positivos. 20
- Figura 7. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 192 pares de base do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1 a 9- 11 a 15: Cães negativos; Canaletas 10: Cão positivo..... 20

LISTA DE ABREVIACOES

AHIM Anemia hemolítica imunomediada
ALT Alanina Aminotransferase
AST Aspartato Aminotransferase
CHGM Concentrao de hemoglobina globular média
CID Coagulao Intravascular Disseminada
CMhm ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’
CMhp ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’
CMhp/hm ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/ ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’
Cmt ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’
CT *Threshold Cycle*
dATP Deoxiadenosina trifosfato
dCTP Deoxicitosina trifosfato
dGTP Deoxiguanosina trifosfato
DNA cido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
DNNE Desvio nuclear de neutrófilos  esquerda
DP Desvio Padrão
dTTP Deoxitimidina trifosfato
EDTA Etilenodiamino tetra-acético
ELISA Ensaio Imunoenzimático
EP Erro Padrão
EUA Estados Unidos da América
FA Fosfatase alcalina
He Hemácias
Hg Hemoglobina
HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
Ht Hematócrito
IC Intervalo de Confiança
Máx. Limite máximo
Mhc *Mycoplasma haemocanis*
Mhf *Mycoplasma haemofelis*
Mín. Limite mínimo
N Número de cães

pb Pares de base
PCR Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PM Peso molecular
PPT Proteína Plasmática Total
qPCR Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
mpB Gene RNase P
Taq *Thermophilus aquaticus*
Tm Temperatura de dissociação (*Melting Temperature*)
TPC Tempo de preenchimento capilar
TVT Tumor venéreo transmissível
UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UNESP Universidade Estadual Paulista
VGM Volume globular médio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Micoplasmas Hemotróficos (Hemoplasmas)	2
2.1.1	Agente etiológico: Morfologia	2
2.1.2	Classificação	2
2.1.3	Epidemiologia	3
2.1.3.1.	Prevalência Mundial	3
2.1.3.2	Prevalência no Brasil	4
2.1.3.3	Fatores de risco	7
2.1.4	Patogenia da hemoplasmose	7
2.1.5	Sinais clínicos e achados laboratoriais	8
2.1.6	Diagnóstico	9
2.1.6.1	Citologia de esfregaços sanguíneos	9
2.1.6.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	10
2.1.6.3	Testes sorológicos	10
2.1.7	Tratamento	11
2.1.8	Prevenção	11
2.1.9	Importância em Saúde Pública	12
3	METODOLOGIA	12
3.1	Princípios éticos	12
3.2	Animais	13
3.3	Coleta de sangue	14
3.4	Análises Hematológicas	14

3.5	Análises Bioquímicas.....	15
3.6	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	15
3.6.1	Extração de DNA de sangue total.....	15
3.6.2	Reações de Amplificação para hemoplasmas.....	15
3.6.2.1	PCR em Tempo Real (qPCR) para <i>Mycoplasma</i> sp.....	15
3.6.2.2	Reação de amplificação específica para <i>Mycoplasma haemocanis</i>	16
3.6.2.3	Reação de amplificação específica para ' <i>Candidatus/Mycoplasma haemominutum</i> '.....	16
3.6.2.4	Reação de amplificação específica para ' <i>Candidatus</i> ' <i>Mycoplasma turicensis</i>	16
3.6.3	Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares.....	17
3.6.4	Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	17
3.7	Análise estatística	17
4	RESULTADOS	17
4.1	Pesquisa de hemoplasmas em diagnóstico direto.....	17
4.2	Diagnóstico molecular de hemoplasmas baseado no gene 16S rRNA.....	18
4.3	Distribuição de hemoplasmas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	20
4.4	Análise de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de hemoplasmas..	22
4.4.1	<i>Mycoplasma</i> spp.....	22
4.4.2	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	28
4.4.3	' <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> '/' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '.	32
4.5	Análise de parâmetros bioquímicos correlacionados com a ocorrência de hemoplasmas..	36
4.5.1	<i>Mycoplasma</i> spp.....	36
4.5.2	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	39
4.5.3	' <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> '/' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '.	41
4.6	Fatores associados à positividade para <i>Mycoplasma</i> spp. utilizando a técnica PCR em Tempo Real	45
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	53
8	ANEXOS.....	63
ANEXO	A -Termo de consentimento livre esclarecimento.....	64

ANEXO B - Questionário epidemiológico e avaliação clínica, referente aos cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil.....	65
ANEXO C - Fotos demonstrando as diferentes condições estruturais, higiênico-sanitárias e presença de animais contactantes obseradas nos abrigos.....	66

1 INTRODUÇÃO

Os micoplasmas hemotróficos são bactérias pleomórficas, epicelulares, gram negativas que estão presentes na superfície dos eritrócitos (MESSICK, 2004; MESSICK; HARLEY, 2015). Até o presente momento, quatro espécies de hemoplasmas foram identificados em cães, sendo: *Mycoplasma haemocanis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’.

As hemoparasitoses são enfermidades de grande importância na medicina veterinária, não somente em decorrência das doenças que promovem nos animais, mas também pelo possível potencial zoonótico devido ao estreito convívio com os seres humanos. Os micoplasmas hemotróficos (hemoplasmas) podem ser carregados silenciosamente e transmitidos a outros animais por transfusão sanguínea, brigas e artrópodes vetores, tais como pulgas e carrapatos, favorecendo a propagação dos agentes.

O crescimento da população canina no Brasil associado ao estreitamento da relação com os humanos em grandes cidades e a presença do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus* ressalta a importância de estudos abordando *Mycoplasma* spp. em cães. Vale ressaltar, o elevado índice de cães anêmicos na rotina clínica, sem muitas vezes, uma correlação específica com a causa determinante, o que enaltece a participação dos micoplasmas hemotróficos como potencial agente causador de anemia já que na população felina são sabidamente reconhecidos como importantes causadores de doença, podendo os animais apresentar anemia severa a infecções crônicas sem manifestação clínica.

Os sinais clínicos da infecção pelos hemoplasmas em cães são variáveis e a severidade da doença depende de fatores ainda não bem esclarecidos. Animais cronicamente infectados normalmente são assintomáticos. No entanto, a infecção tende a tornar-se notável em cães esplenectomizados, imunossuprimidos, estressados, com doenças concomitantes ou infecções. Cita-se que enfermidades, como a babesiose, parvovirose, demodicose e cinomose, tornam a infecção pelos micoplasmas hemotróficos significativa. De um modo geral, os sinais observados são anorexia, letargia, perda de peso e febre. E dentre os achados laboratoriais, incluem-se a anemia hemolítica, leucopenia e trombocitopenia.

No Brasil, o diagnóstico citológico de hemoplasmas em esfregaços sanguíneos ainda é o método mais comumente utilizado. No entanto, dificilmente realizam-se esfregaços sanguíneos com sangue fresco na rotina diagnóstica, o que dificulta a visualização dos hemoplasmas, visto que se localizam na superfície das hemácias e são facilmente destacados destas pelo anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA). Assim, em decorrência da reduzida sensibilidade da técnica citológica e da falta de laboratórios capacitados com tecnologias moleculares na rotina, o diagnóstico da hemoplasmose em cães por vezes não é realizado ou tem sido baseado em evidências clínicas, sendo normalmente confirmado pela resposta ao tratamento sintomático, ocorrendo, deste modo, o subdiagnóstico dos agentes.

Com o advento das técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a detecção e caracterização de sequências gênicas de patógenos anteriormente não caracterizados tem sido possíveis. A identificação molecular de agentes infecciosos complementada por sequenciamento de vários genes específicos constitui alternativa para o diagnóstico dos micoplasmas hemotróficos, auxiliando dessa forma na compreensão da patogenia da doença e na identificação de reservatórios para espécies que acometem seres humanos e animais domésticos.

Vale ressaltar que, até o presente momento, estudos no Brasil abordando os micoplasmas em cães são bastante escassos, havendo apenas a publicação de casos isolados.

Há relatos de sua ocorrência apenas nos estados de Recife, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Não há ainda relatos de sua ocorrência no estado do Rio de Janeiro, onde se acredita que haja o subdiagnóstico destes agentes.

O presente projeto objetiva investigar a presença de infecção pelos agentes micoplasmas hemotróficos em cães domésticos oriundos de abrigos do Rio de Janeiro, através da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) e adicionalmente correlacionar as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas com a infecção natural. Com isso, pretende-se orientar médicos veterinários no diagnóstico desta enfermidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micoplasmas Hemotróficos (Hemoplasmas)

2.1.1 Agente etiológico: Morfologia

Micoplasmas hemotróficos são bactérias gram-negativas, que se fixam obrigatoriamente na parede dos eritrócitos (epieritrocitário) ocasionando dobras profundas, de tamanho reduzido (0,3 a 0,8 μ M), cuja morfologia varia de cocos únicos, em pares e ocasionalmente, cadeias cocóides, formando anéis (VENABLE et al., 1968; MESSICK et al., 2004; TASKER, 2010; MESSICK; HARLEY, 2015), levando a deformação na membrana dos eritrócitos parasitados (NEIMARK et al., 2001). Caracteristicamente apresentam genoma reduzido, ausência de parede celular e flagelo, são susceptíveis à tetraciclina e resistentes à penicilina ou qualquer outro antibiótico cujo alvo é a parede celular (NEIMARK, 2001). Os hemoplasmas não são cultiváveis *in vitro* (RIKIHISA et al., 1997; SYKES, 2003; MESSICK, 2004).

2.1.2 Classificação

Inicialmente, foram classificados na ordem Rickettsiales com base na morfologia e resposta à terapia antibiótica (WEISS; MOULDER, 1984). No entanto, os estudos moleculares baseados no gene 16S rRNA demonstraram que os gêneros *Haemobartonella* e *Eperitrozoon* são mais intimamente relacionados com o grupo pneumoniae de micoplasmas, levando a reclassificação dentro do gênero *Mycoplasma* (RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001).

Em 2004, um novo hemoplasma canino foi identificado ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ o qual apresentou maior correlação com o ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ dos felinos, baseado nas análises dos genes 16S rRNA e RNase P, do que com *M. haemocanis* dos caninos (SYKES et al., 2005).

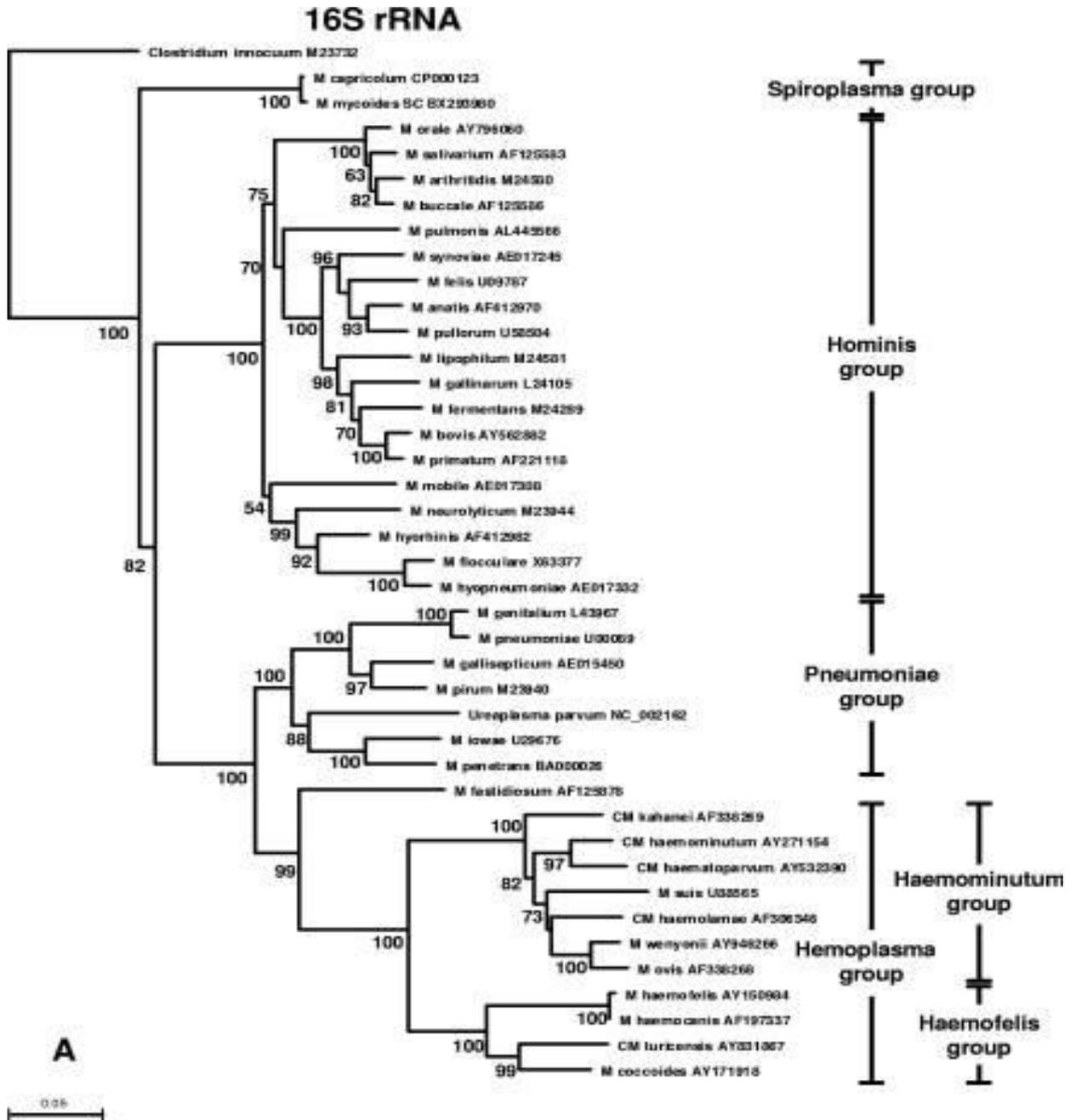


Figura 1. Árvore filogenética dos micoplasmas baseada no gene 16S rRNA. Fonte: Peters et al., 2008.

2.1.3 Epidemiologia

2.1.3.1. Prevalência Mundial

A primeira descrição de *M. haemocanis* foi realizada na Alemanha, em 1928 por Kikueth. Desde então, novos relatos tem sido descritos na literatura mundial. Em 2004, Kemming e colaboradores^a relataram em um estudo com doze cães de um criador da

Alemanha, a ocorrência de *M. haemocanis* causando infecção em dois destes animais, o que até o momento não havia sido relatado na Europa. O surgimento da doença foi desencadeada por uma esplenectomia destinada a preparar os cães para o estudo de choque hemorrágico. A apresentação clínica desses animais incluiu anorexia e anemia hemolítica. Posteriormente, ainda em 2004, Kemming e colaboradores^b realizaram um estudo sobre a prevalência de *M. haemocanis* comparando cães de estimação de Ilinois, Estados Unidos da América, com animais provenientes de canis localizados na França, Hungria e América do Norte. Constatou-se com a utilização da técnica PCR que nenhum (0/60) dos animais de estimação foram positivos para *M. haemocanis*, em contrapartida o nível de detecção nos abrigos variou de 30% a 87%. A elevada taxa de infecção em animais de canis demonstra a necessidade da avaliação dos animais originários de canis para o agente *M. haemocanis* antes da realização de experimentos que causem imunossupressão.

Foram testados por Kenny et al. (2004) um total de 460 cães provenientes do Sul da França. Destes, 15,4% foram positivos utilizando o ensaio de PCR em Tempo Real (qPCR), em que 9,6% das amostras foram positivas para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 3,3% para *M. haemocanis*. Coinfecção foi demonstrada em 2,6% dos cães.

Em estudo desenvolvido em Barcelona, Espanha, foram utilizadas 182 amostras de sangue de cães com o intuito de identificar a prevalência dos agentes *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. Foi documentada a ocorrência de positividade em 14,3% (26/182) dos cães pela qPCR, sendo todos os cães positivos para *M. haemocanis* e um (0,6%) coinfectado com ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (ROURA et al., 2010).

O estudo realizado por Novacco et al. (2010) utilizou um total de 850 amostras de cães originários da Itália, Espanha e Portugal. Destes 82 (9,6%) cães foram PCR-positivos para hemoplasmas caninos, 43 cães para *M. haemocanis*, 34 cães para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e 5 cães coinfectados. Demonstrou-se que a prevalência de hemoplasmas foi significativamente mais elevada em Portugal (40%) do que na Itália (9,5%) e Espanha (2,5%).

Em um estudo realizado por Sasaki et al. (2008) em que animais de ambos os sexos tinham acesso à rua, no Japão, 37 de 913 cães (4,1%) foram positivos para *M. haemocanis*. Dos 913 cães examinados, 73 eram cães da cidade de Tosa e 25 (34,2%) deles foram positivos para *M. haemocanis*. A incidência de *M. haemocanis* foi de 1,4% (12/840) nos demais cães. Dos cães oriundos da cidade de Tosa positivos para *M. haemocanis*, apenas um não pertencia ao sexo masculino, tal achado provavelmente esteja relacionado a disputa por território e conseqüentemente maior possibilidade de brigas entre os cães. Salientando que *M. haemocanis* é transmitido através do contato com o sangue de um animal infectado, podendo ocorrer transmissão por via oral durante brigas (PRYOR; BRADBURY, 1975).

Wengi et al. (2008), realizaram um estudo de prevalência da hemoplasmose canina na Suíça, baseado no qPCR. Foram detectados os agentes pesquisados em 8 dos 889 cães testados para *M. haemocanis* (0,9%) e 3 para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (0,3%). Nenhum cão foi considerado duplamente infectado com ambos hemoplasmas caninos. Curiosamente, a maioria dos cães infectados haviam sido importados de ou tinham visitado regiões onde *R. Sanguineus* é encontrado. Assim, a prevalência da hemoplasmose canina encontrada tende a ser baixa em um país com clima incompatível com o desenvolvimento do vetor de *R. sanguineus*.

Barker et al. (2010), utilizando a técnica qPCR em amostras de sangue de cães do norte da Tanzânia e de cães atendidos em um hospital veterinário de Trindade e Tobago, demonstrou que 19% (19/100) dos cães da Tanzânia foram positivos para *M. haemocanis* e um (1%) destes coinfectado por ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. E, adicionalmente, 4,9%

(9/184) foram positivos para *M. haemocanis*, 2,7% (5/184) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e dois (1,1%) duplamente infectado pelos agentes anteriormente citados em Trindade e Tobago.

Em cães de hábito livre pertencentes a comunidades aborígenes da Austrália, foi relatada a positividade de 43,6% (17/39) para *M. haemocanis* e 21% (8/39) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (BARKER et al., 2012), pela técnica de PCR.

Nas 506 amostras de cães dos Estados Unidos a prevalência foi de 1,3%, sendo 0,6% para *M. haemocanis* e 0,7% para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (COMPTON et al., 2012), utilizando a técnica de PCR.

Tennant et al. (2011) detectaram em uma população de cães originados de propriedades privadas da Grécia a frequência de infecção de 5,6% (8/142) para *M. haemocanis*, 4,2% (6/142) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e coinfeção em apenas 0,7% (1/142) das amostradas.

Em 2009, Zuang e colaboradores, em estudo baseado na análise da sequência do gene 16S rDNA demonstrou que o hemoplasma isolado de cão chinês apresentou maior similaridade com a espécie de felino ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (99%) do que para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (95%). Tem sido sugerido que ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ podem, na realidade, ser o mesmo organismo infectante em diferentes espécies de animais (BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002).

Talukder et al. (2012) utilizando a técnica PCR verificaram em Bangladesh, na Ásia, uma taxa de infecção elevada por *M. haemocanis*, sendo de 20,6% (14/68). Além disso, uma espécie de *Mycoplasma* desconhecido foi detectada em 3,2% (2/68) dos cães. A sequência desse hemoplasma desconhecido teve 98,7% de similaridade com ‘*Candidatus M. turicensis*’, uma bactéria que foi detectada em felinos recentemente (WILLI et al., 2005; WILLI et al., 2006).

Hamel et al. (2012) relataram em seu estudo com 216 cães oriundos da Romênia e Hungria utilizando o método diagnóstico PCR, dezessete cães provenientes da Romênia e um da Hungria positivo para o agente *M. haemocanis*.

Em 2012, Hii e colaboradores publicaram o resultado do estudo realizado na Austrália que utilizaram 130 cães de comunidades aborígenes localizadas na região noroeste do Território Norte e 100 cães do sudeste de Queensland. A técnica utilizada para detecção do agente no estudo foi a PCR e a maioria dos cães da comunidade aborígine apresentaram infecção por *M. haemocanis* (23/130, 17,7%) e só com ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ (3/130, 2,3%). Em Queensland apenas um cão foi positivo ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’, e negativos para as demais espécies de micoplasmas hemotrópicos, sendo essa espécie até a presente data relatado apenas em bovinos.

Em 2014, Torkan e colaboradores, em estudo realizado no Irã analisaram 100 amostras de cães pela técnica PCR multiplex. Treze animais foram positivos (13%) para um organismo intimamente relacionado com *Mycoplasma haemocanis* e dez (10%) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’, enquanto três cães apresentaram co-infecção.

Balakrishnan et al. (2014), realizaram um estudo da prevalência de micoplasma hemotrófico na Universidade Estadual da Carolina do Norte, contendo 118 animais testados. Foi detectado (6/118, 5%) de positividade, sendo a prevalência de (5/118, 4%) para *Mycoplasma haemocanis* e (1/118, 1%) de ‘*Candidatus M. haematoparvum*’.

Maggi e colaboradores em 2014, separaram um total de 99 animais em 4 grupos, o grupo I (n= 30) foi composto por animais clinicamente saudáveis e 69 cães doentes suspeitos de ter um ou mais afecções transmitidas por vetores divididos em 3 grupos. Ao final das

avaliações sorológicas e da PCR, apenas 2 cães foram positivos para o agente *Mycoplasma haemocanis*, sendo um do grupo clinicamente saudável e o outro do grupo de cães que apresentavam um quadro clínico que sugeria estar infectado por uma doença transmitida por vetor.

