

INFEÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS FELINOS NUMA COLÓNIA DE GATOS ERRANTES DA ILHA DE FARO

FELINE HEMOTROPIC MYCOPLASMAS INFECTION IN A STRAY CATS' COLONY FROM FARO ISLAND

M. Alves Ferreira¹; M. Alves^{1,2}

¹ Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Campo Grande, 477 Lisboa, Portugal, ². CBIOS - Research Centre for Biosciences and Health Technologies – ULHT, Lisboa.

Abstract: Hemoplasmosis is a disease caused by ubiquitous bacterial agents, called hemotropic mycoplasmas, that infect erythrocytes of several mammals and are cause of hemolytic anemia. There are three species that may infect cats – *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” – presenting different degrees of pathogenicity. The present study aimed to determine, by molecular techniques, the presence of infection caused by these agents in a colony of 157 stray cats from Faro Island. DNA samples, isolated from peripheral blood of the tested animals, were submitted to PCR to amplify a 16S rDNA gene fragment of *Mycoplasma* spp.. PCR products were, then, submitted to restriction enzyme hydrolysis or DNA sequencing to identify the infecting species. In parallel, the studied population was categorized by age, sex and presence of ectoparasites; potential relationships between *Mycoplasma* spp. infection and epidemiological variables were also investigated. A percentage of 20.4% positive PCR results was obtained. The percentage for the different species was, in order of decreasing percentage: 7% for “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” single infection, followed by *Mycoplasma haemofelis* with 4.46% and “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” in 1.72% of samples. Mixed infection of *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” was found in 7.64% of the animals. Statistical analysis showed a significant association between *Mycoplasma* spp. infection and being male or adult. The present work contributed to increase the knowledge about hemotropic mycoplasmas infection in stray cats from Faro Island, not only in relation to their distribution and different infecting species, but also to its associated risk factors.

Keywords: Hemoplasmosis, *Mycoplasma* spp, PCR, Cat, Faro Island

1. INTRODUÇÃO

Os micoplasmas hemotrópicos, ou hemoplasmas, são bactérias não cultiváveis *in vitro*, pleomórficas, que infectam os eritrócitos, aderindo à sua superfície. Estes infectam vários mamíferos, podendo provocar-lhes anemias hemolíticas mais ou menos graves (Sykes, 2010). As espécies infectantes para o gato, inicialmente denominadas de *Eperythrozoon felis* ou *Haemobartonella felis*, consideradas como causa da Anemia Infeciosa Felina, passaram, com a emergência dos métodos moleculares, a ter a designação de micoplasmas (Small & Ristic, 1971; Neimark *et al.*, 2001; Sykes, 2010). Tal ficou a dever-se à análise da sequência dos genes que codificam a subunidade 16S do rRNA e respectiva análise filogenética (Neimark *et al.*, 2001; Neimark *et al.*, 2002; Tasker *et al.*, 2003a; Peters *et al.*, 2008; Sykes, 2010; Hicks *et al.*, 2014). Actualmente, considera-se que as principais espécies que infectam o gato são *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”. As duas últimas surgem, regra geral, em infecções secundárias, no caso de animais com doenças concomitantes ou imunossupressão.

“*Candidatus Mycoplasma turicensis*” aparece, com frequência, em co-infecção com as outras espécies. *Mycoplasma haemofelis* é responsável por grande parte das anemias hemolíticas primárias causadas por micoplasmas hemotrópicos, sendo considerada a mais patogénica (Willi *et al.*, 2006; Barker & Tasker, 2013). O modo de transmissão dos hemoplasmas felinos não se encontra, ainda, bem esclarecido, embora se pense que possa ocorrer, de forma indirecta, através da picada da pulga ou, directamente, através de actividades de luta e mordeduras.