O ensaio utilizando a técnica de PCR realizado na Austrália foi composto por dois grupos: Território do Norte (n = 138) e Sudeste Queensland (n = 100). Destes, 7,1% (17/238) foram positivos para *M. haemocanis* e 0,4% (1/238) para ‘*C. Mycoplasma haemobos*.’ Cães provenientes do Território Norte eram 3,6 vezes mais susceptíveis de serem infectados com patógenos transmitidos por carrapatos do que os do Sudeste de Queensland, provavelmente devido ao fato de possuir melhores condições climáticas para o desenvolvimento do vetor *R. Sanguineus* (Hii et al.,2015).

Hamel et al. (2015), avaliaram 602 cães oriundos de clínicas veterinárias da Albânia localizada no sudeste da Europa. Destes, 8,8% (53/602) foram positivos para *Mycoplasma haemocanis* pela PCR, enquanto que pelo exame microscópico direto não foi observada a presença do agente.

2.1.3.2 Prevalência no Brasil

A prevalência de hemoplasmas caninos no Brasil esta sendo correlacionada com relatos de casos isolados. A maioria dos estudos aprofundando sobre micoplasmas no Brasil aborda apenas a espécie felina.

Em 1997, O’Dwyer e colaboradores realizaram experimentalmente, a inoculação por via intravenosa com sangue positivo para *Babesia canis* em um cão esplenectomizado e naturalmente infectado por *Hepatozoon canis*. Após a inoculação foi observada no esfregaço sanguíneo a presença de dois protozoários e de formas cocóides, e em cadeia, de *M. haemocanis* na superfície dos eritrócitos. O aparecimento do agente *M. haemocanis* pode ter ocorrido em função da inoculação ou da supressão imunológica causada pelos outros dois agentes, ocorrendo uma bacteremia acentuada.

Em Belo Horizonte foi realizado um estudo retrospectivo em animais com suspeita de hemoparasitoses no hospital veterinário entre os anos de 1998-2001. Dos 194 casos suspeitos, 145 foram confirmados para ocorrência de hemoparasitoses em geral pela técnica de diagnóstico parasitológico direto. Dentre os 52 casos que apresentaram infecção por *Ehrlichia spp.*, em 5 casos foram detectadas coinfeção por *M. haemocanis* e *B. canis* (MOREIRA et al., 2003).

Posteriormente em um hospital veterinário em Londrina, amostras de 40 cães foram testadas utilizando a técnica de PCR, sendo demonstrada a infecção por *M. haemocanis* em quatro cães não esplenectomizados (DE MORAIS et al.,2003). Ainda no Paraná foi relatada a coinfeção de dois cães por *Babesia gibsoni* e *M. haemocanis* por Trapp et al. (2006).

A PCR convencional utilizada para detecção de ‘*Candidatus M. turicensis*’ em gatos foi utilizada com sucesso na detecção deste agente em cães esplenectomizados. Após a análise por sequenciamento do fragmento amplificado foi constatado que os cães estavam infectados por ‘*Candidatus M. turicensis*’ (SANTOS, 2008), sendo então relatado pela primeira vez no Brasil.

Em estudo realizado na região metropolitana de Recife, baseado na caracterização molecular e genética de patógenos transmitidas por carrapatos em cães, foi identificado um cão positivo para *M. haemocanis* (RAMOS et al., 2010).

Em Goiânia foram avaliadas 300 amostras de sangue cujo diagnóstico parasitológico direto foi de 4,33% *Ehrlichia canis*, 3% Piroplasmídeo, 2,67% *Anaplasma platys*, 1%

Hepatozoon canis, 0% *M. haemocanis*. Nos resultados obtidos a partir da PCR, 42,66% dos cães foram positivos para *E. canis*, 6% *A. platys*, 5% *B. vogeli*, 3% *H. canis* e 2,34% para *M. haemocanis*. Todos os cães positivos no exame parasitológico direto foram positivos nos ensaios de PCR (COSTA, 2011).

Em Ribeirão Preto, São Paulo, a prevalência de *Mycoplasma* spp., detectada por qPCR, foi considerada baixa. Entre os 154 cães testados, apenas 1,9% foram positivos para *M. haemocanis* e 0,6% para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (ALVES et al., 2014).

No Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo em Porto Alegre foram coletadas 347 amostras de sangue de cães e posteriormente submetidas a técnica de PCR convencional sendo diagnosticadas positivas 5,1% para *M. haemocanis*, 1,8% para o agente ‘*Candidatus M. haemominutum*’, enquanto que 6,4% das amostras foram positivas para *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ou ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (VALLE et al., 2014).

Em um estudo de investigação de prevalência em um assentamento de área rural na região Sul do Brasil, utilizando a qPCR, foram avaliados 132 cães, dos quais 59 (44,7%) amostras foram positivas para hemoplasmas: 21 (15,9%) *M. haemocanis*, 12 (9,09%) ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ e 21 (15,9%) para ambos agentes. (VIEIRA et al., 2015).

2.1.3.3 Fatores de risco

De acordo com Messick (2004) os animais podem ser predispostos à infecção aguda devido à idade, doença concomitante, imunossupressão ou esplenectomia. A manifestação de sinais clínicos em cães infectados por micoplasmas hemotróficos está correlacionada à presença de imunossupressão preexistente, infecção por parvovírus, esplenectomia, linfoma ou infecção microbiana simultânea.

Tais condições clínicas parecem desempenhar um papel na patogênese da micoplasmose em cães (BRODEY, et al., 1963; WEST, 1979; GRENTILLAT, 1981; HOSKINS, 1991; LESTER et al., 1995; NOVACCO et al., 2010). Outros autores relataram como fator de risco para infecção animais que vivem em canis, idade e gênero (PRYOR & BRADBURY, 1975; BAKER et al., 1971; KEMMING et al., 2004^a; SASAKI et al., 2008; NOVACCO et al., 2010; VIEIRA et al., 2015).

2.1.3.4 Transmissão

Estudos relacionados com a transmissão de hemoplasmas em cães são escassos e em sua maioria inconclusivos. O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é considerado o principal vetor de *M. haemocanis* em cães (SENEVIRATNA et al., 1973; MESSICK, 2003). Os hemoplasmas caninos têm distribuição mundial, embora a maior prevalência seja relatada em áreas geográficas onde tem maior distribuição do carrapato vetor *R. Sanguineus* (SYKES et al., 2004; INOKUMA et al., 2006; WENGI et al., 2008; BARKER et al., 2010; NOVACCO et al., 2010; TENNANT et al., 2011). Igualmente, estudos experimentais sugerem a pulga *Ctenocephalides felis* como responsável pela transmissão de *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em gatos (WOODS et al., 2005). *C. felis* é um dos mais importantes ectoparasitos de cães e gatos no mundo inteiro, em virtude de sua distribuição geográfica, dupla ação parasitológica como agente infestante e vetor de doenças, perdas econômicas e resistência adquirida contra inseticidas comuns (LINARDI; SANTOS, 2012).

No entanto, existem outras formas possíveis de transmissão, tais quais as transfusões de sanguíneas, transmissão transplacentária, durante o nascimento e a lactação, uso de

equipamentos e material cirúrgico contaminado sem correta esterelização, por via oral ou penetrando devido à inoculação de sangue direta no momento de disputas por território entre os animais (MACWILLIAMS; FURNEAUX, 1973; SENEVIRATNA et al., 1973; PRYOR et al., 1975; KRAKOWKA, 1977; LESTER et al., 1995; MESSICK, 2003; SASAKI et al., 2008; WILLI et al., 2010; TASKER, 2010). Deve ser investigada a infecção direta por sangue durante a mordida ou a partir do contato com saliva contaminada, como com hemoplasmas felinos (*M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*') encontrados na saliva e nas glândulas salivares de gatos contaminados experimentalmente (DEAN et al., 2008).

2.1.4 Patogenia da hemoplasmose

Os mecanismos responsáveis pela indução de dano aos eritrócitos por hemoplasmas não foram completamente elucidados. Tem sido sugerido que os hemoplasmas alteram a forma e a capacidade de deformabilidade dos eritrócitos, potencialmente interferentes com a perfusão tecidual e descarga de oxigênio no nível de microcirculação e induzindo o sequestro de eritrócitos devido a fagocitose de parasitos (KEMMING et al., 2004^{a,b}). A hemólise imunomediada também pode contribuir para a compreensão dos mecanismos e dos fatores de virulência e patogenicidade dos micoplasmas caninos. Algumas espécies podem causar hemólise em ágar-sangue, indicando a possível produção de enzimas hemolíticas (CHALKER, 2005).

A adesão destes hemoparasitos aos eritrócitos resulta em dano direto à membrana celular e conseqüentemente na redução de sua vida útil (TASKER, 2004). Há dois mecanismos envolvidos na ocorrência da anemia: a hemólise intra e extravascular. Os hemoplasmas induzem alteração estrutural ao se ligarem na superfície dos eritrócitos resultando em modificação antigênica ou exposição de antígenos localizados internamente na membrana celular com conseqüente produção de anticorpos anti-eritrócitos pelo hospedeiro. Na hemólise extravascular há sequestro e fagocitose das hemácias por macrófagos do baço, fígado, pulmão e medula óssea (TASKER, 2010), além de determinar a ocorrência de anemia hemolítica imunomediada (AHIM) secundária (VILLIERS, 2005). Quando ocorre a fixação do complemento pelas imunoglobulinas, há aumento da fragilidade osmótica levando à hemólise intravascular (TASKER, 2010).

No estudo realizado por Pitorri e colaboradores (2012), presuntivamente foi diagnosticada a anemia hemolítica com base na ocorrência de uma grave anemia regenerativa na ausência de evidência clínica de perda de sangue interna ou externa. No entanto, não foi realizado o teste de Coomb's, não observaram na avaliação microscópica direta a presença de esferocitose e a ocorrência autoaglutinação, que possibilitaria outras evidências da possibilidade de anemia hemolítica imunomedia.

Enquanto investigava uma possível correlação entre anemia hemolítica imunomediada (AHIM) e micoplasmas hemotropicos em 227 cães no Reino Unido, verificou-se que dos 37 cães anêmicos com AHIM primária, 77 cães com anemia que não satisfaziam os critérios de inclusão para AHIM primária e 113 cães sem anemia foram todos negativos para hemoplasmas caninopela qPCR (WARMAN, et al., 2010), sugerindo que pode não haver associação entre anemia e à infecção pelo agente.

2.1.5 Sinais clínicos e achados laboratoriais

A maioria dos cães infectados por hemoplasmas são relatados como portadores assintomáticos crônicos do agente ou em infecção latente. Nesta forma de infecção, os

microrganismos são encontrados apenas periodicamente e em número reduzido no sangue (HOSKINS 1991; KEMMING et al., 2004; CHALKER, 2005; HUEBNER et al., 2006; NOVACCO et al., 2010). Apenas casos esporádicos de forma aguda grave, com anemia hemolítica têm sido relatados, geralmente em imunocomprometidos, doença coexistente ou cães esplenectomizados (BUNDZA et al., 1976; SYKES et al., 2004; KEMMING et al., 2004^{a,b}; KENNY et al., 2004; CHALKER, 2005; WIILI et al., 2010).

Dentre os sinais clínicos que podem ser observados nos cães com hemoplasmas, cita-se anorexia, letargia, perda de peso, inapetência, febre e mucosas pálidas. Os esfregaços sanguíneos podem apresentar anisocitose, poiquilocitose, policromasia, corpúsculo de Howell-Jolly e corpos de inclusão semelhantes a cocos e formas de cadeia na superfície dos eritrócitos (BUNDZA et al., 1976; KEMMING et al., 2004^a; WIILI et al., 2010). Ocorrência de teste de Coomb's indireto positivo, pode contribuir para o diagnóstico da anemia autoimune (BUNDZA et al., 1976).

As infecções crônicas, em fase de latência, podem ser reativadas devido às doenças concomitantes, como erliquiose (INOKUMA, 2006), babesiose (BAKER et al., 1971; WRIGTH, 1971) e septicemia (PRYOR & BRADBURY, 1975; NOVACCO et al., 2010). Alterações na resposta imunológica podem explicar o desenvolvimento de infecções oportunistas em alguns animais com hemoplasmoses latente. Há uma falta de informação sobre o curso clínico da doença em cães infectados com '*Candidatus M. haematoparvum*'. O curso clínico das infecções em cães por '*Candidatus M. haemominutum*' e '*Candidatus M. turicensis*' é em grande parte desconhecido. Por outro lado, a infecção por *M. haemocanis*, que é encontrado em todo o mundo, geralmente induz a anemia clinicamente significativa, particularmente em cães imunocomprometidos ou esplenectomizados (BRINSON & MESSICK, 2001; INOKUMA et al., 2006; NOVACCO et al., 2010; RAMOS et al., 2010). A primeira descrição do '*Candidatus M. haematoparvum*' em associação com anemia foi relatada por Sykes, et al. (2004) em um cão esplenectomizado submetido a quimioterapia para a leucemia. A partir de então, correlacionou-se a infecção aguda por '*Candidatus M. haematoparvum*' com animais imunocomprometidos, esplenectomizados ou com neoplasia (SYKES, et al., 2005; WENGI, et al., 2008). No entanto, a maioria dos cães infectados apresentam infecções crônicas e assintomáticas (CHALKER, 2005).

2.1.6 Diagnóstico

O método mais comumente utilizado para diagnóstico da hemoplasmoses é a demonstração de organismos na superfície dos eritrócitos por meio da microscopia óptica de esfregaços sanguíneos, bem como associação com sinais clínicos, histórico e hábitos de vida do animal (TOLEDO-PINTO et al., 2005).

2.1.6.1 Citologia de esfregaços sanguíneos

Historicamente o diagnóstico da micoplasmose é realizado utilizando a técnica citológica de esfregaço sanguíneo, onde principalmente o *M. haemocanis* aparece na forma cocóide, de anéis, hastes ou cadeias em severas infestações (VENABLE et al., 1968; MESSICK et al., 2002; TASKER, 2010). A técnica de citologia requer que o micro-organismo esteja em quantidade e seja grande o suficiente para ser visualizado microscopicamente. Com o aumento da bacteremia, os organismos podem ser observados em esfregaços de sangue periférico, porém com reduzida sensibilidade e especificidade diagnóstica (BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK, 2004; CHALKER, 2005).

A sensibilidade da técnica reduz à medida que a doença progride em decorrência da tendência natural do sistema imune do hospedeiro em reduzir a quantidade do agente no organismo (VEIR & LAPPIN, 2010), devido adaptação do organismo à infecção. Os hemoplasmas são tipicamente encontrados na periferia das hemácias, podendo estar na forma única, em pares, ou em cadeias em severas infestações. Ocasionalmente, podem ser vistos livre dos eritrócitos (MESSICK, 2003; TASKER, 2010). A escolha por esfregaços sanguíneos frescos é imperativa, uma vez que os parasitas se destacam das hemácias em poucas horas quando na presença de EDTA (ALLEMAN et al., 1999), característica que adicionada ao caráter flutuante da parasitemia dos hemoplasmas conferem comumente resultados falso-negativos (SYKES, 2003; TASKER, 2010). Resultados falso-positivos ocorrem comumente quando os hemoplasmas são confundidos com precipitados de corante, corpúsculos de Howell-Jolly, artefatos secundários à secagem lenta do esfregaço sanguíneo ou ponteados basofílicos (SYKES, 2003; KEMMING et al., 2004^a; TASKER, 2013).

Devido a parasitemia cíclica e infecção crônica, esta técnica não é nem sensível nem específica para o diagnóstico. Com o surgimento das técnicas de diagnóstico molecular, como PCR convencional e PCR em tempo real, as mesmas têm sido amplamente utilizadas e com sucesso na identificação de animais agudamente e cronicamente infectados (MESSICK, 2004; HOELZLE, 2008).

2.1.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Devido ao desenvolvimento da técnica de PCR que amplifica exponencialmente fragmentos específicos de DNA até níveis detectáveis (TASKER & LAPPIN, 2002; TASKER, 2010), esta tem se tornado o método de escolha para o diagnóstico de infecções por hemoplasmas devido à elevada sensibilidade e especificidade, permitindo obter um diagnóstico preciso e, através do sequenciamento do fragmento amplificado, comparar a posição filogenética dos hemoplasmas (MESSICK, 2003; TASKER, 2006).

Estudos demonstram que a PCR tem maior sensibilidade na detecção de hemoplasmas quando comparada a citologia em diversos estudos. A frequência de hemoplasmas determinada pela técnica de citologia varia entre 0,48% a 6,7% enquanto que por PCR os níveis de detecção variam entre 6,5% a 56,7% (CRIADO-FORNELIO et al., 2003; BAUMANN et al., 2006; MAIA, 2008; BORTOLI et al., 2012; JENKINS et al., 2013). No entanto, o relato realizado por Hulme-Moir et al., (2010) descreve que utilizando a técnica de qPCR como método diagnóstico, observou-se uma redução significativa do número de cópias *M. haemocanis*, e meses após o término do tratamento a técnica citológica não detectava a parasitemia.

Salientando a similaridade apresentada em estudos de filogenética do gene 16S rRNA entre *M. haemofelis* e *M. haemocanis* acima de 99% de homologia, são utilizados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores para detecção de hemoplasmas felinos e caninos (TASKER et al., 2003; BRINSON; MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002). As reações atualmente existentes amplificam, principalmente, fragmentos dos genes 16S rRNA e rnpB (MESSICK, 2003; TASKER, 2010). Além disso, a inclusão da qPCR é um ensaio molecular mais sensível que PCR convencional (TASKER, 2010), permitindo assim quantificar o DNA do parasito presente na amostra e conseqüentemente monitorar a resposta ao tratamento (BRADDOCK et al., 2004; TASKER, 2010; HULME-MOIR et al., 2010). Recentemente foi reportada um Multiplex PCR (m-PCR) capaz de detectar de forma rápida e fácil os agentes *M. haemocanis* e '*Candidatus M. haematoparvum*' (TORKAN et al., 2014).

2.1.6.3 Testes sorológicos

O desenvolvimento de técnicas sorológicas é trabalhoso, uma vez que os hemoplasmas não são cultivados *in vitro* em decorrência da ausência de conhecimento específico sobre suas características de crescimento e requerimento energético. Desta forma os antígenos devem ser obtidos por meio de infecção experimental. Logo, testes sorológicos, baseados em proteínas do parasito, ainda não estão disponíveis comercialmente, muito embora estudos estejam sendo desenvolvidos nesse propósito. Estudos têm sido direcionados na identificação e expressão de proteínas recombinantes com potencial imunogênico (BARKER et al., 2011b; MESSICK; SANTOS, 2011). Wolf-Jäckel et al. (2010) identificaram, caracterizaram e produziram antígeno recombinante da proteína DNAk a partir de felinos natural e experimentalmente infectados por *M. haemofelis*. O antígeno foi reconhecido com sucesso por anticorpos de gatos infectados com *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ por meio dos testes sorológicos ‘*Western blotting*’ e Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). Baumann et al. (2013) observaram soroconversão satisfatória em gatos infectados por *M. haemofelis* utilizando a mesma técnica.

2.1.7 Tratamento

No tratamento, doxiciclina é o antibiótico de escolha, este inibe a síntese de proteínas bacterianas. Recentemente a enrofloxacina, foi descrita com ação igual ou superior aos medicamentos doxiciclina. Assim, o tratamento com doxiciclina ou enrofloxacina pode efetivamente controlar a infecção aguda, mas nenhum dos antibióticos testados até a data retira os parasitas definitivamente do organismo (HOSKINS, 1991; MESSICK, 2003; WILLI et al., 2010). A administração concomitante de corticosteróides no tratamento de hemoplasmose canina é utilizada para limitar a hemólise e fagocitose de hemácias (KEMMING, et al., 2004^a).

Sharifiyazdi e colaboradores (2014) utilizaram ciprofloxacina e prednisona no tratamento de um cão não-esplenectomizado positivo para ‘*Candidatus Mycoplasma hematoparvum*’ que apresentava um processo hemolítico, piroxia e depressão. Os sinais clínicos melhoraram após três dias e dois meses pós-tratamento não houve recorrência da infecção.

Hulme-Moir et. al. (2010) descreveram pela primeira vez o uso da qPCR para monitorar o tratamento da infecção por *M. haemocanis* em cão esplenectomizado. Os resultados da análise indicam que nem a oxitetraciclina, nem a enrofloxacina foram eficazes na redução significativa do número de cópias de *M. haemocanis* mesmo após 11 meses de tratamento. No entanto, os animais apresentaram melhoria nos parâmetros hematológicos e houve controle dos sinais clínicos de forma satisfatória.

É digno de nota, que vários autores relataram a melhora clínica do paciente, mas o término da infecção não foi alcançado, permanecendo o mesmo positivo para *M. haemocanis* (HOSKINS, 1991; BRISON & MESSICK, 2001; KEMMING et al.^{a, b}, 2004; DONOVAN, 1960).

2.1.8 Prevenção

Como a epidemiologia da hemoplasmose canina é pouco compreendida, sua prevenção torna-se difícil. Considerando as diversas possibilidades de transmissão associadas aos fatores de risco, recomenda-se o controle dos artrópodes vetores. Assim, considerando

que o carrapato *R. sanguineus* é considerado o principal vetor de *M. haemocanis* em cães (SENEVIRATNA et al., 1973; MESSICK, 2003) e que estudos sugerem a participação da pulga *C. felis* como possível vetor, o controle destes ectoparasitas torna-se primordial.

Adicionalmente, é de notável importância evitar que ocorram superpopulação de animais, pois devido à disputa por território podem ocorrer brigas facilitando a inoculação direta do agente através de ferimentos e trocas de fluidos corporais. Adicionalmente, em locais onde há super aglomeração de animais, há maior risco de exposição a pulgas e carrapatos.

2.1.9 Importância em Saúde Pública

Historicamente, infecções por organismos semelhantes aos hemoplasmas foram relatadas em humanos por meio de diagnóstico citológico, especialmente naqueles portadores de alguma alteração sistêmica, tais quais, neoplasia, lúpus eritematoso sistêmico e portadores do vírus HIV (CLARK, 1975; PUNTARIC et al., 1986; DUARTE et al., 1992; YANG et al., 2000; BOSNIC et al., 2010). Tasker et al. (2010) não conseguiram confirmar as infecções reportadas previamente por Clark et al. (1975) e Yang et al. (2000) a partir de DNA obtido dos respectivos esfregaços sanguíneos dos humanos, indicando que possivelmente tratavam-se de infecções por outros agentes.

No Brasil, *M. haemofelis* foi detectado no sangue de um paciente humano HIV positivo hospitalizado com sintomas clínicos, coinfestado por *Bartonella henselae* e com histórico de mordida e arranhaduras por gatos. Os gatos do paciente também foram positivos para *M. haemofelis* e para *Bartonella* spp. (SANTOS et al., 2008). Tasker et al. (2010) encontraram DNA de hemoplasma em paciente sul africana portadora do vírus HIV, entretanto, a espécie não pode ser caracterizada devido à baixa parasitemia. Acrescenta-se a isso, a similaridade apresentada em estudos de filogenética do gene 16S rRNA, com homologia acima de 99% entre *M. haemofelis* de ocorrência em felinos com *M. haemocanis* em cães (TASKER et al., 2003; BRINSON & MESSICK, 2001; BIRKENHEUER et al., 2002). Assim, deve-se considerar que hemoplasmas podem, possivelmente, atuar como um agravante em pacientes imunocomprometidos.

Médicos veterinários também representam um grupo de risco a estas infecções. Maggi et al. (2013) reportaram coinfeção por *Anaplasma platys*, *B. henselae* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ em uma médica veterinária que estava frequentemente em contato com animais domésticos e silvestres e seus vetores e apresentava histórico de mordidas e arranhaduras. Hu et al. (2009) evidenciou infecção pelo micoplasma hemotrófico, *Mycoplasmas suis*, em médicos veterinários e fazendeiros na China.

Poucas informações estão disponíveis a respeito da ocorrência de micoplasmas em humanos, bem como sobre seu potencial zoonótico. Desta forma, médicos veterinários que representam grupo de risco devem manipular o sangue de animais infectados com cautela (SYKES, 2010) e utilizar equipamentos de proteção e hábitos de higiene em qualquer procedimento com animais (MAGGI et al., 2013).

3 METODOLOGIA

3.1 Princípios éticos

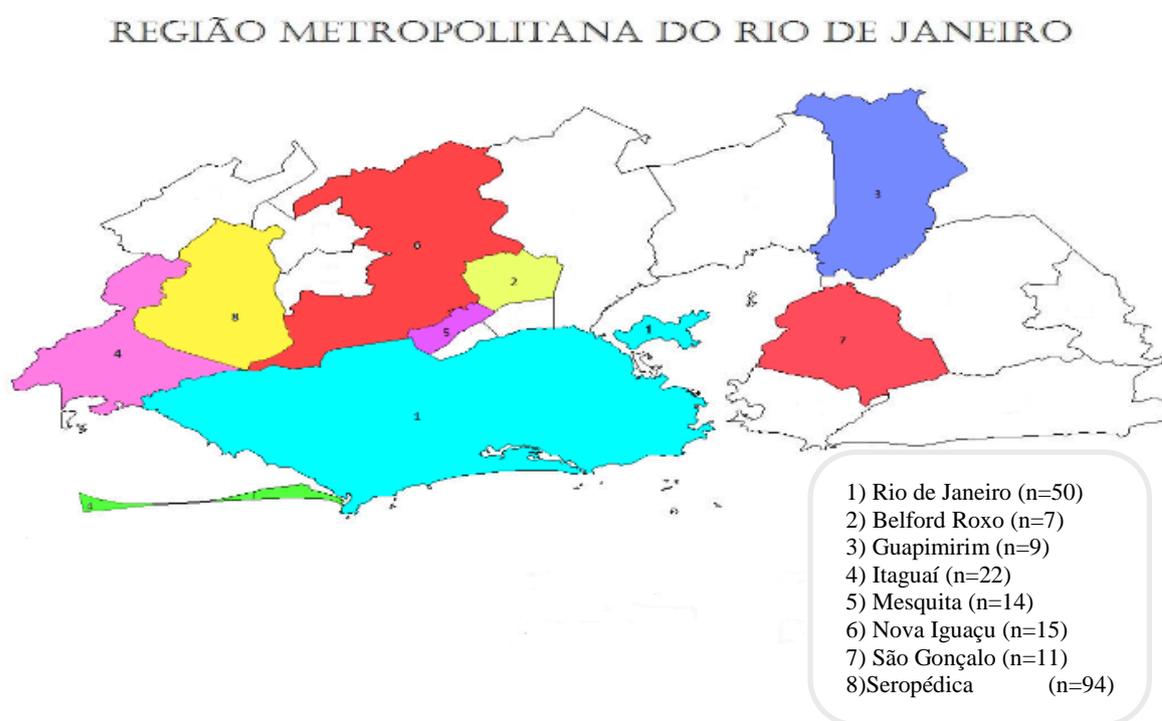
Os procedimentos realizados nos animais desse estudo foram aprovados pela CEUA/IV/UFRRJ (A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), sob o protocolo número 028/2014 e atende aos princípios básicos e éticos para pesquisa envolvendo o uso de animais. Todos os procedimentos foram realizados por uma equipe de médicos veterinários capacitados.

3.2 Animais

Foram avaliadas 222 amostras (149 fêmeas e 73 machos) obtidas de cães domésticos, provenientes de treze abrigos localizados na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro: Seropédica (4 abrigos), Belford Roxo (1 abrigo), Itaguaí (1 abrigo), Mesquita (2 abrigos), Nova Iguaçu (1 abrigo), São Gonçalo (1 abrigo), Guapimirim (1 abrigo), Rio de Janeiro (2 abrigos) (Figura 1). Previamente a colheita de sangue, os responsáveis pelos animais foram devidamente esclarecidos sobre os termos do projeto, objetivos e importância do estudo e posteriormente um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) foi assinado permitindo a coleta do sangue e uso do material na pesquisa. No momento da coleta de sangue foram observados dados relacionados ao hospedeiro (gênero, idade, histórico de brigas, acesso a rua, castração, histórico de pulgas, histórico de carrapatos, presença de pulgas, presença de carrapatos, animais contactantes) (ANEXO B). As amostras foram coletadas por conveniência, de acordo com a disponibilidade dos responsáveis pelos abrigos. Adicionalmente, os abrigos foram classificados de acordo com a sua condição estrutural e higiênico-sanitária (ANEXO C) em: ótimo, bom, razoável, ruim e péssimo. Sendo os abrigos considerados péssimos havia alimentação insuficiente, superlotação, não ocorria divisão dos animais em recintos diferentes, a maioria dos animais não castrados, não havia controle de ectoparasitas, endoparasitas e animais contactantes. Abrigos considerados ruins apresentavam alimentação em quantidade suficiente no entanto de qualidade inferior, superlotação, poucos animais castrados, uma pequena separação dos animais por sexo distintos na maioria das vezes, sem controle de ectoparasitas e endoparasitas. Abrigos considerados de qualidade razoável apresentavam alimentação em quantidade suficiente no entanto de qualidade inferior, grande quantidade de animais por recinto, maior proporção de animais castrados correlacionado com os abrigos considerados inferiores na classificação, com controle de ectoparasitas, endoparasitas e contactantes de forma insuficiente. Abrigos considerados bons possuíam alimentação suficiente e de qualidade, não havendo superlotação nos recintos, a maioria dos cães eram castrados e havia controle de ectoparasitas e endoparasitas na maioria dos cães. O abrigo considerado ótimo possuía alimentação de qualidade e suficiente, animais dispostos em recintos com poucos animais e respeitando afinidades e necessidades individuais, a castração era feita regularmente e havia controle de ectoparasitas e endoparasitas eficiente.

O exame clínico (ANEXO B) dos cães foi realizado antes da obtenção das amostras de sangue foram avaliados: comportamento, estado corporal, temperatura retal, pulso, movimentos respiratórios, tempo de preenchimento capilar, coloração das mucosas, presença de ectoparasitos.

Figura 2. Municípios pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Locais de obtenção das amostras e total de animais coletados por localidade.



3.3 Coleta de Sangue

As amostras sanguíneas foram de volume aproximado a 2 ml e obtidas por venopunção cefálica ou jugular. O sangue foi dividido em um frasco contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e em outro sem anticoagulantes para posterior separação do soro sanguíneo por centrifugação. As amostras de soro foram preservadas a -20°C até a realização das determinações bioquímicas, conforme descrito abaixo. As amostras nos tubos contendo EDTA foram empregadas na análise hematológica e posteriormente armazenados à -80°C para posterior utilização nos ensaios de biologia molecular, conforme descrito abaixo.

Uma fração do sangue fresco coletado foi utilizada para a confecção de esfregaços sanguíneos a fim de realizar o diagnóstico direto dos hemoplasmas.

3.4 Análises Hematológicas

A análise hematológica foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LABVET/UFRRJ). As análises foram executadas em contador automático de células Poch100/Roche, segundo recomendações do fabricante e com auxílio de microscópio óptico comum. Os parâmetros hematológicos determinados foram contagem global de hemácias, leucócitos e plaquetas, determinação de hemoglobina, volume globular e índices hematimétricos CHCM e VCM. Morfologia eritrocitária e leucometria específica foram realizadas com auxílio de microscópio (1000x) após coloração dos esfregaços sanguíneos pelo Método Romanowsky (Giemsa) (JAIN, 1993). A pesquisa dos agentes eritrocíticos consistiu na detecção de formas evolutivas do parasita por leitura de 200 campos do esfregaço com o auxílio de microscópio óptico (1000x). A concentração de proteínas totais foi determinada pela técnica de refratometria. Nos animais que apresentaram anemia, foi realizada a contagem de reticulócitos, conforme técnica descrita por Thrall (2007).

3.5 Análises Bioquímicas

Os perfis bioquímicos foram realizados no LABVET/UFRRJ através de analisador bioquímico semi-automático (Bioplus), utilizando-se *kits* comercialmente disponíveis, de acordo com as recomendações do fabricante. Os parâmetros séricos avaliados foram: proteína total, albumina, globulina, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA). A avaliação dos parâmetros foi realizada de acordo com a disponibilidade do volume de soro.

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.6.1 Extração de DNA de sangue total

Uma amostra de 200 µL de sangue total dos cães foi submetida ao processo de extração de DNA total utilizando o Kit Relia Prep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para monitoramento de DNA contaminante durante o processo de extração de DNA total foi utilizado como controle negativo 200 µL de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®) em cada bateria de amostras processadas. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

3.6.2 Reações de Amplificação para hemoplasmas

3.6.2.1 PCR em Tempo Real (qPCR) para *Mycoplasma* spp.

As todas as 222 amostras de DNA dos cães foram submetidas inicialmente à qPCR baseada no gene que codifica o 16S RNA ribossomal (16S rRNA), cujos fragmentos de 170pb e 190pb amplificados correspondem as espécies *Mycoplasma haemocanis* e '*Candidatus* M. haemoninutum', respectivamente. Para esta análise, utilizaram os oligonucleotídeos

iniciadores Forward 5'-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA-3' e Reverse 5'-ACGCCCAATAAATCCGRATAAT-3', descritos por KEWISH et al. (2004).

As reações foram realizadas no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes especificações: volume final de 12µL, contendo uma mistura de 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix, 0,625µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3µL (±30ng/µL) de DNA teste ou controle. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por com 45 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento/extensão a 60°C por 70 segundos. Após a amplificação, uma curva de dissociação obtida serviu para verificar a especificidade da amplificação. Foram consideradas positivas amostras com limiar de detecção (C_T) de até 40 ciclos, cujo produto amplificado apresentou a mesma temperatura de dissociação dos controles positivos.

Posteriormente, as amostras positivas foram submetidas à reação com par de oligonucleotídeos iniciadores mais específicos para cada espécie baseados no gene 16S rRNA, conforme descrito abaixo.

3.6.2.2 Reação de amplificação específica para *Mycoplasma haemocanis*

As amostras 45 amostras positivas na técnica de qPCR foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmento de 393pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Hfelis-fl 5'-GACTTTGGTTTCGGCCAAGG-3' e Hfelis-r3 5'-CGAAGTACTATCATAATTATCCCTC-3', descritos por Berent et al. (1998). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (Veriti®, modelo 9902) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,0mM de Cloreto de magnésio, 1,25U de *Taq* polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos com 40 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final de 72°C por 7 minutos.

3.6.2.3 Reação de amplificação específica para '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'/'*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'

As amostras 45 amostras positivas na técnica de qPCR foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmento de 192pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, utilizaram os oligonucleotídeos iniciadores Cali-F1 5'-GCATAATGTGTCGCAATC-3' e Cali-R1 5'-GTTTCAACTAGTACTTTCTCCC-3' descritos por Foley et al. (1998).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (Veriti®, modelo 9902) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5mM de Cloreto de magnésio, 1,25U de *Taq* polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos com 38 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 54°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por extensão final de 72°C por 7 minutos.

3.6.2.4 Reação de amplificação específica para ‘*CandidatusMycoplasma turicensis*’

As todas as 222 amostras de DNA dos cães foram submetidas à PCR convencional para a amplificação de fragmento de 488pb do gene 16S rRNA. Para esta análise, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Mt-Fw 5'-GTATCCTCCATCAGACAGAA-3' e Mt2-Rv 5'-CGCTCCATATTTAATTCCAA-3', descritos por Santos et al. (2009).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador (Veriti®, modelo 9902) com as seguintes especificações: volume final de 25µL, contendo uma mistura de 3µL DNA teste ou controle, 200mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0.4µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1.5mM de Cloreto de magnésio, 1,25U de *Taq* polimerase, tampão de PCR (1x) e água ultra-pura esterilizada. As condições de amplificação consistiram em: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos com 35 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.6.3 Controles positivos e negativos dos ensaios moleculares

Os controles positivos que foram utilizados em todos os ensaios moleculares de micoplasmas hemotróficos foram gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Rosângela Zacarias Machado e Prof. Dr. Marcos Rogério André (UNESP/Jaboticabal), colaboradores do presente estudo. Água ultrapura livre de DNase e RNase (UltraPure™, Invitrogen) foi utilizada como controle negativo das reações.

3.6.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, a 80 V, durante 90 minutos e corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por 15 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de acordo com o tamanho do produto esperado (100pb/1Kb DNA Ladder, Invitrogen®). Os resultados foram visualizados e analisados através do transiluminador de luz ultravioleta L-PIX Touch (Loccus biotecnologia), no qual as bandas observadas nas amostras foram comparadas ao peso molecular para confirmação da amplificação do fragmento esperado.

3.7 Análise estatística

O teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância foi utilizado para verificar a correlação entre hemoplasmas hemotróficos e os dados obtidos, incluindo as alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas, bem como as variáveis gênero, raça e idade.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade de *Lilliefors* quando apresentaram normalidade foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste t de *Student*. Entretanto, quando apresentaram não normalidade foram submetidos ao teste *Mann-Whitney*. Para a realização de todos os testes estatísticos acima mencionados foi utilizado o programa de análise estatística Bioestat 4.0.

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa de hemoplasmas em esfregaço sanguíneo

Nos esfregaços sanguíneos dos cães positivos na qPCR, foi analisada a presença de hemoparasitos, dos quais 13,33% (6/45) apresentaram estruturas epieritrocíticas sugestivas de infecção por hemoplasmas (Figura 3). No entanto, ressalta-se que houve dificuldade de visualização das estruturas devido a precipitação de corante nas lâminas.

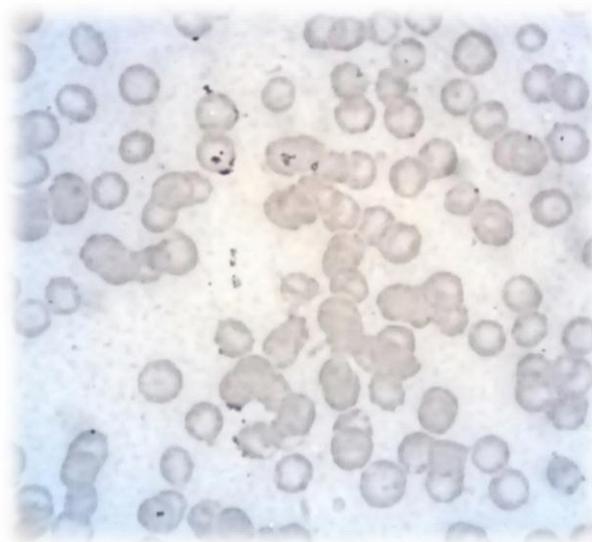


Figura 3. Esfregaço de sangue apresentando estruturas epieritrocíticas sugestivas de hemoplasmas em cocos em cadeia. (Giemsa, 1000x).

4.2 Diagnóstico molecular de hemoplasmas baseado no gene 16S rRNA

A detecção de *Mycoplasma* spp. nos cães amostrados foi obtida por meio da técnica de qPCR. Na análise dos resultados obtidos, 20,27% (45/222) dos cães amostrados apresentaram amplificação do fragmento do gene 16S rRNA (Figura 4), sendo portanto, considerados positivos. O valor médio de CT observado nas amostras positivas foi de 29,89 ciclos, com variação entre 20,79 e 40,94 ciclos. A temperatura de dissociação (T_m) dos produtos amplificados foi semelhante a do controle positivo, indicando a especificidade da reação (Figura 5).

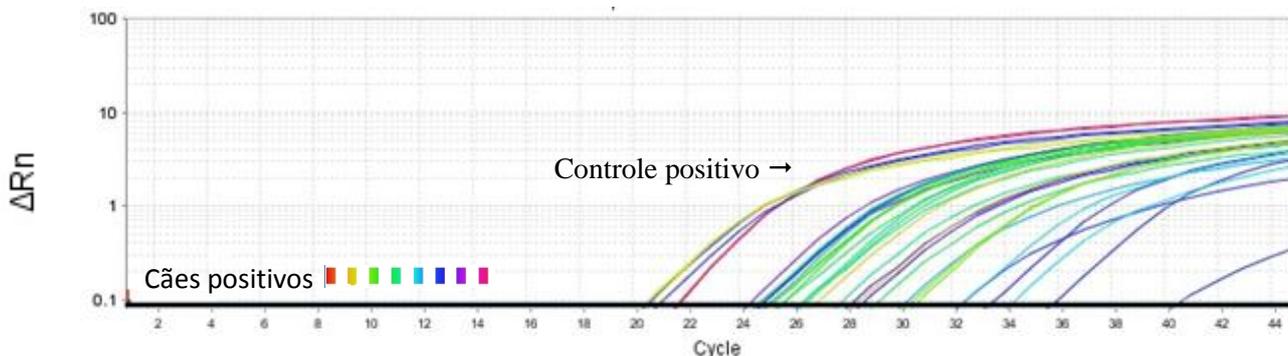


Figura 4. Curva de amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. obtidos pela PCR em tempo real (Sistema SYBRGreen). As linhas em cor de rosa indicam o controle positivo e as demais linhas, as amostras positivas.

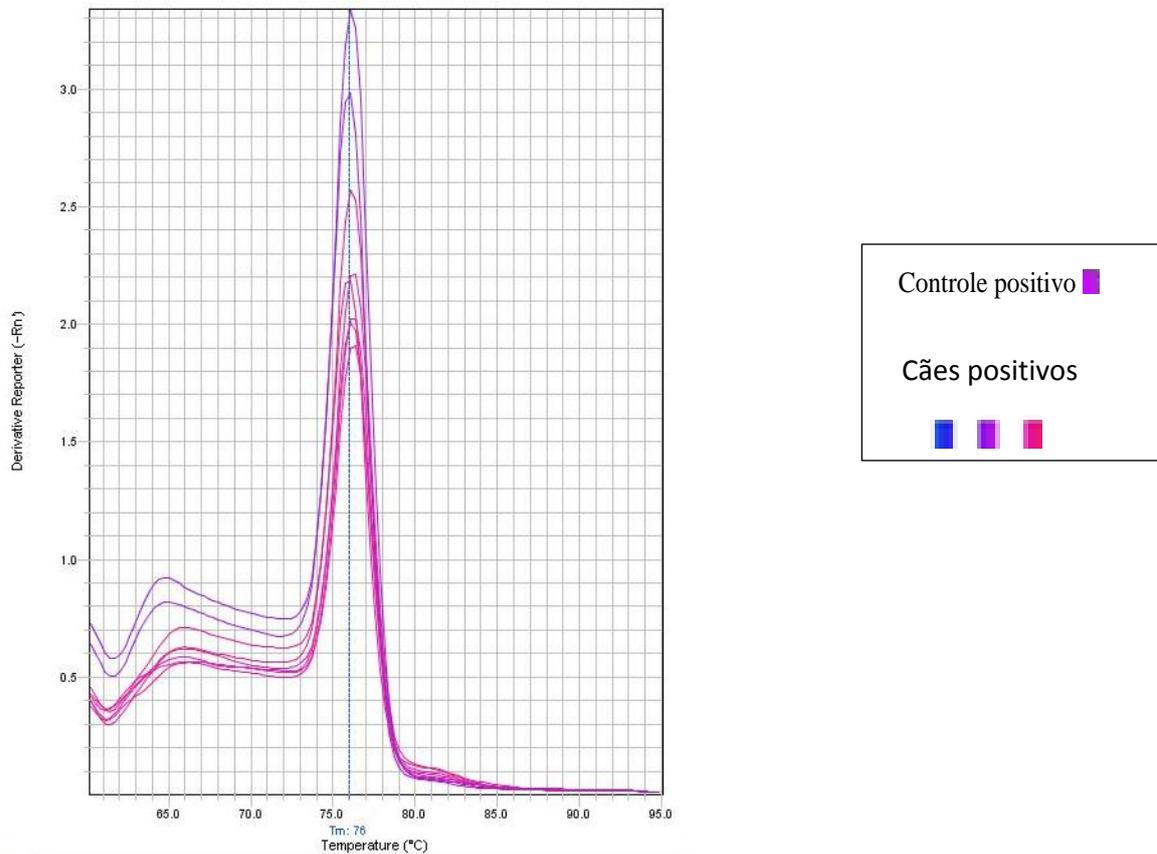


Figura 5. Curva de dissociação do fragmento do gene 16S rRNA do controle positivo e das amostras positivas demonstrando a especificidade de amplificação de *Mycoplasma* spp. na PCR em tempo real.