Mycoplasma spp. apresenta distribuição ubíqua, com prevalências entre 8% e 46,7% (Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Tasker *et al.*, 2003b; Lobetti & Tasker, 2004; Luria *et al.*,

2004; Tasker *et al.*, 2004; Sykes *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2008; Gentilini *et al.*, 2009; Niblett *et al.*, 2009; Maher *et al.*, 2010; Niblett *et al.*, 2010; Tanahara *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013). Em Portugal, estes valores variam entre 27,1% e 43,44% (Martinez-Diaz *et al.*, 2013; Pais, 2013; Duarte *et al.*, 2014; Vicente, 2015). Os animais com hemoplasmosose apresentam, frequentemente, anemia, acompanhada de taquicardia e taquipneia, apatia, inapetência, desidratação, pirexia e palidez das mucosas (Tasker, 2006; Sykes, 2010; Tasker 2010). Inicialmente detectados por observação citológica em esfregaço de sangue, técnica pouco sensível, a detecção e identificação dos agentes é, hoje, feita com recurso à técnica de PCR, sendo este, actualmente, considerado o método de referência (Sykes, 2010, Messick & Harvey, 2011). Com o presente trabalho pretendeu-se, através de técnicas moleculares, avaliar a presença e a extensão da infecção pelas três principais espécies de micoplasmas hemotrópicos felinos, numa colónia de gatos errantes que habita a Ilha de Faro. Foi, ainda, intenção, identificar eventuais associações entre a infecção causada por estes agentes e algumas variáveis epidemiológicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

No âmbito de uma colaboração entre a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT) e a Associação “Change for Animals Foundation”, para uma campanha de esterilização de uma colónia de gatos errantes residente na Ilha de Faro, foi feita a recolha de sangue periférico a 157 gatos. A recolha das amostras de sangue foi realizada como parte dos procedimentos pré-cirúrgicos. O sangue foi colhido para tubos com EDTA e conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até à data de processamento. Para cada animal foram,

também, recolhidas informações sobre a idade, sexo e presença de ectoparasitas.

A extracção de DNA do sangue periférico foi realizada com recurso ao kit comercial “DNeasy® Blood & Tissue Kit” (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a avaliação da integridade física do DNA, por electroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), procedeu-se à amplificação de um fragmento de 177 pb do gene da beta-glucoronidase felina (*fGUSB*), através de uma técnica de PCR convencional, que permitiu avaliar a ausência de inibidores da reacção no DNA isolado. A mistura reaccional, num volume final de 25 µL, continha 10 picomol (pmol) de cada *primer* específico (Fw: GCGTTCCTTTTGCAGAGAG; Rev: GCTGTGGAAGTTGCCCTTA), 1× MyTaq™ Reaction Buffer (Bioline), 1 U de MyTaq™ DNA Polimerase (Bioline), 2 a 7 µL de gDNA e água desionizada estéril até perfazer o volume final. As condições de amplificação consistiram num passo inicial de desnaturação a 95 °C, durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C, durante 15 segundos, *annealing* a 55 °C, durante 15 segundos, e extensão a 72 °C, durante 15 segundos; a reacção terminou após uma extensão final a 72 °C, durante 7 minutos. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). Em todas as reacções de PCR, foi incluído um controlo negativo e um controlo positivo.

Para a detecção de DNA de *Mycoplasma* spp., foi efectuada uma reacção de PCR convencional, para amplificação de um fragmento do gene *16S rDNA* (Criado-Fornelio *et al.*, 2003). A mistura reaccional, num volume final de 25 µL, continha 10 pmol de cada *primer* específico (tabela 1), 1× MyTaq™ Reaction Buffer (Bioline), 1U de MyTaq™ DNA Polimerase (Bioline), 5 a 10 µL de DNA e água desionizada estéril

até perfazer o volume final. Os *primers* utilizados, descritos por Criado-Fornelio *et al.* (2003), são universais para *Mycoplasma* spp. (tabela 1). As condições da PCR consistiram num passo inicial de desnaturação a 94 °C, durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C, durante 30 segundos, *annealing* a 58 °C, durante 30 segundos, e extensão a 72 °C durante 48 segundos; a extensão final foi realizada a 72 °C, durante 5 minutos. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). Em todas as reacções foram incluídos, dois controlos negativos e um controlo positivo. Os produtos de PCR foram, posteriormente, submetidos a hidrólise com as enzimas de restrição *Xce* I, *EcoR* I e *Tai* I (Thermo Scientific), de forma a identificar a espécie de *Mycoplasma* presente nas amostras em estudo. Para cada uma das enzimas mencionadas, foi efectuada a reacção de hidrólise, de acordo com as instruções do fabricante. A visualização dos resultados foi feita submetendo os produtos de hidrólise a electroforese em gel de agarose a 3% (m/v). Os perfis de restrição para cada espécie são apresentados na tabela 2. Em quatro das amostras a identificação da espécie foi conseguida por sequenciação dos produtos de PCR. Para tal, efectuiu-se a purificação dos fragmentos amplificados, com recurso ao “JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit” (Genomed), e posterior envio para a empresa STABVida, onde foram submetidos a reacção de sequenciação pelo método de Sanger. As sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos, tendo sido obtidas sequências consenso que foram, depois, analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), para se determinar a espécie de micoplasma presente.

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados para amplificação do DNA de *Mycoplasma* spp. (Criado-Fornelio et al., 2003).

Sequência dos primers (5'-3')	Dimensão (pb)
Fw: ATACGGCCCATATTCCTACG	<i>Mycoplasma haemofelis</i> : 595 / “ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i> ”: 618
Rev: TGCTCCACCACTTGTTCA	

Tabela 2 – Perfis de restrição dos produtos de PCR para identificação da espécie de micoplasma (Adaptado de Criado-Fornelio et al., 2003).

Espécie	Dimensão dos fragmentos de restrição (pb)		
	Enzima <i>Xce</i> I	Enzima <i>EcoR</i> I	Enzima <i>Tai</i> I
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	298, 297	Ausência de hidrólise	Ausência de hidrólise
“ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i> ”	Ausência de hidrólise	271, 347	Ausência de hidrólise
“ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma turicensis</i> ”	593, 34 ou ausência de hidrólise	Ausência de hidrólise	507, 120

A análise estatística dos resultados foi efectuada com recurso aos programas Microsoft Office Excel 2007 e Statistical Package for Social Sciences (IBM, SPSS versão 22). Para além de uma análise descritiva, recorreu-se ao teste de chi-quadrado para averiguar a existência de associações entre um resultado positivo na PCR e as variáveis sexo, idade e presença de ectoparasitas.

3. RESULTADOS

A população estudada no presente trabalho era constituída por 157 gatos errantes, residentes na Ilha de Faro. Em algumas destas amostras o registo das variáveis epidemiológicas encontrava-se incompleto. Dos animais cujo sexo era conhecido, 50,4% (65/129) eram machos e 49,6% (64/129) eram fêmeas. De entre aqueles cuja idade era conhecida, 26,4% (33/125) eram juvenis,

com idade inferior a 1 ano, e 73,6% (92/125) eram adultos (1 < idade < 10 anos).

A reacção de PCR permitiu detectar DNA de *Mycoplasma* spp. em 20,4% (32/157) dos animais. Da totalidade de animais positivos para *Mycoplasma* spp., 73,1% eram machos e 26,9% fêmeas. Relativamente à idade, 4,3% dos animais infectados tinham menos de um ano e 95,7% eram adultos. Quanto à presença de ectoparasitas, foram observadas pulgas em 30,8% dos gatos com PCR positivo.

Não foram observadas carraças em nenhum animal.

Através da hidrólise com as enzimas de restrição *Xce* I, *EcoR* I e *Tai* I, foi possível identificar a espécie de hemoplasma em 87,5% (28/32) dos casos (figura 1). A sequenciação permitiu a identificação da espécie dos restantes 12,5% (4/32) isolados. Para o total das 157 amostras em estudo, as frequências de cada espécie de micoplasma identificada encontram-se descritas na tabela 3. A análise estatística evidenciou uma associação significativa entre as variáveis infecção por *Mycoplasma* spp. e sexo, com

um maior número de machos infectados ($p = 0,008$). Foi, também, observada uma relação estatisticamente significativa entre a infecção e a idade, com os gatos adultos ($1 < \text{idade} < 10$ anos) a evidenciarem maior frequência de infecção ($p = 0,004$). Não foi encontrada relação entre um resultado positivo na PCR para *Mycoplasma* spp. e a variável presença de pulgas ($p = 0,435$)