As amostras positivas na qPCR foram posteriormente submetidas à PCR convencional utilizando primers específicos para determinação das espécies infectantes. A frequência de positividade constatada foi de: 13,06% (29/222) para *Mycoplasma haemocanis* (Figura 6), 0% (0/222) para ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ e 2,25% (5/222) para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (Figura 7). Foram identificadas coinfeções entre ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *Mycoplasma haemocanis* 1,35% (3/222). A diferença de positividade entre as técnicas é devido à maior sensibilidade diagnóstica da qPCR comparada à PCR convencional.

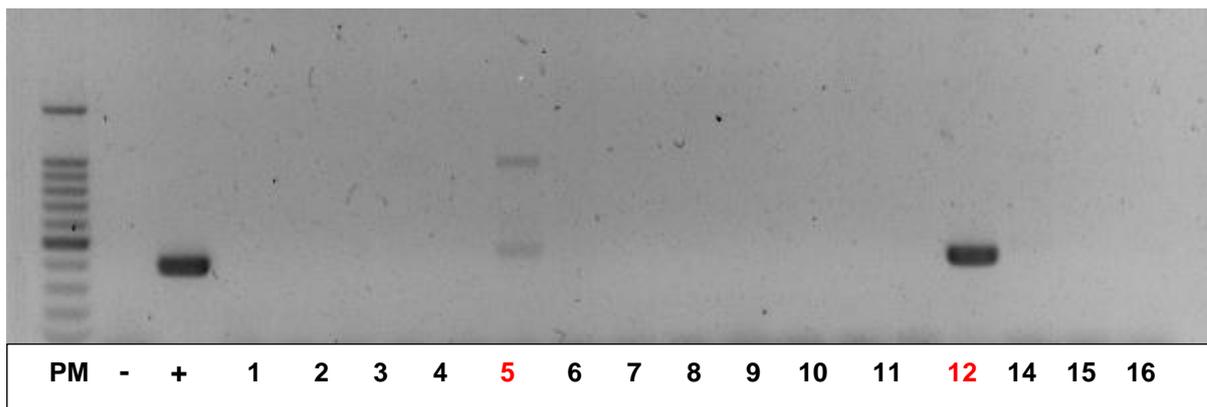


Figura 6. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 393 pares de base do gene 16S rRNA de *Mycoplasma haemocanis*, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1 a 4- 6 a 11- 14 a 16: Cães negativos; Canaleta 5 e 12: Cães positivos.

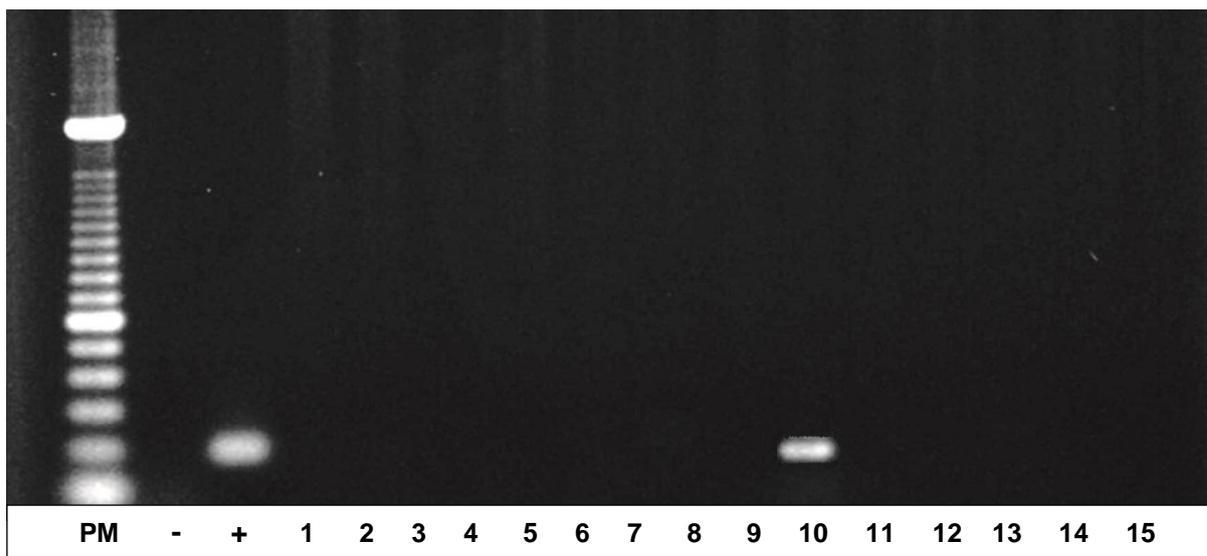


Figura 7. Bandas correspondentes à amplificação de fragmento de 192 pares de base do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’, por meio de PCR convencional, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de base (Invitrogen®); -: Controle negativo (Água ultrapura); +: Controle positivo; Canaletas 1 a 9- 11 a 15: Cães negativos; Canaleta 10: Cão positivo.

4.3 Distribuição de hemoplasmas na Região Metropolitana do Rio de Janeiro

Foram utilizadas 222 amostras de cães provenientes de abrigos localizados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. O número de amostras por município onde os abrigos estavam localizados e os resultados na técnica qPCR estão descritos na Tabela 1.

Adicionalmente, as condições estruturais de cada abrigo e o número de animais coletados, o número de positivos em relação ao total e os animais contactantes estão demonstrados na Tabela 2. Nas tabelas 3 e 4 estão demonstrados a frequência de infecção nos municípios por *Mycoplasma haemocanis* e ‘*Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*’.

Tabela 1. Frequência de cães domésticos positivos pela qPCR para *Mycoplasma* ssp. oriundos de abrigos localizados na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Município	Positivo	Negativo	Total
Belford Roxo	0 (0,0%)	7 (100,0%)	7
Seropédica	20 (21,3%)	74 (78,7%)	94
Mesquita	0 (0,0%)	14 (100,0%)	14
Nova Iguaçu	1 (6,7%)	14 (93,3%)	15
Rio de Janeiro	15 (30,0%)	35 (60,0%)	50
Itaguaí	4 (18,2%)	18 (81,8%)	22
São Gonçalo	2 (18,2%)	9 (81,8%)	11
Guapemirim	3 (33,3%)	6 (66,7%)	9

Tabela 2. Localização dos abrigos, condições estruturais, número de animais coletados, o número de positivos em relação ao total de animais contactantes.

Cidade	Abrigo	Condição estrutural do abrigo	Número positivos/total	Animais contactantes
Belford Roxo	A	Ruim	0/7	Felinos
Itaguaí	B	Razoável	4/22	Felinos, ovinos, aves domésticas, pombos, animais silvestres
Mesquita	C	Ótima	0/2	Felinos
	D	Ruim	0/12	Felinos
São Gonçalo	E	Boa	2/11	Felinos e animais silvestres
Guapemirim	F	Boa	3/9	Felinos e animais silvestres
Rio de Janeiro	G	Péssima	12/36	Felinos, pombos, roedores, baratas
	H	Boa	3/14	Felinos, roedores
Seropédica	I	Péssima	2/12	Felinos, roedores, baratas, animais silvestres
	J	Razoável	0/4	Felinos e animais silvestres
	K	Razoável	1/9	Felinos e animais silvestres
	L	Razoável	18/69	Felinos, roedores, animais silvestres
Nova Iguaçu	M	Ruim	0/15	Felinos

As letras são apenas para demonstrar abrigos diferentes em cada cidade. Animais positivos na técnica qPCR para *Mycoplasma* spp..

Tabela 3. Frequência de cães domésticos positivos pela PCR convencional baseada no gene 16S rRNA para *Mycoplasma haemocanis* oriundos de abrigos localizados na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Município	Positivo	Negativo	Total
Belford Roxo	0 (0,0%)	7 (100,0%)	7
Seropédica	11 (11,7%)	83 (88,3%)	94
Mesquita	0 (0,0%)	14 (100,0%)	14
Nova Iguaçu	0 (0,0%)	15 (100,0%)	15
Rio de Janeiro	12 (24,0%)	38 (76,0%)	50
Itaguaí	2 (9,1%)	20 (90,9%)	22
São Gonçalo	2 (18,2%)	9 (81,8%)	11
Guapimirim	2 (22,2%)	7 (77,8%)	9

Tabela 4. Frequência de cães domésticos positivos pela PCR convencional baseada no gene 16S rRNA para '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'/'*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' oriundos de abrigos localizados na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Município	Positivo	Negativo	Total
Belford Roxo	0 (0,0%)	7 (100,0%)	7
Seropédica	2 (2,1%)	92 (97,9%)	94
Mesquita	0 (0,0%)	14 (100,0%)	14
Nova Iguaçu	0 (0,0%)	15 (100,0%)	15
Rio de Janeiro	3 (6,0%)	38 (94,0%)	50
Itaguaí	0 (0,0%)	22 (100,0%)	22
São Gonçalo	0 (0,0%)	11 (100,0%)	11
Guapimirim	0 (0,0%)	9 (100,0%)	9

4.4 Análise de parâmetros hematológicos correlacionados com a ocorrência de hemoplasmas

4.4.1 *Mycoplasma* spp.

Os valores médios do eritrograma, leucograma e complementos (proteína plasmática total, trombograma e reticulócitos) dos cães domésticos negativos e positivos para *Mycoplasma* spp. estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. O resultado que demonstrou haver diferença significativa foi a proteína plasmática total ($p= 0,0010$), no entanto, permanecendo dentro do valor de referência da espécie. Os demais parâmetros hematológicos não diferiram entre si a 5 % de significância. Vale ressaltar, que os eosinófilos apresentaram valores médios superiores aos determinados como referência para espécie em ambos os grupos. Em contrapartida, hematócrito e hemácias apresentaram valores médios abaixo dos valores de referência para ambos os grupos.

Tabela 5: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) dos cães positivos e negativos na PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Hematócrito (%)	Positivo	45	36,9 ^a	6,9	1,0	22	50	0,3454	37-55*
	Negativo	177	36,1 ^a	8,5	0,6	10	61		
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Positivo	45	5,1 ^a	1,0	0,1	3	7	0,8935	5,5-8,5*
	Negativo	177	5,3 ^a	1,6	0,1	1	12		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	45	11,7 ^a	2,4	0,4	7	16	0,2019	10-18*
	Negativo	177	11,1 ^a	3,2	0,2	3	20		
VGM (fL)	Positivo	45	66,8 ^a	4,3	0,6	52	76	0,3448	60-77*
	Negativo	177	66,5 ^a	4,8	0,4	42	80		
CHGM (%)	Positivo	45	32,3 ^a	1,1	0,2	30	34	0,2437	32-36*
	Negativo	177	31,9 ^a	1,8	0,1	26	37		
Reticulócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	13	54,6 ^a	42,8	11,9	16,5	176	0,6843	< 70*
	Negativo	76	693,2 ^a	63,9	73,3	5,1	413		
Plaquetas (x10 ³ /μL)	Positivo	45	237,2 ^a	87,3	13	60	465	0,7890	200-500*
	Negativo	177	232,6 ^a	1095,2	82,3	0,3	624		
PPT (g/dl)	Positivo	45	7,8 ^a	1,2	0,2	6	10	0,0010	6-8**
	Negativo	177	7,1 ^b	1,3	0,1	4	10		

^a Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. * Valores de referência segundo Jain (1993);** Valor de referência segundo Thall (2007).

Tabela 6: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Leucócitos totais (x10 ³ /μL)	Positivo	45	12,97 ^a	4,08	0,61	4,5	24,7	0,2273	6-17
	Negativo	177	12,40 ^a	5,336	0,40	0,32	33,7		
Metamielócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	45	0,0060 ^a	0,039	0,006	0	0,26	0,9554	0
	Negativo	177	0,0100 ^a	0,105	0,008	0	1,37		
Bastões (x10 ³ /μL)	Positivo	45	0,36 ^a	0,70	0,10	0	4,02	0,3692	0-0,3
	Negativo	177	0,34 ^a	0,73	0,55	0	8,76		
Segmentados (x10 ³ /μL)	Positivo	45	7,44 ^a	2,84	0,42	2,25	18,28	0,2512	3-11,5
	Negativo	177	7,90 ^a	11,57	0,87	1,77	153,3		
Linfócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	45	2,77 ^a	1,35	0,20	0,50	6,8	0,6937	1-4,8
	Negativo	177	2,88 ^a	1,930	0,14	0,84	11,32		
Monócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	45	0,90 ^a	0,49	0,073	0,13	2,35	0,2479	0,15-1,35
	Negativo	177	0,87 ^a	0,67	0,050	0	4,3		
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	45	1,51 ^a	1,64	0,24	0,006	10,34	0,1708	0,1-1,25
	Negativo	177	1,30 ^a	1,35	0,10	0	7,07		
Basófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	45	0,006 ^a	0,027	0,0040	0	0,135	0,8730	Raros
	Negativo	177	0,008 ^a	0,057	0,0043	0	0,552		

^aMédias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo Jain (1993).

Na avaliação por frequência das alterações hematológicas observadas nos animais positivos e negativos, pode ser observado que a hiperproteinemia foi associada à infecção por *Mycoplasma* spp. (p<0,02) (Tabela 7). E apesar de haver diferença estatística quanto ao parâmetro hipoproteinemia (p=0,0453), este foi observado apenas nos animais negativos. Não foi observada uma associação entre a infecção por hemoplasmas e a ocorrência de anemia, considerando esta determinada pela redução na contagem global de hemácias e/ou hemoglobinas e/ou hematócrito. De modo semelhante, as demais alterações hematológicas não foram associadas estatisticamente à infecção por *Mycoplasma* spp., incluindo as alterações leucocitárias (Tabela 7 e 8).

Tabela 7: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		<i>Mycoplasma</i> spp. n(%)		p-valor
		Positivos	Negativos	
Anemia (He, Ht, Hg)	Sim	21 (46,7) ^a	98 (55,4) ^a	0,3801
	Não	24 (53,3)	79 (44,6)	
VGM reduzido	Sim	3 (6,7) ^a	11 (6,2) ^a	0,9900
	Não	42 (93,3)	166 (93,8)	
VGM aumentado	Sim	0 (0) ^a	5 (2,8) ^a	0,5858
	Não	45 (100)	172 (97,2)	
CHGM reduzido	Sim	10 (22,2) ^a	66 (37,3) ^a	0,8440
	Não	35 (77,8)	111 (62,7)	
CHGM aumentado	Sim	0 (0) ^a	1 (0,6) ^a	1,000
	Não	45 (100)	176 (99,4)	
Reticulocitopenia ou valor normal	Sim	10 (76,9) ^a	45 (59,2) ^a	0,3552
	Não	3 (23,1)	31 (40,8)	
Reticulocitose	Sim	3 (23,1) ^a	31 (40,8) ^a	0,3552
	Não	10 (76,9)	45 (59,2)	
Hipoproteinemia	Sim	0 (0) ^a	15 (10,6) ^b	0,0453
	Não	45 (100)	162 (89,5)	
Hiperproteinemia	Sim	20 (44,4) ^a	44 (24,9) ^b	0,0161
	Não	25 (55,6)	133 (75,1)	
Trombocitopenia	Sim	14 (31,1) ^a	64 (36,2) ^a	0,6467
	Não	31 (68,9)	113 (63,8)	
Trombocitose	Sim	0 (0) ^a	2 (1,1) ^a	1,000
	Não	45 (100)	175 (98,9)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n:Número de cães; VGM: Volume globular médio; CHGM:Concentração de hemoglobina globular média.

Tabela 8: Alterações no leucograma associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		Mycoplasma spp. n (%)		p-valor
		Positivos (n= 45)	Negativos (n= 177)	
Leucopenia	Sim	2 (4,4) ^a	19 (10,7) ^a	1,000
	Não	43 (95,6)	158 (89,3)	
Leucocitose	Sim	3 (6,7) ^a	13 (7,3) ^a	1,000
	Não	42 (93,3)	164 (92,7)	
Moderado DNNE	Sim	1 (2,2) ^a	3 (1,7) ^a	0,9730
	Não	44 (97,8)	174 (98,3)	
Discreto DNNE	Sim	15 (33,3) ^a	62 (35,0) ^a	0,2675
	Não	30 (66,7)	115 (65,0)	
Neutropenia	Sim	1 (2,2) ^a	11 (6,2) ^a	0,4672
	Não	44 (97,8)	166 (93,8)	
Neutrofilia	Sim	3 (6,7) ^a	17 (9,6) ^a	0,7715
	Não	42 (93,3)	160 (90,4)	
Monocitose	Sim	4 (8,9) ^a	30 (16,9) ^a	0,2675
	Não	41 (91,1)	147 (83,1)	
Eosinofilia	Sim	20 (44,4) ^a	63 (35,6) ^a	0,3559
	Não	25 (55,6)	123 (64,4)	
Linfopenia	Sim	1 (2,2) ^a	22 (12,4) ^a	0,0533
	Não	22 (97,8)	155 (87,6)	
Linfocitose	Sim	3 (6,7) ^a	23 (13,0) ^a	0,3580
	Não	42 (93,3)	154 (87,0)	
Basofilia	Sim	2 (4,4) ^a	5 (2,8) ^a	0,6276
	Não	43 (95,6)	177 (97,2)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n:Número de cães; DNNE: Desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

Na avaliação por frequência das alterações hematológicas observadas nos animais desidratados positivos e negativos. E apesar de haver diferença estatística quanto ao parâmetro CHGM ($p= 0,0417$), este foi observado apenas nos animais negativos. Não foi observada uma associação entre a infecção por hemoplasmas e a ocorrência de anemia, considerando esta determinada pela redução na contagem global de hemácias e/ou hemoglobinas e/ou hematócrito. De modo semelhante, as demais alterações hematológicas não foram associadas estatisticamente à infecção por *Mycoplasma* spp., incluindo as alterações leucocitárias (Tabela 9 e 10).

Tabela 9: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães desidratados oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		<i>Mycoplasma</i> spp. n(%)		p-valor
		Positivos	Negativos	
Anemia (He, Ht, Hg)	Sim	4 (28,6) ^a	44 (57,1) ^a	0,0788
	Não	10 (71,4)	33 (42,9)	
VGM reduzido	Sim	1 (7,1) ^a	6 (7,8) ^a	1,000
	Não	13 (92,9)	71 (92,2)	
VGM aumentado	Sim	0 (0) ^a	3 (3,9) ^a	1,000
	Não	14 (100)	74 (96,1)	
CHGM reduzido	Sim	4 (28,6) ^a	46 (59,7) ^b	0,0417
	Não	10 (71,4)	31 (40,3)	
CHGM aumentado	Sim	10 (22,2) ^a	66 (37,3) ^a	1,000
	Não	35 (77,8)	111(62,7)	
Reticulócitos - arregenerativa*	Sim	1 (20,0) ^a	11 (25,0) ^a	1,000
	Não	4 (80,0)	33 (75,0)	
Reticulócitos- regenerativa*	Sim	2 (40,0) ^a	16 (36,4) ^a	0,9955
	Não	3 (60,0)	28 (63,6)	
Hipoproteinemia	Sim	0 (0) ^a	8 (10,4) ^a	0,3500
	Não	14 (100)	69 (89,6)	
Hiperproteinemia	Sim	5 (35,7) ^a	16 (20,8) ^a	0,2992
	Não	9 (55,6)	61 (79,2)	
Trombocitopenia	Sim	5 (35,7) ^a	30 (39,0) ^a	1,000
	Não	9 (64,3)	47 (61,0)	
Trombocitose	Sim	0 (0) ^a	1 (1,3) ^a	1,000
	Não	14 (100)	76 (98,7)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n:Número de cães; VGM: Volume globular médio; CHGM:Concentração de hemoglobina globular média.

Tabela 10: Alterações no leucograma associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães desidratados oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		<i>Mycoplasma</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos (n= 45)	Negativos (n= 177)	
Leucopenia	Sim	0 (0) ^a	4 (5,2) ^a	1,000
	Não	14 (100)	77 (94,8)	
Leucocitose	Sim	3 (21,4) ^a	11 (14,3) ^a	0,6861
	Não	11 (78,6)	66 (85,7)	
Moderado DNNE	Sim	0 (0) ^a	1 (1,3) ^a	1,000
	Não	14 (100)	76 (98,7)	
Discreto DNNE	Sim	5 (35,7) ^a	38 (49,4) ^a	0,3959
	Não	9 (64,3)	39 (62,0)	
Neutropenia	Sim	0 (0) ^a	5 (6,5) ^a	0,5926
	Não	14 (100)	72 (93,5)	
Neutrofilia	Sim	1 (7,1) ^a	3 (3,9) ^a	0,4828
	Não	13 (92,9)	74 (96,1)	
Monocitose	Sim	1 (7,1) ^a	20 (26,0) ^a	0,1753
	Não	13 (92,9)	57 (74,0)	
Eosinofilia	Sim	8 (57,1) ^a	32 (41,6) ^a	0,3517
	Não	6 (42,9)	45 (58,4)	
Linfopenia	Sim	1 (7,1) ^a	11 (14,3) ^a	0,6839
	Não	13 (92,9)	66 (85,7)	
Linfocitose	Sim	2 (14,3) ^a	15 (19,5) ^a	0,7339
	Não	12 (85,7)	62 (80,5)	
Basofilia	Sim	0 (0) ^a	0 (0) ^a	1,000
	Não	14 (100)	77 (100)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n:Número de cães;DNNE: Desvio nuclear neutrofilico à esquerda.