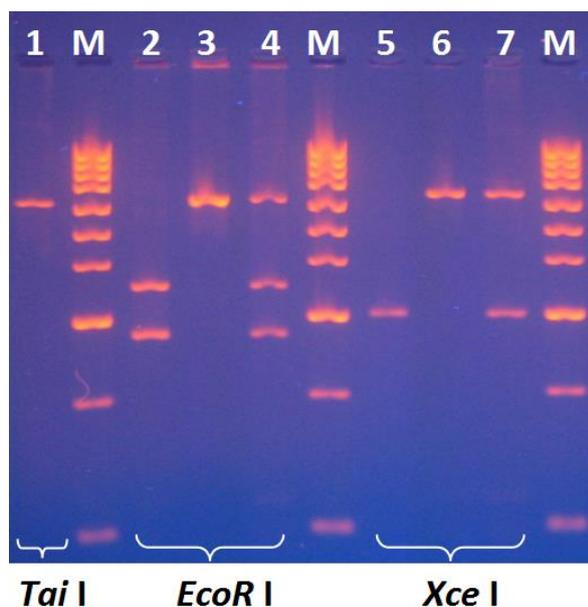


Figura 1 – Gel de agarose a 3% (m/v) após electroforese dos fragmentos de restrição pelas endonucleases *Tai* I, *EcoR* I e *Xce* I. 1 – ausência de hidrólise, 2 – “*Candidatus M. haemominutum*”, 3 – *M. haemofelis*, 4 – “*Candidatus M. haemominutum*” + *M. haemofelis*, 5 – *M. haemofelis*, 6 – “*Candidatus M. haemominutum*”, 7 – *M. haemofelis* + “*Candidatus M. haemominutum*”. M – Marcador de pesos moleculares Hypperladder IV (Bioline).

4. DISCUSSÃO

Dada a natureza ubiqüitária dos micoplasmas hemotrópicos e a diferença de patogenicidade associada às suas diferentes espécies, reveste-se de grande importância a identificação das espécies causadoras de infecção.

No presente trabalho, a infecção por *Mycoplasma* spp. foi encontrada em 20,4% das amostras analisadas, valor inferior ao

encontrado por Martinez-Diaz e colaboradores (2013) em gatos no Centro e Norte de Portugal (43,43%), mas próximo do encontrado por Duarte e colaboradores (2014) no Centro e Sul do País (27,1%). A percentagem de micoplasmas hemotrópicos do presente estudo é semelhante à encontrada em vários países da Europa (Tasker *et al.*, 2003b; Bauer *et al.*, 2008; Gentilini *et al.*, 2009; Maher *et al.*, 2010), Estados Unidos da América (Sykes *et al.*, 2007) e Japão (Tanahara *et al.*, 2010). No Canadá, África do Sul e Japão foram descritos valores entre 38% e 58,3% (Kewish *et al.*, 2004; Lobetti & Tasker, 2004; Fujihara *et al.*, 2007). Relativamente à distribuição das várias espécies, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” foi a espécie de hemoplasma mais prevalente em infecção única, com uma frequência de 7%. *Mycoplasma haemofelis* foi a segunda espécie mais identificada, com uma frequência de 4,5%. A espécie “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” foi detectada em 1,3% das amostras estudadas (tabela 3). A percentagem total de infecção por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” do presente estudo (14,6%) é bastante inferior à encontrada no estudo de Martinez-Diaz *et al.* (2013) (61,8 %) e um pouco inferior à de Duarte *et al.* (2014) (17,8%). A percentagem total de *Mycoplasma haemofelis* (12,1%) é ligeiramente inferior à encontrada nos dois estudos supracitados (14,1% e 14,4 %, respectivamente), sendo, também, inferior à descrita por Pais (2013) (20,7%). É, ainda, bastante inferior à encontrada num estudo efectuado em Portugal, em animais atendidos num hospital veterinário na Parede (69,7%), mas que apresentava uma amostra reduzida e, unicamente, animais com suspeita de infecção (Vicente, 2015). No presente estudo foi encontrada infecção mista por *Mycoplasma haemofelis* e por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” em 7,6% das amostras (tabela 3). Esta percentagem é muito inferior à descrita nos dois principais artigos sobre hemoplasmose no País, anteriormente referidos. As diferenças encontradas podem ser explicadas pelas características

epidemiológicas distintas das populações estudadas, heterogeneidade na dimensão das amostras e populações, devido a amostragens de conveniência, diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas e diferentes critérios de inclusão.

A Ilha de Faro, uma península natural de pequenas dimensões, acessível apenas por uma estreita passagem a partir de terra, constitui um habitat isolado e apresenta um clima de tipo mediterrânico. A colónia de gatos errantes residente na Ilha de Faro encontra-se isolada, não se verificando a entrada de animais do exterior. Fora da época de Verão (única altura em que se verificam grandes movimentações de turistas), a alimentação disponível é escassa dependendo, essencialmente, do que é disponibilizado aos animais pela comunidade local de pescadores (A Voz do Algarve, 2014; Mendonça, 2014). Numa população de gatos com estas características, poderia ser expectável uma taxa de infecção por *Mycoplasma* spp. superior. Este cenário, contudo, não se confirmou, o que poderá, eventualmente, ficar a dever-se: i) ao facto de a colheita das amostras ter coincidido com o

população ter atingido um nível de equilíbrio, uma vez que, não existindo migração natural de novos animais, poderão existir hierarquias bem estabelecidas e menos casos de lutas entre animais. A estas razões pode, ainda, juntar-se o desconhecimento sobre a distribuição de ectoparasitas, como pulgas e carraças, apontadas, por alguns autores, como potenciais vectores da hemoplasmose.

No presente trabalho foram pesquisadas associações entre a hemoplasmose e as variáveis sexo, idade e presença de ectoparasitas. Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa com o ser macho e a infecção, o que está de acordo com vários autores (Tasker *et al.*, 2003b, 2004; Willi *et al.*, 2006a; Bauer *et al.*, 2008; Roura *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013). Foi, também, observada uma associação significativa entre a presença de infecção e o ser adulto, mesmo com uma amostra não equitativa, onde existiam mais adultos do que juvenis. Trata-se de um achado que vai ao encontro do descrito por vários autores (Tasker *et al.*, 2003b, 2004; Maher *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013). Estes descrevem um aumento

Tabela 3 – Frequências das diferentes espécies de hemoplasma encontradas, em infecção única e em co-infecção.

Espécie de <i>Mycoplasma</i>	Frequência	
	Absoluta (n = 157)	Relativa (%)
<i>Mycoplasma haemofelis</i> (Co + IU)	19	12,1
<i>Mycoplasma haemofelis</i> (IU)	7	4,5
Mhf + CMhm	12	7,6
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ” (Co + IU)	23	14,6
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ” (IU)	11	7,0
“ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ” (IU)	2	1,3

Co – co-infecção, IU – infecção única, Mhf – *Mycoplasma haemofelis*, CMhm – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”.

fim da época balnear, altura em que os animais se encontram melhor nutridos e com o sistema imunitário mais competente para lidar com a infecção e ii) a possibilidade de a

progressivo da doença com a idade, possivelmente em consequência do aumento da exposição ao longo da vida e do facto de animais com mais idade poderem exibir um

sistema imunitário menos competente e menos eficaz para lidar com infecções.

O presente trabalho reveste-se de grande importância devido ao escasso número de estudos sobre esta temática efectuados em Portugal. Além disso, a Ilha de Faro nunca havia sido alvo de um estudo semelhante. O isolamento geográfico da região estudada torna-a, ainda, um excelente modelo para estudos epidemiológicos.