4.4.2 *Mycoplasma haemocanis*

Os valores médios do eritrograma, leucograma e complementos (proteína plasmática total, trombograma e reticulócitos) dos cães domésticos positivos e negativos para *Mycoplasma haemocanis* estão demonstrados nas Tabelas 11 e 12. Os resultados demonstram haver diferença significativa na proteína plasmática total ($p= 0,0012$), de modo que cães positivos apresentaram valor médio acima do valor de referência da espécie. Os demais parâmetros hematológicos não diferiram entre si a 5% de significância. Vale ressaltar, que os eosinófilos apresentaram valores médios superiores ao determinado como referência para espécie em ambos os grupos.

Tabela 11: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) dos cães positivos e negativos na PCR convencional para *Mycoplasma haemocanis*, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Hematócrito (%)	Positivo	29	37,65 ^a	7	1,3	22,3	50,1	0,5209	37-55*
	Negativo	193	36,59 ^a	8,3	0,6	10,6	61,1		
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Positivo	29	5,6 ^a	1	0,2	3,1	7,2	0,7307	5,5-8,5*
	Negativo	193	5,7 ^a	1,6	0,1	1,8	12		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	29	12,2 ^a	2,4	0,4	7,2	15,6	0,2019	10-18*
	Negativo	193	11,6 ^a	3,2	0,2	3	20,6		
VGM (fL)	Positivo	29	67 ^a	3,7	0,7	55	73	0,3653	60-77*
	Negativo	193	66,5 ^a	4,8	0,3	42	80		
CHGM (%)	Positivo	29	32,4 ^a	1,2	0,2	30	34	0,1691	32-36*
	Negativo	193	31,9 ^a	1,8	0,1	26	37		
Reticulócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	9	60,7 ^a	500,8	16,7	16,5	176	0,9295	< 70*
	Negativo	80	67,9 ^a	626,2	7,0	5,1	413		
Plaquetas (x10 ³ /μL)	Positivo	29	256,8 ^a	82,3	15,3	60	465	0,2002	200-500*
	Negativo	193	230 ^a	108,0	7,8	0,3	624		
PPT (g/dl)	Positivo	29	8,3 ^a	1,1	0,2	6,2	10,4	0,0012	6-8**
	Negativo	193	7,5 ^b	1,3	0,1	4,2	10,8		

^aMédias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. * Valores de referência segundo Jain (1993);** Valor de referência segundo Thall (2007).

Tabela 12: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na PCR convencional para *Mycoplasma haemocanis*, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Leucócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	29	13,14 ^a	4,46	0,83	6,30	24,70	0,3990	6-17
	Negativo	193	12,42 ^a	5,20	0,37	0,32	33,70		
Metamielócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	29	0,009 ^a	0,05	0,009	0	0,26	0,8682	0
	Negativo	193	0,009 ^a	0,10	0,007	0	1,37		
Bastões (x10 ³ /μL)	Positivo	29	0,36 ^a	0,74	0,14	0	4,02	0,8719	0-0,3
	Negativo	193	0,34 ^a	0,73	0,05	0	8,76		
Segmentados (x10 ³ /μL)	Positivo	29	7,64 ^a	3,15	0,58	3,69	18,28	0,3143	3-11,5
	Negativo	193	7,83 ^a	11,10	0,10	1,77	153,30		
Linfócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	29	2,65 ^a	1,30	0,24	0,50	5,47	0,9037	1-4,8
	Negativo	193	2,89 ^a	1,89	0,14	0,084	11,32		
Monócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	29	0,87 ^a	0,435	0,08	0,13	2,11	0,3956	0,15-1,35
	Negativo	193	0,87 ^a	0,660	0,05	0	4,30		
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	29	1,61 ^a	1,91	0,35	0,063	10,34	0,1993	0,1-1,25
	Negativo	193	1,30 ^a	1,32	0,09	0	7,07		
Basófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	29	0,004 ^a	0,02	0,004	0	0,126	0,8730	Raros
	Negativo	193	0,008 ^a	0,05	0,004	0	0,552		

^aMédias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo Jain (1993).

Na avaliação por frequência da alteração hematológica dos animais positivos e negativos, não foi observado correlação entre a infecção por *M. haemocanis* e a ocorrência de anemia (determinada pela redução de hemácias e/ou hemoglobina e/ou hematócrito) (Tabela 13). A hiperproteinemia foi a única alteração associada à infecção (p= 0,0238). Não foram observadas associações estatísticas com as demais alterações analisadas no hemograma (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por *Mycoplasma haemocanis* em cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		<i>Mycoplasma haemocanis</i> n (%)		p-valor
		Positivos (n= 29)	Negativos (n= 193)	
Anemia (He, Ht, Hg)	Sim	12 (41,4) ^a	107 (55,4) ^a	0,2240
	Não	17 (58,6)	89 (44,6)	
VGM reduzido	Sim	1 (3,4) ^a	13 (6,7) ^a	0,7000
	Não	28 (96,6)	180 (93,3)	
VGM aumentado	Sim	0 (0) ^a	5 (2,6) ^a	0,6216
	Não	29 (100)	188 (97,4)	
CHGM reduzido	Sim	6 (20,7) ^a	0 (0) ^b	0
	Não	23 (79,3)	193 (100)	
CHGM aumentado	Sim	0 (0) ^a	1 (0,5) ^a	1,000
	Não	29 (100)	192 (99,5)	
Reticulocitopenia ou valor normal*	Sim	7 (53,8) ^a	48 (63,2) ^a	0,5493
	Não	6 (46,2)	28 (36,8)	
Reticulocitose*	Sim	2 (15,4) ^a	32 (42,1) ^a	0,0749
	Não	11 (84,6)	44 (57,9)	
Hipoproteinemia	Sim	0 (0) ^a	15 (7,8) ^a	0,1452
	Não	29 (100)	178 (92,2)	
Hiperproteinemia	Sim	14 (48,3) ^a	50 (25,9) ^b	0,0238
	Não	15 (51,7)	143 (74,1)	
Trombocitopenia	Sim	6(20,7) ^a	72 (37,3) ^a	0,1238
	Não	23 (79,3)	121 (62,7)	
Trombocitose	Sim	0 (0) ^a	2 (1,0) ^a	1,000
	Não	29 (100)	191 (99,0)	

^aValores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; n:Número de cães; VGM: Volume globular médio; CHGM:Concentração de hemoglobina globular média.* número de animais avaliados para esse parâmetro foi de 89.

Tabela 14: Alterações no leucograma associadas à infecção por *Mycoplasma haemocanis* em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		<i>Mycoplasma haemocanis</i> n (%)		p-valor
		Positivos (n= 29)	Negativos (n= 193)	
Leucopenia	Sim	1 (3,4) ^a	20 (10,4) ^a	0,3243
	Não	28 (96,6)	193 (89,6)	
Leucitose	Sim	3 (10,3) ^a	13 (6,7) ^a	0,4447
	Não	29 (89,7)	180 (93,3)	
Moderado DNNE	Sim	0 (0) ^a	3 (1,6) ^a	1,000
	Não	29 (100)	190 (98,4)	
Discreto DNNE	Sim	10 (34,5) ^a	67 (34,7) ^a	1,000
	Não	19 (65,5)	126 (65,3)	
Neutropenia	Sim	0 (0) ^a	12 (6,2) ^a	0,2333
	Não	29 (100)	181 (93,8)	
Neutrofilia	Sim	3 (10,3) ^a	17 (8,8) ^a	0,7240
	Não	26 (89,7)	176 (91,2)	
Monocitose	Sim	2 (6,9) ^a	32 (16,6)	0,2681
	Não	27 (93,1)	161 (83,4)	
Eosinofilia	Sim	13 (44,8) ^a	70 (36,3) ^a	0,4133
	Não	16 (55,2)	123 (63,7)	
Linfopenia	Sim	1 (3,4) ^a	22 (11,4) ^a	0,3250
	Não	24 (96,6)	171 (88,6)	
Linfocitose	Sim	2 (6,9) ^a	24 (12,4) ^a	0,5427
	Não	27 (93,1)	169 (87,6)	
Basofilia	Sim	1 (3,4) ^a	6 (3,1) ^a	0,9510
	Não	24 (96,6)	187 (96,9)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; n: Número de cães; DNNE: Desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

4.4.3 ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’

Os valores médios do eritograma, leucograma e complementos (proteína plasmática total, trombograma e reticulócitos) dos cães domésticos positivos e negativos para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’ estão demonstrados nas Tabelas 15 e 16. Os parâmetros hematológicos não diferiram entre si a 5% de significância. Vale ressaltar, que os eosinófilos apresentaram valores médios superiores ao determinado como referência para espécie em ambos os grupos.

Tabela 15: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) dos cães positivos e negativos na PCR convencional para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Hematócrito (%)	Positivo	5	39,1 ^a	8,2	8,2	27,5	49,5	0,5224	37-55*
	Negativo	217	36,7 ^a	8,2	8,2	10,6	61,1		
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	Positivo	5	5,7 ^a	1,1	0,5	4,0	6,8	0,7647	5,5-8,5*
	Negativo	217	5,7 ^a	1,5	0,1	1,8	12		
Hemoglobina (g/dl)	Positivo	5	13,0 ^a	2,8	0,5	8,8	16,0	0,6463	10-18*
	Negativo	217	11,6 ^a	3,1	0,1	3	20,6		
VGM (fL)	Positivo	5	68,2 ^a	4,8	2,1	63	76	0,5974	60-77*
	Negativo	217	66,5 ^a	4,7	0,3	42	80		
CHGM (%)	Positivo	5	33,0 ^a	1,0	0,4	32	34	0,1621	32-36*
	Negativo	217	32,0 ^a	1,7	0,1	26	37		
Reticulócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	< 70*
Plaquetas (x10 ³ /μL)	Positivo	5	256,8 ^a	82,3	15,3	60	465	0,5482	200-500*
	Negativo	217	230,0 ^a	108,0	7,8	0,3	624		
PPT (g/dl)	Positivo	5	8,3 ^a	0,6	0,3	7,4	8,9	0,3544	6-8**
	Negativo	217	7,5 ^b	1,3	0,1	4,2	10,8		

^a Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média; PPT: Proteína plasmática total; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. * Valores de referência segundo Jain (1993);** Valor de referência segundo Thall (2007).

Tabela 16: Análise descritiva dos parâmetros relacionados ao leucograma dos cães positivos e negativos na PCR convencional para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Leucócitos totais(x10 ³ /μL)	Positivo	5	13,32a	2,42	1,08	8,20	14,50	0,6573	6-17
	Negativo	217	12,54 ^a	5,20	0,35	0,32	33,70		
Metamielócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	0
	Negativo	-	-	-	-	-	-		
Bastões (x10 ³ /μL)	Positivo	5	0,56a	0,74	0,45	0	2,32	0,7221	0-0,3
	Negativo	217	0,34 ^a	0,73	0,05	0	8,77		
Segmentados (x10 ³ /μL)	Positivo	5	6,69a	1,99	0,89	3,69	9,28	0,9831	3-11,5
	Negativo	217	7,83 ^a	10,52	0,71	1,77	153,30		
Linfócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	5	1,88a	0,85	0,38	1,05	3,12	0,2178	1-4,8
	Negativo	217	2,88 ^a	1,84	0,12	1,76	11,32		
Monócitos (x10 ³ /μL)	Positivo	5	0,88a	0,33	0,15	0,33	1,16	0,5193	0,15-1,35
	Negativo	217	0,87 ^a	0,64	0,04	0	4,30		
Eosinófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	5	1,48a	0,99	0,44	0,14	2,57	0,4511	0,1-1,25
	Negativo	217	1,34 ^a	1,42	0,09	0	10,34		
Basófilos (x10 ³ /μL)	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	Raros
	Negativo	-	-	-	-	-	-		

^aMédias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% (p>0,05). N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo Jain (1993). Os parâmetros que não foram demonstradas as correlações dos dados em animais positivos e negativos, foi devido a falta de um N que possibilitasse o cálculo.

Na avaliação por frequência da alteração hematológica dos animais positivos e negativos, não foi observado correlação entre a infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’ e a ocorrência de anemia (determinada pela redução de hemácias e/ou hemoglobina e/ou hematócrito) (Tabela 17). Não foram observadas associações estatísticas com as demais alterações analisadas no hemograma (Tabelas 17 e 18).

Tabela 17: Alterações no eritrograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócito) associadas à infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’ em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum</i> ’ n (%)		p-valor
		Positivos (n= 5)	Negativos (n= 217)	
Anemia (He, Ht, Hg)	Sim	2 (40,0) ^a	117 (53,9) ^a	0,6650
	Não	3 (60,0)	100 (46,1)	
VGM reduzido	Sim	0 (0,0) ^a	14 (6,5) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	203 (93,5)	
VGM aumentado	Sim	0 (0,0) ^a	5 (2,3) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	212 (97,7)	
CHGM reduzido	Sim	0 (0,0) ^a	76 (35,0) ^a	0,1680
	Não	5 (100,0)	141 (65,0)	
CHGM aumentado	Sim	0 (0,0) ^a	1 (0,5) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	216 (99,5)	
Reticulocitopenia ou valor normal*	Sim	1 (100,0) ^a	55 (62,5) ^a	1,000
	Não	0 (0,0)	33 (37,5)	
Reticulocitose*	Sim	0 (0,0) ^a	34 (38,6) ^a	1,000
	Não	1 (100,0)	54 (61,4)	
Hipoproteinemia	Sim	0 (0,0) ^a	15 (6,9) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	202 (93,1)	
Hiperproteinemia	Sim	1 (20,0) ^a	63 (29,0) ^a	1,000
	Não	4 (80,0)	154 (70,1)	
Trombocitopenia	Sim	3 (60,0) ^a	75 (34,6) ^a	0,3472
	Não	2 (40,0)	142 (65,4)	
Trombocitose	Sim	0 (0) ^a	3 (1,4) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	214 (98,6)	

^aValores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; n: Número de cães; VGM: Volume globular médio; CHGM: Concentração de hemoglobina globular média.* número de animais avaliados para esse parâmetro foi de 89.

Tabela 18: Alterações no leucograma associadas à infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’ em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração hematológica		‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum</i> ’ n (%)		p-valor
		Positivos (n= 5)	Negativos (n= 217)	
Leucopenia	Sim	1 (20,0) ^a	12 (5,5) ^a	0,2611
	Não	4 (80,0)	205 (94,5)	
Leucocitose	Sim	0 (0,0) ^a	35 (16,1) ^a	0,5979
	Não	5 (100,0)	182 (83,9)	
Moderado DNNE	Sim	0 (0,0) ^a	4 (1,8) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	213 (98,2)	
Discreto DNNE	Sim	2 (40,0) ^a	75 (34,6) ^a	0,9954
	Não	3 (60,0)	142 (65,4)	
Neutropenia	Sim	0 (0,0) ^a	12 (5,5) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	205 (94,5)	
Neutrofilia	Sim	0 (0,0) ^a	20 (9,2) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	197 (90,8)	
Monocitose	Sim	0 (0,0) ^a	34 (15,7) ^a	0,6009
	Não	5 (100,0)	183 (84,3)	
Eosinofilia	Sim	3 (60,0) ^a	80 (36,9) ^a	0,3651
	Não	2 (40,0)	137 (63,1)	
Linfopenia	Sim	0 (0,0) ^a	23 (10,6) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	194 (89,4)	
Linfocitose	Sim	0 (0,0) ^a	26 (12,0) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	191 (88,0)	
Basofilia	Sim	0 (0,0) ^a	7 (3,2) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	210 (96,8)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; n: Número de cães; DNNE: Desvio nuclear neutrofílico à esquerda.

4.5 Análise de parâmetros bioquímicos correlacionados com a ocorrência de hemoplasmas

4.5.1 *Mycoplasma* spp.

Na avaliação dos valores médios dos parâmetros de bioquímica sanguínea, evidenciou-se diferença significativa na proteína (p= 0,0291), globulina (p= 0,0253), creatinina (p= 0,0279) e fosfatase alcalina (p= 0,0242) (Tabela 19). No entanto, creatinina e fosfatase alcalina permaneceram dentro do intervalo de referência estabelecido para espécie. O parâmetro globulina permaneceu abaixo do intervalo de referência estabelecido para a espécie, tanto nos animais negativos quanto nos positivos. O parâmetro proteína total apresentou valor médio inferior ao intervalo de referência estabelecido para espécie quando analisado o grupo de animais negativos, enquanto o grupo de animais positivos para *Mycoplasma* spp. obteve valores médios dentro do intervalo de referência. Os demais parâmetros bioquímicos não diferiram entre si a 5% de significância. Adicionalmente, foi

observada uma tendência de associação à infecção considerando-se os valores médios reportados de uréia ($p=0,0653$), que apresentaram-se acima do intervalo de referência estabelecido para espécie.

Tabela 19: Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na PCR em Tempo Real para *Mycoplasma* spp., oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Proteína (mg/dl)	Positivo	22	5,1 ^a	1,05	0,22	3,9	8,1	0,0291	5,1-7,8
	Negativo	92	4,7 ^b	0,82	0,08	3	7,8		
Albumina (g/dl)	Positivo	43	2,5 ^a	0,47	0,07	1,2	3,1	0,1595	2,6-4,3
	Negativo	171	2,6 ^a	0,53	0,04	0,9	4,03		
Globulinas (mg/dl)	Positivo	22	1,0 ^a	1,04	0,22	1,3	5,39	0,0253	2,3-4,5
	Negativo	92	2,1 ^b	1,08	0,11	0,17	5,78		
Uréia (mg/dl)	Positivo	43	37,0 ^a	12,33	1,88	10	89	0,0653	7,0-27,0
	Negativo	171	34,4 ^a	16,01	1,22	7	104		
Creatinina (mg/dl)	Positivo	43	1,0 ^a	0,27	0,04	0,4	2,1	0,0279	0,4-1,8
	Negativo	172	0,9 ^b	0,45	0,035	0,3	3,83		
AST (U/L)	Positivo	28	31,7 ^a	9,58	1,81	10	61	0,0731	5-55,0
	Negativo	118	37,5 ^a	14,95	1,38	15	108		
ALT (U/L)	Positivo	43	44,3 ^a	30,96	4,72	15	169	0,3835	5-60
	Negativo	172	44,9 ^a	58,31	4,59	10	710		
Falc (U/L)	Positivo	43	47,3 ^a	23,99	3,66	11	107	0,0242	10-150
	Negativo	171	73,4 ^b	59,99	4,59	1	303		

^a Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% ($p>0,05$). AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo JR. Smith & Tiley (2008).

Com relação a avaliação por frequência das alterações bioquímicas nos animais positivos e negativos (Tabela 20), observou-se diferença estatística quanto à hiperfosfatemia ($p=0,0270$), apesar de apenas animais negativos apresentarem essa alteração. Adicionalmente, a azotemia (uréia elevada) foi estatisticamente ($p= 0,0023$) associada à infecção.

Tabela 20: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração bioquímica		<i>Mycoplasma</i> spp. n (%)		p-valor
		Positivos	Negativos	
Hiperproteinemia	Sim	1 (4,5) ^a	1 (1,1) ^a	0,3501
	Não	21 (95,5)	91 (98,9)	
Hipoproteinemia	Sim	14 (63,6) ^a	72 (78,3) ^a	0,1730
	Não	8 (36,4)	20 (21,7)	
Hiperalbuminemia	Sim	0 (0) ^a	(0) ^a	1,000
	Não	43(100)	172(100)	
Hipoalbuminemia	Sim	22 (51,2) ^a	81 (47,4) ^a	0,7838
	Não	21 (48,8)	90 (52,6)	
Hiperglobulinemia	Sim	2 (9,1) ^a	4 (4,3) ^a	0,5934
	Não	20 (90,9)	88 (95,7)	
Hipoglobulinemia	Sim	9 (40,9) ^a	60 (65,2) ^a	0,0639
	Não	13 (59,1)	32 (34,8)	
Ureia elevada	Sim	39 (90,7) ^a	112 (65,5) ^b	0,0023
	Não	4 (9,3)	59 (34,5)	
Creatinina elevada	Sim	1 (2,3) ^a	5 (2,9) ^a	1,000
	Não	42 (97,7)	167 (97,1)	
Creatinina diminuída	Sim	0 (0) ^a	5 (2,9) ^a	0,5956
	Não	43 (100)	167 (97,1)	
AST aumentada	Sim	1 (2,3) ^a	11 (9,3) ^a	0,4627
	Não	27 (97,7)	107 (90,7)	
ALT elevada	Sim	5 (11,6) ^a	25 (14,5) ^a	0,8057
	Não	38 (88,4)	147 (85,5)	
Falc elevada	Sim	0 (0) ^a	17 (9,9) ^b	0,0270
	Não	43 (0)	154 (90,1)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n: Número de cães; AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina. O número de cães nos grupos positivos e negativos variou de acordo com a disponibilidade de amostra para avaliar os parâmetros.

Com relação a avaliação por frequência das alterações bioquímicas nos animais desidratados positivos e negativos (Tabela 21), não observou-se diferença estatística associada associação à infecção.