5. CONCLUSÕES

O estudo dos micoplasmas hemotrópicos felinos é importante, porquanto se trata de agentes ubiqüitários e com prevalências relativamente elevadas. A sua relevância clínica pode ser de difícil avaliação, pois nem todos os animais em que são detectados os agentes estão, efectivamente, doentes. Esta relevância vai depender de vários factores, que deverão ser analisados de forma atenta, nomeadamente a espécie de hemoplasma, a bacteriemia, a presença em simultâneo de diferentes espécies e a condição imunitária do animal. Estas bactérias são, geralmente, consideradas de patogenicidade reduzida, com excepção de *Mycoplasma haemofelis*, que parece causar anemias hemolíticas mais graves e, potencialmente, fatais. No presente trabalho foi possível identificar, não só a presença de micoplasmas hemotrópicos em 20,4% da população estudada, como identificar a espécie de todos os isolados. A espécie detectada em maior percentagem foi “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, seguido de *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, o que está de acordo com a literatura. Foi, também, observada uma relação estatisticamente significativa entre ser macho ou ser adulto e a infecção com micoplasmas hemotrópicos, o que vai ao encontro do descrito na literatura. O trabalho desenvolvido contribuiu para um enriquecimento do conhecimento sobre a distribuição da infecção por micoplasmas hemotrópicos e respectivas espécies em Portugal, em particular, numa região nunca antes alvo de um estudo semelhante.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração da “Change for Animals Foundation”, da Animais de Rua, da Câmara Municipal de Faro, dos docentes Carla Maia e Pedro Faisca e estudantes (A. Pereira, A. Radar, D. Gouveia, F. Costa, M. Caldas, M. Freitas e N. França) da FMV-ULHT, sem a qual não teria sido possível a realização do presente trabalho. Agradecemos, ainda, o apoio prestado pela Professora Doutora Inês Viegas.

REFERÊNCIAS

- A Voz do Algarve (2014). Península do Ancão (Praia de Faro) – Projecto de Controlo Populacional de Animais Errantes. Acedido a 20 de Janeiro de 2019 em <http://www.avozdoalgarve.pt/detalhe.php?id=4221>
- Barker, E., & Tasker, S. (2013). Haemoplasmas: Lessons learnt from cats. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(4), 184-192.
- Bauer, N., Balzer, H., Thüre, S., & Moritz, A. (2008). Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 10(3), 252-258.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, 93(4), 307-317
- Duarte, A., Marques, V., Correia, J. H., Neto, I., Bráz, B. S., Rodrigues, C., Martins, T., *et al.* (2014). Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 17(6), 516-522.
- Fujihara, M., Watanabe, M., Yamada, T., Harasawa, R., *et al.* (2007). Occurrence of *Candidatus Mycoplasma turicensis* Infection in Domestic Cats in Japan. *Journal of*

- Veterinary Medical Science*, 69(10), 1061-1063.
- Gentilini, F., Novacco, M., Turba, M. E., Willi, B., Bacci, M. L., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11(4), 277-285
- Georges, K., Ezeokoli, C., Auguste, T., Seepersad, N., Pottinger, A., Sparagano, O., & Tasker, S. (2012). A comparison of real-time PCR and reverse line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 103.
- Hicks, C., Barker, E., Brady, C., Stokes, C., Helps, C., & Tasker, S. (2014). Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: New insights into haemoplasma taxonomy. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 99-105.
- Jenkins, K. S., Dittmer, K. E., Marshall, J. C., & Tasker, S. (2013). Prevalence and risk factor analysis of feline haemoplasma infection in New Zealand domestic cats using a real-time PCR assay. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 15(12), 1063-1069.
- Kewish, K. E., Appleyard, G. D., Myers, S. L., Kidney, B. A., & Jackson, M. L. (2004). *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. *Canadian Veterinary Journal*, 45(9), 749-752.
- Lobetti, R., & Tasker, S. (2004). Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *Journal of the South African Veterinary Association*, 75(2), 94-99.
- Luria, B. J., Levy, J. K., Lappin, M. R., Breitschwerdt, E. B., Legendre, A. M., Hernandez, J. A., Gorman, S. P., *et al.* (2004). Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6(5), 287-296.
- Maher, I. E., Tasker, S., Polizopoulou, Z., Dasopoulou, A., Egan, K., Helps, C. R., & Papasouliotis, K. (2010). Polymerase chain reaction survey of feline haemoplasma infections in Greece. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12(8), 601-605.
- Martinez-Diaz, V. L., Silvestre-Ferreira, A. C., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O., & Altet, L. (2013). Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 15(10), 879-885.
- Mendonça, S. (2014). Associação Animais de Rua esterilizou 161 dos 230 gatos errantes da ilha de Faro. Folha de Domingo, 31 Outubro. Acedido a 20 de Janeiro de 2019 em <https://folhadodomingo.pt/associacao-animais-de-rua-esterilizou-161-dos-230-gatos-errantes-da-ilha-de-faro/>
- Messick, J.B. & Harvey, J. W. (2011). Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) in *Greene - Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4th ed., pp. 310 - 319): Elsevier/Saunders.
- Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 891-899.
- Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2002). Revision of haemotropic *Mycoplasma* species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 683.
- Nibblett, B.M.D., Waldner, C., Taylor, S.M., Jackson, M.L., & Knorr, L.M. (2009). Anemia in cats with hemotropic mycoplasma infection: Retrospective evaluation of 23 cases (1996-2005). *Canadian Veterinary Journal*, 50(11): 1181-1185.

- Nibblett, B.M.D., Waldner, C., Taylor, S.M., Jackson, M.L., Knorr, L.M. & Snead, E.C., (2010). Hemotropic mycoplasma prevalence in shelter and client-owned cats in Saskatchewan and a comparison of polymerase chain reaction (PCR) — Results from two independent laboratories. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 74(2), 91-96.
- Pais, A. C. (2013). *Prevalência de base hospitalar de Mycoplasma haemofelis tendo por base um hospital veterinário na cova da piedade – Almada* (Dissertação de Mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias). Acedido a 20 de Janeiro de 2019 em <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/5347/Preval%C3%Aancia%20de%20Mhf.pdf?sequence=1>
- Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M., *et al.* (2008). RNase P RNA Gene (rnpB) Phylogeny of Hemoplasmas and Other Mycoplasma Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1873-1877.
- Roura, X., Peters, I. R., Altet, L., Tabar, M.-D., Barker, E. N., Planellas, M., Helps, C. R., *et al.* (2010). Prevalence of Hemotropic Mycoplasmas in Healthy and Unhealthy Cats and Dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(2), 270-274.
- Small, E., & Ristic, M. (1971). Haemobartonellosis. *Veterinary Clinics of North America*, 1, 225-230.
- Sykes, J. E., Drazenovich, N. L., Ball, L. M., & Leutenegger, C. M. (2007). Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 685-693.
- Sykes, J. E. (2010). Feline hemotropic mycoplasmas. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1157-1170.
- Tanahara, M., Miyamoto, S., Nishio, T., Yoshii, Y., Sakuma, M., Sakata, Y., Nishigaki, K., *et al.* (2010). An epidemiological survey of feline hemoplasma infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(12), 1575-1581.
- Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Harbour, D. A., Shaw, S. E., Harrus, S., Baneth, G., *et al.* (2003a). Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: an International Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3877-3880.
- Tasker, S., Binns, S. H., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., Harbour, D. A., Helps, C. R., Jensen, W., *et al.* (2003b). Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 152(7), 193-198.
- Tasker, S., Braddock, J. A., Baral, R., Helps, C. R., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., & Malik, R. (2004). Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6(6), 345-354.
- Tasker, S. (2006). Current concepts in feline haemobartonellosis. *In Practice*, 28(3), 136-141.
- Tasker, S. (2010). Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12(5), 369-381.
- Vicente, A. R. A. (2015). *Caracterização clínica e laboratorial de gatos considerados suspeitos de Mycoplasma haemofelis* (Dissertação de Mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias). Acedido a 20 de Janeiro de 2019 em <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/7091/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Ana%20Vicente.pdf?sequence=1>.
- Willi, B., Boretti, F. S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M. L., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R., *et al.* (2006). Prevalence, Risk Factor Analysis, and Follow-Up of Infections Caused by Three Feline Hemoplasma Species in Cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 961-969.