Tabela 21: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por *Mycoplasma* spp. em cães desidratados oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração bioquímica			<i>Mycoplasma</i> spp. n (%)		p-valor
			Positivos	Negativos	
Fosfatase alcalina elevada	Sim		0 (0) ^a	10 (13,3) ^a	0,3450
	Não		12 (100)	65 (86,7)	
ALT elevada	Sim		1 (8,3) ^a	7 (9,3) ^a	1,000
	Não		11(91,7)	68 (90,7)	
Albumina elevada	Sim		0 (0) ^a	15 (20,0) ^a	0,1165
	Não		12 (100)	60 (80)	
Albumina diminuída	Sim		4 (33,3) ^a	26 (34,7) ^a	1,000
	Não		8 (66,7)	49 (65,3)	
Ureia elevada	Sim		10 (83,3) ^a	52 (69,3) ^a	0,4859
	Não		2 (16,7)	23 (30,7)	
Creatinina elevada	Sim		0 (0) ^a	4 (5,3) ^a	1,000
	Não		12 (100)	71 (94,7)	
Creatinina diminuída	Sim		0 (0) ^a	1 (1,3) ^a	1,000
	Não		12 (100)	74 (98,7)	
AST aumentada	Sim		0 (0) ^a	4 (5,6) ^a	1,000
	Não		12 (100)	68 (94,4)	
Hiperproteinemia	Sim		1 (9,1) ^a	0 (0) ^a	0,1429
	Não		10 (90,9)	66 (100)	
Hipoproteinemia	Sim		5 (45,5) ^a	50 (75,8) ^a	0,0668
	Não		6 (54,5)	16 (24,2)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR:Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n:Número de cães; AST: aspartato-transaminase; ALT:alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina. * O número de cães nos grupos positivos e negativos variou de acordo com a disponibilidade de amostra para avaliar os parâmetros.

4.5.2 *Mycoplasma haemocanis*

Os valores médios dos parâmetros de bioquímica sanguínea dos cães positivos para *M. haemocanis* estão apresentando na Tabela 22. Houve diferença significativa no parâmetro fosfatase alcalina ($p= 0,0173$), apesar dos valores médios permanecerem dentro do intervalo de referência estabelecido para espécie. Uréia ($p= 0,0401$) também foi estatisticamente associada à infecção, no entanto, os valores médios apresentaram-se superior ao intervalo de referência estabelecido para espécie em ambos os grupos. Os demais parâmetros bioquímicos não diferiram entre si a 5% de significância.

Tabela 22: Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na PCR convencional para *Mycoplasma haemocanis*, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Proteína (mg/dl)	Positivo	17	4,8 ^a	0,68	0,16	3,9	6,9	0,3141	5,1-7,8
	Negativo	97	4,7 ^a	0,91	0,09	3	8,1		
Albumina (g/dl)	Positivo	27	2,4 ^a	0,52	0,10	1,2	3,1	0,6960	2,6-4,3
	Negativo	187	2,5 ^a	0,51	0,04	0,9	4,03		
Globulinas (mg/dl)	Positivo	17	2,3 ^a	0,83	0,20	1,3	5,39	0,2723	2,3-4,5
	Negativo	97	2,2 ^a	1,12	0,11	0,17	5,78		
Uréia (mg/dl)	Positivo	27	39,0 ^a	12,69	2,44	21	89	0,0401	7,0-27,0
	Negativo	187	34,3 ^b	15,64	1,14	7	104		
Creatinina (mg/dl)	Positivo	27	1,0 ^a	0,28	0,05	0,5	2,1	0,0951	0,4-1,8
	Negativo	188	0,9 ^a	0,44	0,03	0,3	3,8		
AST (U/L)	Positivo	21	31,6 ^a	9,86	2,15	10	61	0,1410	5-55,0
	Negativo	125	37,1 ^a	14,72	1,32	15	108		
ALT (U/L)	Positivo	27	41,6 ^a	31,57	6,08	15	169	0,7571	5-60
	Negativo	188	45,2 ^a	56,43	4,12	10	712		
Falc (U/L)	Positivo	27	44,7 ^a	24,73	4,76	11	107	0,0173	10-150
	Negativo	187	71,5 ^b	58,04	4,24	1	303		

^a Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% ($p > 0,05$). AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo JR. Smith & Tiley (2008). O número de cães nos grupos positivos e negativos variou de acordo com a disponibilidade de amostra para avaliar os parâmetros.

Na avaliação por frequência das alterações bioquímicas evidenciada nos animais positivos e negativos para *M. haemocanis*, a azotemia (uréia elevada) foi a única alteração associada à infecção ($p = 0,0061$) (Tabela 23).

Tabela 23: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por *Mycoplasma haemocanis* em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração bioquímica		<i>Mycoplasma haemocanis</i> n (%)		p-valor
		Positivos	Negativos	
Hiperproteinemia	Sim	0 (0) ^a	2 (2,1) ^a	1,000
	Não	17 (100)	95 (97,9)	
Hipoproteinemia	Sim	13 (76,5) ^a	73 (75,3) ^a	1,000
	Não	4 (23,5)	24 (24,7)	
Hiperalbuminemia	Sim	0 (0) ^a	(0) ^a	1,000
	Não	27(100)	187(100)	
Hipoalbuminemia	Sim	14 (51,9) ^a	89 (47,6) ^a	0,6867
	Não	13 (48,1)	98 (52,4)	
Hiperglobulinemia	Sim	1 (5,9) ^a	5 (5,2) ^a	0,9580
	Não	16 (94,1)	92 (94,8)	
Hipoglobulinemia	Sim	9 (52,9) ^a	60 (61,9) ^a	0,5926
	Não	8 (47,1)	37 (38,1)	
Ureia elevada	Sim	25 (92,6) ^a	126 (67,4) ^b	0,0061
	Não	2 (7,4)	61 (32,6)	
Creatinina elevada	Sim	1 (3,7) ^a	5 (2,7) ^a	0,9725
	Não	26 (96,3)	183 (97,3)	
Creatinina diminuída	Sim	0 (0) ^a	5 (2,7) ^a	1,000
	Não	27 (100)	183 (97,3)	
AST aumentada	Sim	1 (4,8) ^a	11 (8,8) ^a	0,9725
	Não	20 (95,2)	114 (91,2)	
ALT elevada	Sim	3 (11,1) ^a	27 (14,5) ^a	0,7751
	Não	24 (88,9)	161 (85,5)	
Falc elevada	Sim	0 (0) ^a	17 (9,1) ^a	0,1379
	Não	27 (100)	170 (90,9)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n: Número de cães; AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina. O número de cães nos grupos positivos e negativos variou de acordo com a disponibilidade de amostra para avaliar os parâmetros.

4.5.3 ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’

Os valores médios dos parâmetros de bioquímica sanguínea dos cães positivos para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’ estão apresentando na Tabela 24. Houve diferença significativa no parâmetro alanina-aminotransferase (p=0,0301), com valores médios acima do intervalo de referência estabelecido para espécie. Os demais parâmetros bioquímicos não diferiram entre si a 5% de significância.

Tabela 24: Análise descritiva dos parâmetros relacionados a bioquímica sanguínea dos cães positivos e negativos na PCR convencional para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’, oriundos de abrigos pertencentes a Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Parâmetros	Resultado	N	Média	DP	EP	Mín.	Máx.	p-valor	Referência
Proteína	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	5,1-7,8
	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	
Albumina (g/dl)	Positivo	5	2,3 ^a	0,37	0,17	1,7	2,68	0,2168	2,6-4,3
	Negativo	209	2,5 ^a	0,52	0,04	0,9	4,03		
Globulinas	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	2,3-4,5
	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	
Uréia (mg/dl)	Positivo	5	37,4 ^a	11,80	5,28	21	52	0,4538	7,0-27,0
	Negativo	209	34,8 ^a	15,44	1,07	7	104		
Creatinina (mg/dl)	Positivo	5	0,90 ^a	0,19	0,08	0,7	1,1	0,7107	0,4-1,8
	Negativo	210	0,91 ^a	0,42	0,03	0,3	3,8		
AST (U/L)	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	5-55,0
	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	
ALT (U/L)	Positivo	5	82,8 ^a	59,17	26,46	33	169	0,0301	5-60
	Negativo	211	46,6 ^b	66,69	4,59	10	712		
Falc (U/L)	Positivo	5	57,8 ^a	22,31	9,98	23	85	0,7395	10-150
	Negativo	209	68,4 ^b	56,20	3,89	1	303		

^aMédias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferiram entre si pelo teste de Mann-Whitney em nível de significância de 5% ($p>0,05$). AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina; N: número de cães; DP: desvio padrão; EP: erro padrão; Mín.: Limite mínimo; Máx.: Limite máximo. Valores de referência segundo JR. Smith & Tiley (2008). O número de cães nos grupos positivos e negativos variou de acordo com a disponibilidade de amostra para avaliar os parâmetros. Os parâmetros que não foram demonstradas as correlações dos dados em animais positivos e negativos, foi devido a falta de um N que possibilitasse o cálculo.

Na avaliação por frequência das alterações bioquímicas evidenciada nos animais positivos e negativos para ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’, não houve alterações associadas à infecção (Tabela 25).

Tabela 25: Alterações na bioquímica sanguínea associadas à infecção por ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*’ em cães oriundos abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Alteração bioquímica		‘ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum</i> ’ n (%)		p-valor
		Positivos	Negativos	
Hiperproteinemia	Sim	0 (0,0) ^a	2 (1,8) ^a	1,000
	Não	1 (100,0)	111 (98,2)	
Hipoproteinemia	Sim	1 (100,0) ^a	85 (75,2) ^a	1,000
	Não	0 (0,0)	28 (24,8)	
Hiperalbuminemia	Sim	0 (0,0) ^a	(0,0) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	209 (100,0)	
Hipoalbuminemia	Sim	4 (80,0) ^a	99 (47,4) ^a	0,1980
	Não	1 (20,0)	110 (52,6)	
Hiperglobulinemia	Sim	0 (0,0) ^a	6 (5,3) ^a	1,000
	Não	1 (100,0)	107 (94,7)	
Hipoglobulinemia	Sim	1 (100,0) ^a	68 (60,2) ^a	1,000
	Não	0 (0,0)	45 (39,8)	
Ureia elevada	Sim	4 (80,0) ^a	147 (70,3) ^a	1,000
	Não	1 (20,0)	62 (29,7)	
Creatinina elevada	Sim	0 (0,0) ^a	6 (2,9) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	204 (97,1)	
Creatinina diminuída	Sim	0 (0,0) ^a	5 (2,4) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	205 (97,6)	
AST aumentada	Sim	0 (0,0) ^a	12 (8,4) ^a	1,000
	Não	3 (100,0)	131 (91,6)	
ALT elevada	Sim	2 (40,0) ^a	28 (13,3) ^a	0,1439
	Não	3 (60,0)	182 (86,7)	
Fosfatase alcalina elevada	Sim	0 (0,0) ^a	17 (8,1) ^a	1,000
	Não	5 (100,0)	192 (91,9)	

^a Valores seguidos de letras iguais não diferiram entre si pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher em nível de significância de 5%; qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; n: Número de cães; AST: aspartato-transaminase; ALT: alanina-transaminase; Falc: fosfatase alcalina. O número de cães nos grupos positivos e negativos variou de acordo com a disponibilidade de amostra para avaliar os parâmetros.

4.6 Fatores associados à positividade para *Mycoplasma* spp. utilizando a técnica PCR em Tempo Real (qPCR)

Dentre as variáveis analisadas durante a anamnese dos animais foi verificada associação com a infecção pelo agente com as variáveis gênero (p=0,0062) e idade (p=0,0041). Em relação ao gênero, observou-se um maior percentual de cães machos associados à infecção. Quanto a faixa etária, evidenciou-se maior percentual de infecção por *Mycoplasma* spp. nos cães adultos. As demais variáveis (histórico de brigas, acesso a rua,

castração, histórico de pulgas, histórico de carrapatos, presença de pulgas e presença de carrapatos) não apresentaram associação estatística com a infecção pelo agente (Tabela 26).

Tabela 26: Associação entre os dados de histórico de brigas, acesso a rua, castração, gênero, idade, histórico de pulgas, histórico de carrapatos, presença de pulgas e presença de carrapatos com o resultado da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) para o agente *Mycoplasma spp.*

Fatores associados à infecção		<i>Mycoplasma spp.</i> n (%)		p-valor
		Positivos (n= 45)	Negativos (n= 177)	
Idade	Adulto	44 (24,2) ^a	138 (75,8)	0,0041
	Filhote	1 (2,5) ^b	39 (97,5)	
Histórico de brigas	Sim	12 (24,5) ^a	37 (75,5)	0,5280
	Não	33 (19,1) ^a	140 (80,9)	
Acesso a rua	Sim	9 (17,3) ^a	43 (82,7)	0,6817
	Não	36 (27,0) ^a	134 (73,0)	
Castrado	Sim	15 (26,8) ^a	41 (73,2)	0,2260
	Não	30 (18,1) ^a	136 (81,9)	
Gênero	Macho	23 (31,5) ^a	50 (68,5)	0,0062
	Fêmea	22 (14,8) ^b	127 (85,2)	
Histórico de pulgas	Sim	37 (21,8) ^a	133 (78,2)	0,4212
	Não	8 (15,4) ^a	44 (84,6)	
Histórico de carrapatos	Sim	30 (22,1) ^a	106 (77,9)	0,5078
	Não	15 (17,4) ^a	71 (82,6)	
Presença de pulgas	Sim	23 (16,9) ^a	113 (83,1)	0,1633
	Não	22 (25,6) ^a	64 (74,4)	
Presença de carrapatos	Sim	21 (20,2) ^a	83 (79,8)	0,8885
	Não	24 (20,3) ^a	94 (79,7)	

*Filhotes de 0 a 12 meses. Número de animais = n. A Valores seguidos de mesma letra, não diferem significativamente através do teste de Quiquadrado a 5% de significância (p<0,05).

Na tabela 27 estão descritos a frequência dos principais achados de anamnese e exame clínico dos cães positivos para *Mycoplasma spp.* Evidenciou-se que os achados com maior associação à infecção por *Mycoplasma spp.* pela técnica de qPCR foram: linfadenopatia (37,8%), lesões de pele compatíveis com sarna (28,9%), TPC >2 (31,1%), afecções bucais (15,5%) e histórico de erlichiose (13,3 %).

Tabela 27. Frequência dos principais achados de anamnese e exame clínico em cães positivos (n= 45) pela PCR em Tempo Real (qPCR) para *Mycoplasma* spp. oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

Achados na anamnese e exame clínico	%	N
Linfadenopatia	37,8	(17/45)
Cinomose	2,2	(1/45)
Letargia	8,9	(4/45)
Babesiose	4,4	(2/45)
Lesões de pele compatíveis com sarna	28,9	(13/45)
Febre >39,2°C	0,0	(0/45)
TPC >2	31,1	(14/45)
TVT	4,4	(2/45)
Afecções bucais	15,5	(7/45)
Erlichiose	13,3	(6/45)

N= número de cães; TPC (tempo de preenchimento capilar).

5 DISCUSSÃO

No Brasil, os estudos de prevalência de hemoplasmas caninos são escassos, havendo apenas relatos de casos isolados. Com isso há a necessidade de estudos para investigar a ocorrência desses agentes na população canina, que, acredita-se, permanece subdiagnosticado por diversos fatores. Este trabalho caracterizou a ocorrência da infecção por micoplasmas hemotróficos e as alterações hematológicas, bioquímicas e fatores de risco associados a esses agentes, na população canina de cães oriundos de abrigos localizados em municípios da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, constituindo-se em estudo pioneiro na região.

Devido ao contingente elevado de animais abandonados nas ruas, cresce o número de pessoas mobilizadas para auxiliar na implementação de abrigos, auxiliando financeiramente ou até mesmo com trabalho voluntário. Os abrigos são formados de uma maneira menos organizada, sendo responsabilidade de um proprietário que recolhe animais abandonados e não possui auxílio fixo de outras pessoas para mantê-los normalmente nas dependências de suas residências. O abandono, falta de responsabilidade dos proprietários de animais que permitem a procriação indiscriminada, a não efetividade de políticas públicas de controle de natalidade desses animais, possibilitou o aumento de cães abandonados nas ruas. Os abrigos acabam na maioria das vezes tornando-se um local de acúmulo de animais se não forem bem administrados. No presente estudo, as amostras foram obtidas de abrigos com condições estruturais e financeiras bem distintas. Havia alguns locais com disponibilidade frequente de atendimento veterinário, alimentação de qualidade, separação adequada dos animais, voluntários e controle de capacidade máxima de animais. No entanto, alguns abrigos apresentavam superlotação, ausência de auxílio veterinário e até mesmo alimentação escassa devido à dificuldades financeiras. Por mais que a intenção seja melhorar a qualidade de vida desses animais abandonados, não é a solução deixa-los aglomerados em locais sem condições para mantê-los. A função do abrigo seria um lar temporário até que os mesmos fossem adotados. Entretanto não é o que ocorre na maioria dos abrigos, ou a quantidade de animais resgatados é superior a adoção. Consequentemente, há grande possibilidade de proliferação de

doenças pela alta concentração de animais e dentre estas, inclui-se os hemoplasmas hemotrópicos.

A técnica diagnóstica do esfregaço sanguíneo fresco (sem EDTA) foi realizada no nosso estudo, entretanto não obtivemos uma boa sensibilidade e especificidade, devido à precipitação do corante Giemsa nas lâminas. Foram efetuados diversos protocolos de coloração, mas ainda assim a qualidade dos esfregaços ficaram prejudicadas. Com isso, foram analisadas apenas as lâminas positivas na técnica molecular para minimizar a ocorrência de falso-positivos, ainda não sendo possível ter certeza na maioria das lâminas de cães sabidamente positivos se as formas aderidas à superfície das hemácias eram efetivamente *Mycoplasma spp.* ou artefatos de corantes. É digno de nota, que o EDTA dificulta o diagnóstico devido à remoção dos hemoplasmas da superfície da hemácias na sua presença (SYKES, 2010; TASKER, 2010) e que todos os esfregaços foram realizados sem a utilização deste anticoagulante. Estudos relataram que durante a bacteremia, os organismos podem ser observados no diagnóstico direto porém com reduzida especificidade e sensibilidade diagnóstica (CHALKER, 2005; BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK et al., 2004; KEMMING et al., 2004^b). Corroborando com o nosso estudo, Costa (2011), detectou 2,34% (7/300) de cães infectados por *M. haemocanis* na técnica molecular e nenhum positivo no diagnóstico direto. Com isso a utilização da PCR e qPCR tem sido amplamente utilizada para diagnóstico de hemoplasmas devido a elevada especificidade e sensibilidade diagnóstica (KENNY et al., MESSICK, 2003).

Enfatizando o fato de que, os abrigos nos quais foram coletadas as amostras do presente estudo apresentavam diferenças na estrutura física e financeira, o que provavelmente influenciou os resultados de positividade para *Mycoplasma spp.*

No presente estudo, os resultados obtidos com a técnica diagnóstica PCR em tempo real (qPCR) baseada no gene que codifica o 16S RNA ribossomal (16S rRNA), demonstraram que 20,27 % (45/222) das amostras foram positivas para *Mycoplasma spp.* E ao correlacionar o número de animais positivos com as características do abrigo, evidenciou-se que aqueles bem-estruturados apresentaram um número pequeno de animais positivos, como o de São Gonçalo (n=2) e Guapimirim (n=3). Por outro lado, os abrigos mais humildes apresentaram positividade bem superior, como foi o caso de Seropédica (abrigo em condições ruins) (n=17) e Rio de Janeiro (abrigo em condições péssimas) (n=12).

A justificativa para tais resultados provavelmente está relacionado ao fato da maioria dos abrigos das cidades de Seropédica e Rio de Janeiro (abrigo em condições péssimas) possuírem uma grande densidade populacional dificultando o controle de doenças e de ectoparasitas, além de diversas espécies silvestres e gatos em contato com os cães. Alguns abrigos apresentavam grande quantidade de roedores, baratas e pombos. Já os abrigos das cidades de São Gonçalo (E), Guapimirim (F) e do Rio de Janeiro (H) apresentavam uma infraestrutura melhor possibilitando a separação dos grupos de animais por afinidades, presença ou ausência de doenças e melhor qualidade sanitária e alimentar.

As amostras de cães positivas na qPCR para *Mycoplasma spp.* foram submetidas à PCR convencional espécie específica para determinação do hemoplasma infectante. Dos 45 animais positivos na triagem pela qPCR, apenas 34 foram positivos na determinação de espécie. Tal acontecimento pode estar relacionado ao limiar diferente de detecção entre as duas técnicas moleculares ou a outra espécie infectante de hemoplasma não testada. A qPCR ou PCR quantitativa permite a obtenção de resultados de forma rápida e simultânea à execução da reação, sendo mais precisa e rápida em relação à PCR convencional (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Além disso, a qPCR tem como características a maior sensibilidade de detecção de patógenos quando comparada à PCR convencional (GARY et al., 2006;

TASKER, 2010; VIER; LAPPIN, 2010). Por meio da qPCR, espécies de hemoplasmas podem ser detectadas um dia após a infecção (TASKER; LAPPIN, 2006).

No Brasil, a maioria dos estudos diagnósticos utilizando biologia molecular obteve uma detecção inferior a relatada neste estudo. Ramos e colaboradores (2010), no Recife identificaram apenas um animal positivo para *M. haemocanis*. Em Goiânia, 2,34% (7/300) das amostras testadas foram positivas para o agente *M. haemocanis* (COSTA, 2011). Em Ribeirão Preto, a prevalência foi de apenas 1,9% (3/154) para *M. haemocanis* e 0,6% (1/154) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (ALVES et al., 2014). Valle e colaboradores (2014) realizaram seu estudo em Porto Alegre, onde diagnosticaram 5,1% (17/331) de amostras positivas para *M. haemocanis*, 1,8% (6/331) para o agente ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 6,9% para *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ ou ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. Por outro lado, uma frequência de positividade superior para *Mycoplasma* spp. foi relatado em recente estudo de Vieira e colaboradores (2015) em cães de um assentamento rural na região Sul do Brasil, utilizando ensaios de qPCR para detecção de micoplasmas hemotróficos. Foram positivos para *Mycoplasma* spp. 44,7% (59/132) dos animais, sendo 15,9% (21/132) para *Mycoplasma haemocanis* e 9,09% (12/132) para ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. As diferenças de frequência observada entre todos esses estudos podem estar associadas ao método de diagnóstico, ao gene alvo da PCR, a população amostrada ou condições climáticas. Tal o fato, que em nosso estudo, a população amostrada foi de abrigos, que por suas características, favorece geralmente a superpopulação de animais e presença de ectoparasitas. Com isso, a infecção via carrapato *Rhipicephalus sanguineus* ou inoculação oral por maior contato entre os animais por disputas de território podem estar contribuindo para a maior ocorrência de micoplasmas hemotróficos. Corroborando com tal hipótese, Kemming e colaboradores^b (2004) realizaram um estudo de prevalência de *M. haemocanis* comparando cães de estimação de canis e de abrigos, em que todos os cães de canis foram negativos, enquanto o nível de detecção nos abrigos variou de 30% a 87%. Adicionalmente, a baixa prevalência de hemoplasmas caninos, na Suíça, foi atribuído ao fato do *R. sanguineus* não ser permanentemente estabelecido (WENGI et al., 2008). E diversos estudos observaram uma frequência elevada de infecção por micoplasma hemotróficos em animais que residem em locais com alta concentração populacional ou de hábito livre (KEMMING et al., 2004^b; SASAKI et al., 2008; HII et al., 2012; BAKER et al., 2012). É digno de nota, no entanto, que em nosso estudo não houve associação estatística entre a presença da infecção por *Mycoplasma* spp. e a infestação por *R. sanguineus* ou comportamento agressivo/brigas. Ainda assim, foi observada uma frequência maior de animais infectados em locais que possuíam essas características.

Mundialmente a prevalência de infecção por micoplasmas hemotróficos baseados nos resultados das técnicas de biologia molecular qPCR e PCR convencional demonstram resultados de frequência superiores e inferiores ao presente estudo, semelhante ao que evidenciamos nos estudos publicados no Brasil. A prevalência molecular de *M. haemocanis* para a França, Espanha, Suíça, Tanzânia, Trindade, Estados Unidos e Grécia é de 3,3% (15/460), 14,3% (26/182), 0,9% (8/889), 19% (19/100) 4,9% (9/184), 0,6% (3/506), 5,6% (8/142), respectivamente (KENNY et al., 2004; WENGI et al., 2008; ROURA et al., 2010; BARKER et al., 2010; TENNANT et al., 2011; COMPTON et al., 2012). Num estudo com cães da Itália, Espanha e Portugal, a prevalência de *M. haemocanis* foi de 3,7% (22/600), 0,5% (1/200) e 40,0% (20/50), respectivamente (NOVACCO et al., 2010).

A prevalência molecular de ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ foi determinada em vários países incluindo a França, Espanha, Suíça, Tanzânia e Trindade, Estados Unidos, Grécia, onde foi reportado de 9,6% (44/460), 0,6% (1/182), 0,3% (3/889),

0% (0/100) e 2,7% (5/184), 0,7% (4/506), 4,2% (6/142), respectivamente (KENNY et al., 2004; WENGI et al., 2008; ROURA et al., 2010; BARKER et al., 2010; TENNANT et al., 2011; COMPTON et al., 2012). Outro estudo envolvendo três países mediterrânicos (Itália, Espanha e Portugal), observaram prevalência de 5% (30/600) , 2,0% (4/200) e 0% (0/50), respectivamente (NOVACCO et al ., 2010). Demonstrando que assim como no nosso estudo, a prevalência deste agente é menor que de *M. haemocanis*.

Em nosso estudo foram identificadas coinfeções entre ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *Mycoplasma haemocanis* 1,35% (3/222). Corroborando nosso estudo, Baker e colaboradores (2010) observaram valores semelhantes em Tanzânia 1,0% (1/100) e Trinidad 1,1% (2/184). Nestes estudos, foram apresentados resultados inferiores de coinfeção com *Mycoplasma haemocanis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ a partir de Roura e colaboradores (2010) na Espanha 0,6% (1/182), Novacco e colaboradores (2010) na Itália 0,8% (5/600), Tennant e colaboradores (2011) na Grécia 0,7% (1/142). Foi relatada um valor mais elevado de coinfeção por esses agentes por Kenny e colaboradores (2004) na França 2,6% (12/460).

A hematologia tem sido utilizada amplamente com a finalidade de obter informações acerca de doenças que acometem uma ampla variedade de animais domésticos para facilitar e direcionar o diagnóstico e monitoramento clínico. Na análise hematológica foram avaliados o eritrograma, leucograma e complementos (plaquetas, proteína plasmática total e reticulócitos) dos cães positivos para *Mycoplasma* spp. e, posteriormente para as espécies *Mycoplasma haemocanis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’/‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’. A avaliação hematológica foi representada por dois métodos estatísticos, possibilitando uma avaliação pelos valores médios entre os grupos positivos e negativos e pela frequência das alterações em cada grupo.

Correlacionando as alterações hematológicas com a infecção por *Mycoplasma* spp., apenas proteína plasmática total obteve significância estatística ($p=0,0010$), mas ainda dentro do intervalo de referência determinado para espécie. Os parâmetros hematócrito e hemácias, caracterizando assim a anemia, apresentaram valores médios abaixo dos valores de referência para ambos os grupos, mas não apresentou associação com a infecção. Resultados semelhantes são relatados na literatura por diversos grupos de pesquisa, os quais não obtiveram êxito em associar estatisticamente a anemia com a infecção por *M. haemocanis* e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’. (WENGI et al., 2008; BAKER et al., 2010; NOVACCO et al., 2010; ROURA et al., 2010; TENNANT et al., 2011; VALLE et al., 2014). Casos esporádicos com anemia grave por *M. haemocanis* foram descritos apenas em cães imunocomprometidos ou esplenectomizados (KEMMING et., al 2004; NOVACCO et al., 2010; WILLI et al., 2010). Acredita-se que a redução destes parâmetros no presente estudo possa estar associado a uma alimentação de má qualidade ou mesmo a espoliação sanguínea por ectoparasitas e endoparasitas (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Devemos levar em consideração que os parasitos que são adaptados ao organismo dos hospedeiros, têm maiores oportunidades de perpetuarem sem causarem maiores danos ao mesmos.

Os valores médios de eosinófilos apresentaram-se acima do intervalo de referência em ambos grupos positivos e negativos para *Mycoplasma* spp., mas não demonstrou diferença significativa. A eosinofilia está relacionada a funções anti-inflamatórias, distúrbios de hipersensibilidade devido ao prurido por picada de ectoparasitas e à infecções por helmintos (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Devemos levar em consideração que em abrigos de cães, devido a fatores estruturais e financeiros, é bastante difícil ter um controle adequado de ectoparasitas e endoparasitas, o que provavelmente esteja contribuindo para a eosinofilia observada no presente estudo.

A hipoproteïnemia ($p=0,0453$) apresentou associação estatística e ocorreu somente no grupo de animais negativos. A hipoproteïnemia pode indicar estados de subnutrição, bem como de insuficiência ou lesão hepática e hemorragias. As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente pelo fígado, sendo que a taxa de síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional, especialmente com os níveis de proteínas e com a funcionalidade hepática. A hiperproteïnemia, por sua vez, obteve associação com a infecção ($p=0,0161$) e pode estar associado   doenç as ou processos inflamatórios que estimulam a síntese de certas imunoglobulinas alterando a produção prote ica (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Hora (2008) relatou que felinos infectados por micoplasmas hemotróficos apresentaram hiperproteïnemia devido ao estímulo antig nico, resultante do aumento da resposta imune pela presenç a do agente infeccioso. É digno de nota, no entanto, que hiperproteïnemia pode ser observada também em casos de desidratação, neoplasias, e artificialmente, em amostras hemolisadas (SUTTON; HOBMAN, 1975; SUTTON; JOHNSTONE, 1977). Mas, ressalta-se que no presente estudo, nenhuma das amostras apresentaram-se hemolisadas.

Na análise hematológica para as espécie *M. haemocanis*, apenas proteína plasmática total obteve significância estatística ($p=0,0012$), mas ainda dentro do intervalo de referência determinado para espécie. O parâmetro eosinófilo não apresentou diferenç a significativa, mas vale ressaltar que em ambos grupos os valores médios foram superiores aos determinados como referência para espécie, da mesma forma que observado para *Mycoplasma* spp.. Não ocorreu associação estatística entre anemia e a infecção no presente estudo. Entretanto, é digno de nota, que estudos iniciais conduzidos por nosso grupo de pesquisa, detectaram DNA de *M. haemocanis* em 13 dos 109 cães avaliados da região de Araguaína, Tocantins. E, dos animais positivos, 69,2% apresentaram anemia (BALDANI et al., 2014). Devemos ressaltar que a região possui clima favorável a desenvolvimento de vetores atr podes. Na avaliação por frequência de alteração hematológica foi observada a associação entre a infecção por *M. haemocanis* e hiperproteïnemia ($p=0,0238$), assim como ocorreu com *Mycoplasma* spp..

A bioquímica sanguínea tem sido aplicada para obter informações sobre doenç as que acometem uma ampla variedade de animais domésticos, dessa forma auxiliando e direcionando o diagnóstico clínico. No presente estudo, os parâmetros séricos avaliados foram: proteína total, albumina, globulina, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina. A avaliação bioquímica foi representada por dois métodos estatísticos, possibilitando avaliar os resultados pelos valores médios entre os grupos positivos e negativos e pela frequência das alterações em cada grupo.

Os valores médios dos cães positivos para *Mycoplasma* spp. pela qPCR demonstrou haver diferenç a significativa nos parâmetros proteína, albumina, creatinina e fosfatase alcalina. Os demais parâmetros bioquímicos não diferiram entre si a 5% de significância. Ressalta-se, no entanto, que creatinina e fosfatase alcalina permaneceram dentro do intervalo de referência estabelecido para espécie. E no que se refere a proteína total, o grupo de animais negativos apresentou valor médio inferior ao intervalo de referência estabelecido para espécie, enquanto o grupo de animais positivos para *Mycoplasma* spp. obteve valores médios dentro do intervalo de referência. Acredita-se, que no presente estudo, devido ao fato dos animais serem de abrigos, a hiperproteïnemia esteja associada a proteólise devido a necessidade do animal em manter seu metabolismo retirando das suas reservas corpóreas a sua fonte de energia, devido a falta de alimento de qualidade (STOCKHAM & SCOTT, 2011) ou a hemoconcentração ocasionada pela desidratação, devido falta de água potável disponível. Muitos dos abrigos visitados utilizavam ração de baixa qualidade nutricional e até mesmo alimento caseiro pobre em nutrientes, apresentando quadros de caquexia e inanição. Segundo

GOULD et al. (2000), em um estudo sobre *Ehrlichia* a hipoglobulinemia e a hipoalbuminemia foram detectadas em 23 e 21 cães infectados, respectivamente. Tal fato pode ser justificado pela presença de distúrbios entéricos ou hepáticos graves, levando tanto à perda de albumina, como de globulina intestinal. Acredita-se que no presente estudo a hipoglobulinemia ocorreu possivelmente devido a menor síntese de globulina pelos hepatócitos (exceto γ -globulinas), seja devido a má nutrição ou inanição intensa (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Ressalta-se que nefropatias e insuficiência hepática também podem ocasionar hipoproteinemia e hipoglobulinemia, mas no presente estudo provavelmente não seja a causa pois os marcadores renais e hepáticos permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie canina (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Quanto as alterações bioquímicas mais frequentes nos animais positivos e negativos para *Mycoplasma* spp., evidenciou-se diferença estatística quanto à hiperfosfatemia ($p=0,0270$), apesar de apenas animais negativos apresentarem essa alteração. Lesões hepáticas ocasionadas por necrose ou tumefação dos hepatócitos que resultam em comprometimento do fluxo biliar (colestase obstrutiva), estimulam a produção de L-FA e seu acúmulo esta relacionado com o aumento de sua atividade sérica (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Elevações de FA também podem ocorrer por corticosteróides ou lesões ósseas, no entanto, acredita-se que no presente estudo estas causas não estejam atuando uma vez que a anamnese e exame clínico não direcionaram para tal constatação. Adicionalmente, a azotemia (uréia elevada) foi estatisticamente ($p=0,0023$) associada à infecção. A elevação dos valores de uréia representa um aumento de compostos nitrogenados não proteicos no sangue, sendo no presente estudo, um caso provável de azotemia pré-renal originada pela proteólise aumentada gerando mais NH_4^+ , o que por sua vez aumenta a síntese de ureia pelos hepatócitos ou ainda devido a desidratação (STOCKHAM & SCOTT, 2011). Tal hipótese, corrobora com o achado de hipoproteineia evidenciada em alguns animais e é condizente com as condições de alimentação da maioria dos abrigos do presente estudo, bem como com o fato de diversos animais apresentarem-se desidratados no exame clínico.

Com relação aos valores médios dos parâmetros de bioquímica sanguínea dos cães positivos para *M. haemocanis*, observou-se diferença significativa no parâmetro fosfatase alcalina ($p=0,0173$), apesar dos valores médios permanecerem dentro do intervalo de referência estabelecido para a espécie. Uréia também foi estatisticamente associada à infecção, apresentando valores médios superiores ao intervalo de referência estabelecido para espécie em ambos os grupos. Os demais parâmetros bioquímicos não diferiram entre si a 5% de significância. Analisando a frequência das alterações bioquímicas demonstrada nos animais positivos e negativos para *M. haemocanis*, a azotemia foi a única alteração associada à infecção ($p=0,0061$). Assim, o aumento do valor médio de uréia e a azotemia, se justificam pelo catabolismo proteico aumentado ou pela desidratação dos animais, conforme também evidenciou-se nos animais positivos para *Mycoplasma* spp.. Com relação aos valores médios para '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*' apenas ALT (alanina-transaminase) ($p=0,0301$) apresentou associação estatística com a infecção. A elevação dos valores de ALT pode representar uma lesão de hepatócitos (reversível ou irreversível) ocorrendo por uma variedade de fatores como inflamações de causas infecciosas e não-infecciosas (STOCKHAM & SCOTT, 2011).

Devido ao fato de no nosso estudo 91 animais apresentaram-se desidratados durante o exame clínico, foram avaliados por análise de frequência as alterações hematológicas, complementos e bioquímica. No entanto, não houve associação com a infecção. Sugere-se portanto, que os achados laboratoriais dos animais do presente estudo não sofreram influência do por estarem desidratados.

O hemograma completo e a bioquímica sanguínea são instrumentos para avaliação do estado fisiológico, diagnóstico e monitoramento do animal, servindo para complementar o exame clínico e anamnese realizados pelo médico veterinário. As alterações hematológicas e achados bioquímicos são susceptíveis a oscilação de acordo com o estágio clínico da doença. A maioria dos cães infectados com hemoplasmas são relatados como sendo portadores assintomáticos ou crônicos (NOVACCO, et al., 2010; HUEBNER, et al., 2006) e apenas casos esporádicos de anemia hemolítica aguda têm sido relatados, geralmente em imunocomprometidos infectados ou esplenectomizados (SYKES, et al., 2004; HULMER-MOIR, et al., 2006; KEMMING, et al., 2004). Desta forma as alterações encontradas nesse estudo podem ocorrer em inúmeras patologias, devendo sempre ser correlacionada com outros dados para concluir o diagnóstico.

Os fatores associados à infecção levam em consideração aspectos clínicos juntamente com a anamnese e demonstram grande importância na questão do diagnóstico precoce de doenças a fim de intervir para o tratamento do processo patológico. O exame clínico do animal pode ser subjetivo em alguns aspectos, devendo-se utilizá-lo em conjunto com exames laboratoriais.

Com relação aos fatores associados, a infecção por *Mycoplasma* spp. apresentou associação significativa com o gênero ($p=0,0062$), no qual os cães machos apresentaram-se duas vezes mais propensos à infecção do que as fêmeas. Sasaki e colaboradores (2008) reportaram resultados semelhantes, em que 96% (24/25) dos cães positivos para *M.haemocanis* eram do sexo masculino, atribuindo a alta prevalência à ingestão de sangue infectado durante as frequentes brigas entre os animais. Acredita-se, que no nosso estudo, por tratar-se de cães de abrigos, a maior ocorrência de animais positivos do sexo masculino esteja associada a disputa por território e alimentação pelo fato da maioria dos animais não serem castrados e à superlotação. Demonstrando que a grande densidade de animais é um fator importante na alta prevalência da infecção por hemoplasmas caninos, estudos anteriores identificaram como um fator de risco populações de canis (KEMMING et al., 2004; NOVACCO et al., 2010) por poderem ter um maior risco de exposição a pulgas e ao carrapato *R. sanguineus* (Dantas-Torres, 2008).

No presente estudo, também foi observada associação entre a idade e a infecção ($p=0,0041$), onde adultos apresentaram frequência de infecção quase dez vezes maior que filhotes. Tal correlação não é descrita em estudos anteriores, os quais não evidenciaram associação significativa entre a infecção por hemoplasmas caninos com o gênero ou idade dos cães (KENNY et al., 2004; WENGI et al., 2008; BAKER et al., 2010; TENNANT et al., 2011; ALVES et al., 2014). No entanto, semelhante ao nosso estudo, Vieira e colaboradores (2015) observaram correlação positiva entre cães acima de um ano de idade e infecções por hemoplasmas.

Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a infecção e acesso à rua, histórico de brigas, castração, histórico ou presença de pulgas e carrapatos. Corroborando com nossos achados, diversos autores também não demonstraram a associação entre a infecção por hemoplasmas e infestação por carrapatos (BAKER et al., 2010; TENNANT et al., 2011; VIEIRA et al., 2015). Em contrapartida Valle et al., (2014) relataram a presença de ectoparasitas como importante fator de risco para a infecção. É digno de nota, que apesar de nosso estudo não ter evidenciado associação estatística com histórico e/ou presença de ectoparasitas, uma maior frequência de animais positivos para *Mycoplasma* spp. foi evidenciada nos canis que apresentavam menor infra-estrutura e condições que favoreciam a ocorrência de pulgas e carrapatos. Adicionalmente, o histórico de ectoparasitas pode ter sido falho devido ao grande número de animais nos locais, favorecendo que a pessoa responsável

pelos animais acabasse não se recordando detalhadamente de todos os fatos que ocorreram com cada cão e que muitos animais haviam recebido tratamento para eliminação de ectoparasitas. Apenas alguns abrigos mais estruturados possuíam planilhas sobre cada cão, possibilitando um histórico detalhado dos mesmos.

As principais alterações clínicas e dados da anamnese associados à positividade para *Mycoplasma* spp. observada em nosso estudo foram: linfadenopatia 37,8% (17/45), lesões de pele compatíveis com sarna 28,9% (13/45), TPC (tempo de preenchimento capilar) elevado 31,1% (14/45), afecções bucais 15,5% (7/45), erlichiose 13,3% (6/45), letargia 8,9% (4/45), babesiose 4,4% (2/45), tumor venéreo transmissível (TVT) 4,4% (2/45) e cinomose 2,2% (1/45). De modo semelhante, onde alterações clínicas compatíveis com hemoplasmas não foram evidenciadas, Novacco e colaboradores também não observaram sinais clínicos claramente atribuíveis à infecção nos cães infectados por hemoplasmas (NOVACCO et al., 2010). E, Valle et al. (2014) não relataram sinais clínicos e laboratoriais sugestivos da infecção. É digno de nota, que a maioria dos cães infectados por hemoplasmas são portadores assintomáticos crônicos (CHALKER, 2005). Podem ser observados sinais clínicos inespecíficos como anorexia, letargia, perda de peso, inapetência, febre e mucosas pálidas à medida que anemia progride (BUNDZA et al., 1976; KEMMING et al., 2004^a; WIILI et al., 2010; MESSICK; HARLEY, 2015). Apenas casos esporádicos da forma aguda com anemia hemolítica são relatados na literatura (KEMMING et al., 2004^{a,b}; CHALKER, 2005; TASKER et al., 2010; PITORRI et al., 2012). Mas é importante salientar que infecções crônicas podem ser exacerbadas na ocorrência de co-infecções por *Ehrlichia* spp. (INOKUMA et al., 2006), *Babesia* spp. (WRIGTH, 1971; KRAJE, 2001; TRAPP et al., 2006), *Hepatozoon canis* (RAMOS et al., 2010) e demodicose (NOVACCO et al., 2010). Aliado a isso, está o fato de que a imunossupressão causada pela doença crônica e pela quimioterapia pode explicar a associação significativa entre doenças neoplásicas e infecção, na qual alguns cães com neoplasia mostraram-se com maior tendência a serem positivos para hemoplasmas (VIEIRA et al., 2014). Wengi e colaboradores (2008) reportaram que dos 11 cães positivos em 899 testados pela técnica de PCR, 4 apresentavam neoplasias, 2 apresentavam-se com lacerações devido à brigas, doença gastrointestinal e cardíaca. Assim, os achados do presente estudo denotam a importância dos hemoplasmas como um agente potencializador de efeitos adversos no organismo animal. Devemos levar em consideração que uma parcela dos animais havia recebido tratamento para erlichiose recentemente, o que pode ter interferido no diagnóstico da micoplasmose.

O conhecimento da ocorrência de micoplasmas hemotróficos na região Metropolitana do Rio de Janeiro, auxilia o clínico veterinário na investigação desse agente infeccioso, que pode ocorrer concomitante a outras doenças imunossupressoras, que devido a isto, não respondem de forma adequada ao tratamento. A utilização de técnicas moleculares esta sendo expandida, com isso possibilitando ao clínico veterinário uma ferramenta diagnóstica eficiente que deve ser associada com sinais clínicos e achados de bioquímica e hematologia para melhor compreensão da infecção pelos agentes.

6 CONCLUSÕES

- Cães domésticos oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro estão expostos a micoplasmas hemotróficos, com maior frequência de *Mycoplasma haemocanis*, seguido de '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum/haemominutum*'

- Pela primeira vez a detecção dos agentes micoplasmas hemotróficos ocorreu em cães da Região Metropolitana do Rio de Janeiro utilizando as técnicas de diagnóstico molecular PCR e qPCR.
- A detecção direta pela microscopia óptica de micoplasma hemotróficos na superfície das hemácias é difícil, podendo ocorrer falsos-positivos e falsos-negativos.
- As alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas foram discretas e não-específicas, porém podem ser úteis para clínicos no diagnóstico e no acompanhamento do curso de infecção por esses agentes.
- É importante levar em consideração os fatores associados, em especial, o fato de que cães adultos e machos são mais propensos à infecção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEMAN, A. R.; PATE, M. G.; HARVEY, J. W.; GASKIN, J.M.; BARBET, A. F. *Western immunoblot analysis of the antigens of Haemobartonella felis with sera from experimentally infected cats. Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 1474-1479, 1999.

ALVES, T.B.; FAGGION, S. A.; SANTOS, E. V.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; FACHIN, A. L.; MARINS, M. Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Archivos de Medicina Veterinária*, v. 46, p. 333-336, 2014.

BALAKRISHNAN, N.; MUSULIN, S.; VARANAT, M.; BRADLEY, M. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Serological and molecular prevalence of selected canine vector borne pathogens in blood donor candidates, clinically healthy volunteers, and stray dogs in North Carolina. *Parasites & Vectors*, v.7, p.116, 2014.

BAKER, H. J.; CASSELL, G.H.; LINDSEY, J. R. Research complications due to *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* infections in experimental animals. *American Journal of Pathology*, v. 64, p.625-32, 1971.

BARKER, E.N.; TASKER, S.; DAY, M. J.; WARMAN, S. M.; WOOLLEY, K.; BIRTLES, R.; GEORGES, K.C.; EZEOKOLI, C. D.; NEWAJ-FYZUL, A.; CAMPBELL, M. D.; SPARAGANO, O. A. E.; CLEAVELAND, S.; HELPS, C. R. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “Candidatus *Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. *Veterinary Microbiology*, v.140, p.167-170, 2010.

BARKER, E. M.; DARBY, A. C.; HELPS, C. R.; PETERS, I. R.; HEESOM, K. J.; ARTHUR, C. J.; CROSSET, B.; HUGHES, M. A.; RADFORD, A. D.; TASKER, S. Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. *Veterinary Research*, v.42, p. 83, 2011b.

BARKER, E. N.; LANGTON, D. A.; HELPS, C. R.; BROWN, G.; MALIK, R.; SHAW, S. E.; TASKER, S. Haemoparasites of free-roaming dogs associated with several remote Aboriginal communities in Australia. *BioMed Central Veterinary Research*, v. 8, n.1, p. 55, 2012.

BALDANI, C. D.; SILVA, A. T.; RAIMUNDO, J. M.; GUIMARAES, A.; RODRIGUES, R. B.; SANTOS, H. A.; BARBOSA, S. M.; SANTOS, L. A.; NEPOMUCENO, L. L.; MASSARD, C. L. Molecular diagnosis of canine hemotropic Mycoplasmas in Tocantins State, Brazil. In: 39 World Small Animal Veterinary Association Congress, 2014, Cape Town. **39 World Small Animal Veterinary Association Congress**, p. 857-857, 2014.

BAUMANN, A.; GUIMARÃES, A. M. S.; SILVA, C. C.; YAMAGUTI, M.; KOZEMJAKIM, D. A.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; TIMENETSKY, J. *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. **Veterinary Clinical Pathology Supplement**, v. 35, p. 370, 2006.

BAUMANN, J.; NOVACCO, M.; RIOND, B.; BORETTI, F. S.; HOFMANN-LEHMANN, R. Establishment and characterization of a low-dose *Mycoplasma haemofelis* infection model. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 410-416, 2013.

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**, v.59, n.10, p.1215-1220, 1998.

BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P.; 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.; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. Uma revisão da ocorrência dos hemoplasmas (micoplasmas hemotróficos) no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.18, n.3, p. 1-7, 2009.

BIRKENHEUER, A.; BREIDTSCHWERDT, E. B.; ALLEMAN, R.; PITULLE, C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, p. 1385-1388, 2002.

BOSNIC, D.; BAREŠIĆ, M.; ANIĆ, B.; ŠENTIĆ, M.; ČEROVEĆ, M.; MAYER, M.; ČIKIĆ, N. Rare zoonosis (hemotropic mycoplasma infection) in a newly diagnosed systemic lupus erythematosus patient followed by a *Nocardia asteroides* pneumonia. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 14, p. 92–95, 2010.

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

BRADDOCK, J. A.; TASKER, S.; MALIK, R. The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in a naturally infected cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, p. 161-165, 2004.

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

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

BRODEY, R. S. and SCHALM. O. W. Haemobartonellosis and thrombocytopenic purpura in a dog. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.143, p.1231-1236, 1963.

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

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2004, p. 117-128.

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

CLARK, K. G. A basophilic micro-organismo infecting human red cells. **British Journal of Haematology**, v. 29, p. 301–304, 1975.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBACARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, v. 93, p. 307-317, 2003.

COMPTON, S. M.; MAGGI, R. G; BREITSCHWERDT E. B. *Candidatus* Mycoplasma haematoparvum and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.35, p. 557–62, 2012.

COSTA, H. X. **Interação de hemoparasitos e hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia**. Goiânia, 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás.

DE MORAIS, H. S. A.; DAGNONE, A. S.; TRAPP, S. M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J. B. Mycoplasma haemocanis (previously, Haemobartonella canis) infection in non-splenectomized dogs in Brasil: 4 cases (1999-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17, p. 421, 2003.

DONOVAN, E. F. and LOEB. W. F. Haemobartonellosis in the dog. **Veterinary Medicine**, v. 55, p.57-62, 1960.

DUARTE, M. I.; OLIVEIRA, M. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARIANO, O. N.; TAKAKURA, C. F.; PAGLIARI, C.; CORBETT, C. E. *Haemobartonella*-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, p. 976–977, 1992.

FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A. Molecular, clinical and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1581-1588, 1998.

GOULD, D. J.; MURPHY, K.; RUDORF, H.; CRISPIN, S. M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. **Journal Small Animal Practice**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 263-265, 2000.

GRETILLAT, S. *Haemobartonellosis canis* (Kikuth, 1928) in the blood of dogs with parvovirus disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 22, p.647-653, 1981.

HAMEL, D.; SILAGHI, C.; LESCAI, D.; PFISTER, K. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia spp.* **Parasitology Research**, 2015. (In press)

HAMEL, D.; SHUKULLARI, E.; RAPTI, D.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; REHBEIN, S. Parasites and vector-borne pathogens in client-owned dogs in Albania. Blood pathogens and seroprevalences of parasitic and other infectious agents. **Parasitology Research**, v.110, p.1537-1545.

HII, S.F.; KOPP, S. R.; THOMPSON, M. F.; O'LEARY, C.A.; REES, R. L.; TRAUB, R. J.; Canine vector-borne disease pathogens in dogs from south-east Queensland and north-east Northern Territory. **Australian Veterinary Journal**, v. 90, p. 130-135, 2012.

HII, S.F.; TRAUB, R. J.; THOMPSON, M. F.; HENNING, J.; O'LEARY, C.A.; BURLEIGH, S.; MCMAHON, S.; REES, R. L.; KOPP, S. R.; Canine tick-borne pathogens and associated risk factors in dogs presenting with and without clinical signs consistent with tick-borne diseases in northern Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 93, p. 58-66, 2015.

HOELZLE, L. E. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 215-226, 2008.

HORA, A. L. **Micoplasma hemotróficos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos**. 2008. p.75. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

HU, Z.; YIN, J.; SHEN, K.; KANG, W.; CHEN, Q. Outbreaks of Hemotrophic Mycoplasma Infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 1139-1140, 2009.

HUEBNER, J.; VAHLENKAMP, T. W.; MULLER, E.; LANGBEIN-DETSCH, I. Mycoplasma infection in anaemic and non anaemic dogs in Germany. In: **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 712, 2006.

HULME-MOIR, K. L.; BARKER, E. N.; STONELAKE, A.; HELPS, C. R.; TASKER, S. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 22, n.4, p. 582-587, 2010.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M.; DABOUST, B. et al. Epidemiological survey of *Ehrlichia canis* and related species infection in dogs in Eastern Sudan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 461 - 463, 2006.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febger, p. 417, 1993.

JENKINS, K. S.; DITTMER, K. E.; MARSHALL, J. C.; TASKER, S. Prevalence and risk factors analysis of feline haemoplasma infection in New Zealand domestic cats using a real-time PCR assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, p. 1063-1069, 2013.

JR. SMITH, F.W. K.; TILEY, L. P. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécie Canina e Felina**. 3 ed. São Paulo: Manole, p. 1427, 2008.

KENNY, M. J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 5397–5399, 2004.

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

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

KEWISH, K.E.; APPELYARD, G.D.; MYERS, S.L.; KIDNEY, B.A.; JACKSON, M.L. *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, v.45, p.749-752, 2004.

KIKUETH, W. Ueber einen neuen Anaemie-erreger, *Bartonella canis. nov. sp.* **Klinische Wochenschrift**, v. 7, p. 1729-1730, 1928.

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

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

LINARDI, P. M. and SANTOS, J. L. C. "*Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species." **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.4, p. 345-354, 2012.

LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence and geographical and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 276-84, 2010.

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

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum' in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 103, 2013.

MAGGI, R. G.; BIRKENHEUER, A. J.; HEGARTY, B. C.; BRADLEY, J. M.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 127, 2014.

MAIA, L. M. P. **Avaliação da ocorrência de piroplasmas e hemoplasmas em gatos domésticos no estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Fluminense.

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

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, n.6, p.1453-65, 2003.

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

MESSICK, J. B.; SANTOS A. P. Identification, Bioinformatics Analyses, and Expression of Immunoreactive Antigens of *Mycoplasma haemofelis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 1275-1281, 2011.

MESSICK, J. B. & HARVEY, J. W. Micoplasmose Hemotrópica (Hemobatonelose) In.: GREENE, C.E. Doenças Infecciosas em cães e gatos. 4th ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 325-335, 2015.

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B. et al. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro Medicina. Veterinária Zootecnia.**, v.55, p.141-147, 2003.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of to genera *Hamobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptios of *Candidatus Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemomuris*, *Candidatus Mycoplasma haemosuis* and *Candidatus Mycoplasma wenyonii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 891-899, 2001.

NOVACCO, M.; MELI, M.L.; GENTILINI,F.; MARSILIO, E.; CECI,C.; PENNISI, M.G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; LUTZ, H. and HOFMANN-LEHMANN, R.:Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection.**Veterinary Microbiology**,v.142, p. 276-284, 2010.

NOVACCO, M.; MELI, M.L.; GENTILINI, F.; MARSILIO, E.; CECI, C.; PENNISI, M. G.; LOMBARDO, G.; LLORET, A.; SANTOS, L.; CARRAPIÇO, T.; WILLI, B.; WOLF, G.; KIDNEY. Perspectives in clinical nephrology. **International**, v. 50, p. 343-357, 1996.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

O'DWYER, L. H.; GUIMARÃES, L.; MASSARD, C. L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonellacanis*, em um cão esplenectomizado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 83-84, 1997.

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

PITORRI, F.; DELL'ORCO, M.; CARMICHAEL, N.; BARKER, E. N.; HOLLYWOOD, M.; TASKER, S. Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of *Mycoplasma haemocanis* infection with doxycycline in a dog.**Veterinary Clinical Pathology**, v.41, n.4,p. 493-496, 2012.

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

RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, R.; Souza I, Pimentel D, et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife. **Parasitology Research**, v.107, p. 1115–20, 2010.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western Immunoblot Analysis of

Haemobartonella muris and Comparison of 16S rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 823-829, 1997.

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

SANTOS, A. P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre, 2008. 162 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal do RioGrande do Sul.

SHARIFIYAZDI, H.; HASIRI, M. A.; AMINI, A. H. Intravascular hemolysis associated with *Candidatus Mycoplasma hematoparvum* in a non-splenectomized dog in the south region of Iran. CLINICAL REPORT. **Veterinary Research Forum**, v. 5, n. 3, p. 243 – 246, 2014.

SANTOS, A. P.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W.; OLIVEIRA, S. T.; PEDRALLI, V.; LASTA, C. S.; LACERDA, L. A.; ESTEVES, V. S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; WILLI, B.; GONZALEZ, F. H. D. Design, optimization and application of a conventional PCR assay with an internal control of *Candidatus Mycoplasma turicensis* 16S rDNA in domestic cats from Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 443-452, 2009.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 179, p. 145-148, 2009.

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

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Eritrócitos In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.496-532, 2011.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Proteínas In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 303-339, 2011.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Sistema urinário In: STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 342-411, 2011.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Veterinary Clinical of Small Animals**, v. 33, p. 91 – 127, 2003.

SYKES, J. E.; BAILIFF, N. L.; BALL, L. M.; FOREMAN, O.; GEORGE, J.W.; FRY, M. M. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenectomized dog with hemic

neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 1946-1951, 2004.

SYKES, J. E. et al. 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum', a novel hemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, pt. 1, p. 27-30, 2005.

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

SUTTON, R. H.; JHONSTONE, M. The Value of Plasma Fibrinogen Estimations in Dogs. A Comparison With Total Leucocyte and Neutrophil Counts. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 18, p. 277-281, 1977.

TALUKDER, M. H.; MATSUU, A.; IGUCHI, A.; ROY, B. C.; NISHII, N.; HIKASA, Y. PCR-based survey of vector-borne pathogens in dogs in Dhaka, Bangladesh. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 2, p. 249-254, 2013.

TASKER, S.; LAPPIN, M.R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 4, p. 3-11, 2002.

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

TASKER, S. Feline Infectious Anaemia. In: CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Feline Medicine and Therapeutics**, 3ed. Blackwell Publishing. p. 669-678, 2004.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In Practice**, v. 28, p. 136-141, 2006.

TASKER, S. Hemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, n.5, p.369-381, 2010.

TENNANT, K.V.; BARKER, E.N.; POLIZOPOULOU, Z.; HELPS, C. R.; TASKER, S. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of haemoplasmas in healthy and unhealthy dogs from Central Macedonia, Greece. **Journal of Small Animal Practice**, v. 52, p. 645-649, 2011.

THRALL, M. A. Princípios gerais sobre exames e diagnósticos laboratoriais. In: THRALL et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1ed. Roca, p. 18-20, 2007.

TOLEDO-PINTO, E. P.; SALVARANI, R. S.; SANTOS, G. J.; MOÇO, H. F. Hemobartonelose em gatos: Revisão de Literatura. In: **Anais da 3ª Semana de Patologia Veterinária**. Garça: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2005.

TORKAN, S.; ALDAVOOD, S. J.; SEKHAVATMANDI, A.; MOSHKELANI, S. Detection of haemotropic *Mycoplasma* (*Haemobartonella*) using multiplex PCR and its relationship with epidemiological factors in dogs. **Comparative clinical pathology**, v. 23, p. 669-672, 2014.

TRAPP, S. M.; MESSICK, J. B.; VIDOTTO, O.; JOJIMA, F. S.; MORAIS, H. A. S. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 177–80, 2006. [Short Communication].

VEIR, J. K.; LAPPIN, M. R. Molecular Diagnostic Assays for Infectious Diseases in Cats. **Veterinary Clinical of Small Animals**, v. 40, p. 1189-1200, 2010.

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

VIEIRA, R.F.C.; VIDOTTO, O.; VIEIRA, T. S. W. J.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; NASCIMENTO, N. C.; SANTOS, N. J; R.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J . B. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in human beings, dogs and horses in a rural settlement in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, n.4, p.353-357, 2015.

VILLIERS, E. Disorders of erythrocytes. In: VILLIERS, E.; BLACKWOOD, L. **Manual of canine and feline clinical pathology**, 2ed. British Small Animal Veterinary Association (BSAVA), p. 44-45, 2005.

WARMAN, S.M.; HELPS, C.R., BARKER, E.N. et al. Haemoplasma infection is not a common cause of canine immune-mediated haemolytic anaemia in the UK. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, p.534-539, 2010.

WEISS, E.; MOULDER, J. E. Order I: Rickettsiales. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984.

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

WEST, H. J. Haemobartonellosis in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 20, p. 543-549, 1979.

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, p. 2581– 2585, 2005.

WILLI, B.; 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.

WILLI, B.; NOVACCO, M.; MELI, M.L.; WOLF-JACKEL, G.; BORETTI, F.S.; WENGI, N.; Lutz, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Haemotropic mycoplasma of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance Europe. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 152, p. 237–244, 2010.

WOODS, J.E.; BREWER, M.M.; HAWLEY, J.R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M.R. Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 1008–1012, 2005.

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

WOLF-JÄCKEL, G A.; JÄCKEL, C.; MUSEU, K.; HOELZLE, K; TASKER, S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, Characterization and Application of a Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotrophic Mycoplasma Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p.1917-1925, 2010.

YANG, D.; TAI, X.; QIU, Y.; YUN, S. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiology and Infection**, v. 125, p. 421–426, 2000.

ZHUANG, Q. J.; ZHANG, H. J.; LIN, R. Q.; SUN, M. F.; LIANG, X. J.; QIN, X. W.; PU, X.; ZHU, Q. The occurrence of the feline ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ in dogs in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 689–92, 2009.

8 ANEXOS

ANEXO A - Termo de consentimento livre esclarecimento

ANEXO B - Questionário epidemiológico e avaliação clínica, referente aos cães oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil.

ANEXO C - Fotos demonstrando as diferentes condições estruturais, higiênico-sanitárias e presença de animais contactantes observadas nos abrigos.

ANEXO – A:



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

Proprietário: _____ Data: ____/____/____

Convite à participação da pesquisa intitulada “**Micoplasmas hemotróficos como potenciais agentes causadores anemia em cães domésticos do Rio de Janeiro**” que tem como objetivo investigar a presença de infecção pelos agentes micoplasmas hemotróficos em cães domésticos por meio de ensaios moleculares, bem como correlacionar a infecção às alterações clínicas, hematológicas e bioquímicas. Contribuirá, adicionalmente, para o desenvolvimento de linhas de pesquisa de caráter clínico-epidemiológico.

A pesquisa não oferece riscos físicos para você ou seus animais, no entanto, seu animal será devidamente contido para colheita do material, procedimento que pode trazer algum desconforto ao animal e indiretamente ao proprietário.

Sua participação baseia-se no *consentimento da coleta de amostra de sangue do seu animal pelos residentes do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* que será aplicado em todas as propriedades pesquisadas. As informações obtidas serão utilizadas somente para fins da pesquisa acima mencionada, sua identificação e dados confidenciais serão mantidos em sigilo.

Cristiane Divan Baldani, DSc. Prof. Adjunto I

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Instituto de Veterinária - Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária

BR 465, Km 7, Seropédica, RJ CEP: 23890-000

Telefone: 21 2682-1711 / Ramal 232/ e-mail: crisbaldani@ufrj.br

Concordo voluntariamente em participar do estudo, dispondo da informação de que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício adquirido. _____ Data: ____/____/____

(Assinatura do participante)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário.

(Assinatura do responsável pelo estudo)

Data: ____/____/____

ANEXO - B:



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

IDENTIFICAÇÃO

Canino nº (Registro):	Data:		
Nome do canino:	Sexo:	Raça:	Idade:
Endereço:	Tels:		

HISTÓRICO:

- 1) Castrado: () Sim () Não
- 2) Histórico de brigas: () Sim () Não
- 3) Animal já recebeu transfusão ou qualquer derivado até o momento da coleta? () Sim () Não
- 4) Histórico de ectoparasitas: () Sim () Não. Quais? _____
- 5) Local de moradia: () Casa () Apartamento () Abrigo () Gatil () Rua () Sítio
- 6) Acesso à rua: () Sim () Não
- 7) Convívio com outros caes? () Sim () Não. Quantos? _____
- 8) Convívio com outras espécies () Sim () Não. Qual(is)/Quantos? _____
- 9) Presença de ectoparasitos? () Sim () Não.
Quais: () Pulgas () Carrapatos () Piolhos () Sarna () Intensidade: _____
- 10) Uso de ectoparasiticida? () Sim () Não. Qual: _____
- 11) Animal é vermifugado? () Sim () Não. Qual a frequência? _____
- 12) Animal é vacinado? () Sim () Não. Qual(is)? _____
- 13) Faz uso de alguma medicação? () Sim () Não. Qual(is)? _____

SINAIS CLÍNICOS:

- 1) Estado corporal: () Normal () Magro () Obeso
- 2) Comportamento: () Receptivo/carinhoso () Apático/ Quieto () Agressivo () Medo
- 3) Anorexia: () Sim () Não
- 4) Letargia/Depressão: () Sim () Não
- 5) Mucosas: () Normal () Hipocorada () Ictérica () Azulada
 - a. Intensidade: () Discreta () Moderada () Intensa
- 6) Frequência respiratória: _____ Frequência cardíaca: _____ Temperatura retal: _____
- 7) Turgor cutâneo
- 8) Linfonodos: () Normais () Aumentados _____
- 9) TPC:
- 10) Histórico de doenças e demais observações clínicas relevantes: _____

ANEXO - C:

