

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Presença do *Mycoplasma haemocanis* (hemoplasma hemotrópico) em concentrado de eritrócitos canino e sua interferência no metabolismo eritrocitário

Autor: Mónica Alejandra Camargo Castillo

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Presença do *Mycoplasma haemocanis* (hemoplasma hemotrópico) em concentrado de eritrócitos canino e sua interferência no metabolismo eritrocitário

Autor: Mónica Alejandra Camargo Castillo

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS como requisito parcial da obtenção do título de Mestre

Orientador: Félix González

PORTO ALEGRE

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Camargo Castillo, Monica Alejandra
Presença do Mycoplasma haemocanis (hemoplasma hemotrópico) em concentrado de eritrócitos canino e sua interferência no metabolismo eritrocitário / Monica Alejandra Camargo Castillo. -- 2020.
52 f.
Orientador: Felix H González.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. hemoplasma. 2. hemocomponente. 3. lesão de armazenamento. 4. transfusão. 5. cão. I. González, Felix H, orient. II. Título.

Monica Alejandra Camargo Castillo

**PRESENÇA DO *Mycoplasma haemocanis* (HEMOPLASMA HEMOTRÓPICO) EM
CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO E SUA INTERFERÊNCIA NO
METABOLISMO ERITROCITÁRIO**

Aprovada em 31 de março de 2020

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix González – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Orientador e Presidente da Comissão Avaliadora

Prof. Dra. Raqueli França - Universidade Federal de Pelotas
Membro da Comissão Avaliadora

Dra. Aline Girotto Soares - Laboratório Zelle
Membro da Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Membro da Comissão Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde, pela oportunidade de estar aqui e por me guiar e iluminar no meu caminho obsequiando-me inumeráveis bençãos.

Agradeço ao Professor Félix e à Professora Stella pela oportunidade, pelo apoio e tempo dedicado, por suas orientações e por disponibilizar os recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

A minha mãe, meu pai e minha irmã por seu amor, guia e apoio incondicional, são meu exemplo de vida, de luta, honestidade e responsabilidade. Pensar em vocês me dá a certeza de que tudo vale a pena e me dá a força para continuar. A toda minha família pelo apoio e carinho sempre.

Ao César por seu amor, pela paciência, compreensão, apoio, ajuda, força e incentivo em todos os momentos. Obrigada por transformar minha vida, por colaborar na realização de meus sonhos, pelo exemplo de dedicação, perseverança e força. Te amo e te admiro muito.

Ao Bruno e à Daiani que estiveram sempre presentes no desenvolvimento desse trabalho, por toda a ajuda, paciência, auxílio, ensinamentos, carinho e incentivo em todas as horas. Ao Felipe pela ajuda e compreensão sempre que precisei. Às minhas colegas de mestrado Laura e Stephanie pela disposição e ajuda. A toda a equipe do LACVET, residentes, estagiários e técnicos por seu apoio e por fazer desses dois anos uma grande experiência de aprendizado, sou eternamente grata pelo carinho e conhecimentos transmitidos.

Ao professor João Fábio e a toda a equipe do Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet), pelos ensinamentos, pelo tempo dedicado e pela disposição para me ajudar.

À Naila, Lucia, Bárbara, Nathalia e Marina pela amizade, ensinamentos, conselhos e carinho durante todo o caminho.

Agradeço a minha amiga Xiomara pela amizade, pelo carinho e incentivo sempre.

E a todas as demais pessoas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

PRESENÇA DO *Mycoplasma haemocanis* (HEMOPLASMA HEMOTRÓPICO) EM CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO E SUA INTERFERÊNCIA NO METABOLISMO ERITROCITÁRIO

Autor: Mónica Alejandra Camargo Castillo

Orientador: Félix González

RESUMO

A medicina veterinária transfusional desempenha um papel importante na estabilização do paciente crítico. Infelizmente, patógenos como *Mycoplasma haemocanis*, uma bactéria pleomórfica, pode estar presente no sangue do doador e serem transmitidos na transfusão. Os mycoplasmas hemotrópicos podem causar doença subclínica, onde portadores assintomáticos podem ser identificados como doadores de sangue saudáveis, aumentando o risco de infecção iatrogênica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos canino, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), correlacionando-se com o metabolismo eritrocitário durante o armazenamento. Foram selecionados oito cães negativos (Grupo Controle) e oito positivos (Grupo Mycoplasma) para *M. haemocanis*, previamente confirmados pela técnica de qPCR, clinicamente saudáveis, que atendiam aos critérios de inclusão como doadores. Uma bolsa de sangue (390 a 450 mL) contendo 63 mL de CPDA-1 foi coletada de cada animal selecionado e centrifugadas para obter o concentrado de eritrócitos. Alíquotas do concentrado de eritrócitos nos dias 1, 7, 18 e 29 durante o armazenamento a 4°C foram analisadas por qPCR para determinar a presença de *M. haemocanis* e foi padronizado o número de cópias/ μL de sangue, usando um controle interno sintético. Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros pH, bicarbonato (HCO_3^-), potássio (K^+), sódio (Na^+), cloro (Cl^-), glicose, lactato e amônia. Os dados foram analisados por ANOVA entre os grupos Controle e Mycoplasma e correlação de Pearson para determinar as interações entre as variáveis. *M. haemocanis* foi detectado em concentrado de eritrócitos nos dias 1, 7, 18 e 29 de armazenamento. Diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre os grupos foram observadas ao longo do período de armazenamento. Não foram identificadas correlações entre o número de cópias/ μL de *M. haemocanis* e os parâmetros bioquímicos avaliados. Mais estudos são necessários para avaliar o potencial de infecção de *M. haemocanis*. No entanto, os dados do presente estudo são uma grande contribuição, demonstrando o risco de transmissão a traves da transfusão de concentrado de eritrócitos.

Palavras chave: hemoplasma, hemocomponente, lesão de armazenamento, transfusão, cão.

**PRESENCE OF *Mycoplasma haemocanis* (HEMOTROPIC MYCOPLASMA) IN
STORED CANINE ERYTHROCYTE CONCENTRATE AND ITS CORRELATION
WITH ERYTHROCYTE METABOLISM**

Author: Mónica Alejandra Camargo Castillo

Advisor: Félix González

ABSTRACT

Veterinary transfusion medicine plays an important role in stabilizing the critically ill patient. Unfortunately, pathogens such as *Mycoplasma haemocanis* may be present in the donor's blood and be transmitted during the transfusion. Haemotropic mycoplasmas can cause subclinical disease, where asymptomatic carriers can be identified as healthy blood donors, increasing the risk of iatrogenic infection. The aim of this work was evaluating the survival of *M. haemocanis* in canine packed red blood cell, using the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technique, correlating with erythrocyte metabolism. Eight negative (Control group) and eight positive (Mycoplasma group) dogs for *M. haemocanis*, previously confirmed by qPCR, clinically healthy, which met the inclusion criteria as blood donors were selected. Blood transfusion bags (390 to 450 mL) containing 63 mL of CPDA-1 were collected from the selected animals and centrifuged to obtain packed red blood cells. Sampling were performed on days 1, 7, 18 and 29 during storage at 4°C and samples were analyzed by qPCR for determinate the presence of *M. haemocanis*. Log copy number/ μ L blood in real-time PCR assay was standardize using a synthetic gene as internal control. The parameters evaluated included pH, bicarbonate (HCO_3^-), potassium (K^+), sodium (Na^+), chlorine (Cl^-), glucose, lactate and ammonia. Statistical analyzes were performed using the SAS 9.4 software by ANOVA between the negative and *M. haemocanis* positive groups, and finally a Pearson correlation were made to determine interactions between variables. *M. haemocanis* was detected in pRBC on days 1, 7, 18 and 29 of storage. Significant differences in biochemical parameters between the pRBC control and Mycoplasma group were observed over the course of storage. Correlations analysis were not identified between qPCR copy number/ μ L and biochemical parameters evaluated. Further studies are needed to assess the potential for *M. haemocanis* infection. However, the data from the present study are an important contribution, demonstrating the risk of transmission through the transfusion of canine packed red blood cell.

Keywords: hemoplasma, hemocomponent, storage lesion, transfusion, dog.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Metabolismo do eritrócito (Modificado de KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016) 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3-diphosphoglycerate/2,3 difosfoglicerato
ACDA	Acid citrate dextrose adenosine/Citrato ácido dextrose e adenosina
ATP	Adenosine triphosphate/Adenosina trifosfato
CPD	Citrate phosphate dextrose/Citrato fosfato dextrose
CPDA-1	Citrate phosphate dextrose adenine/Citrato, fosfato, dextrose e adenina
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate/Bicarbonato
HGB	Hemoglobin/Hemoglobina
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide/Nicotinamida adenina dinucleotídeo
pRBC	Packed red blood cell/Concentrado de eritrócitos
PCV	Packed Cell Volume/hematócrito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Eritrócitos	12
2.1.1	Hemoglobina	13
2.1.2	Metabolismo do eritrócito	13
2.2	Concentrado de eritrócitos	15
2.3	Lesões de armazenamento	16
2.4	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	17
2.4.1	Prevalência	17
2.4.2	Transmissão.....	18
2.4.3	Fisiopatologia.....	18
2.4.4	Sinais clínicos.....	18
2.4.5	Alterações laboratoriais.....	19
2.4.6	Diagnóstico	19
2.4.7	Tratamento	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A medicina transfusional na medicina veterinária tem um papel importante na estabilização do paciente crítico. Com a implementação de transfusões como terapia de suporte, foram estabelecidos bancos de sangue veterinários para suprir a demanda das clínicas e realizar coletas, armazenamento e processamento adequados de hemocomponentes como o concentrado de eritrócitos (YAGI; HOLOWAYCHUK, 2016). Nos processos de transfusão de produtos sanguíneos podem se apresentar respostas indesejadas como reações imunomediadas e transferência de patógenos presentes no sangue do doador, agravando potencialmente a condição do paciente receptor transfundido. Portanto, os doadores de sangue devem ser adequadamente selecionados e testados como livres de agentes infecciosos, o que pode ser difícil devido às limitações laboratoriais, logísticas e de custos (WARDROP *et al.*, 2016).

Em 2016, o *American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)* atualizou a lista dos patógenos potencialmente infectantes que podem ser transmitidos nas transfusões sanguíneas de cães, dentre dos quais se incluem: *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Leishmania spp.*, *hemoplasmas*, *Hepatozoon spp.*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia felis*, *Trypanosoma cruzi* e *Brucella canis* (WARDROP *et al.*, 2016). Um deles, o *Mycoplasma haemocanis* é um organismo epicelular dos eritrócitos (WARDROP *et al.*, 2005), que pode causar doença subclínica, de forma que os animais assintomáticos podem ser identificados como doadores de sangue saudáveis e permanecer como portadores crônicos meses ou anos, mesmo tratados com antibióticos, aumentando o risco de infecção iatrogênica (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007a).

Devido às suas características metabólicas, *M. haemocanis* ainda não foi isolado com sucesso e o diagnóstico é limitado por falta de disponibilidade de testes sorológicos (HII *et al.*, 2015). Por esta razão, sua detecção é embasada na visualização em esfregaços sanguíneos que é pouco sensível e por técnicas moleculares como a PCR, considerada padrão ouro (WARDROP *et al.*, 2016).

Gary *et al.* (2006) demonstraram em felinos que *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ são detectáveis após o armazenamento do sangue com CPDA-1 (citrato fosfato dextrose adenina) por uma hora e uma semana, respectivamente. Esse estudo ainda enfatizou a importância do uso da PCR para a identificação de patógenos em doadores de sangue. No entanto, a sobrevivência do *M. haemocanis* após o armazenamento de sangue ou

hemocomponentes caninos com CPDA-1 não tem sido avaliada, sendo de grande importância, já que este patógeno depende do metabolismo do eritrócito para sobreviver e as transfusões podem ser um meio de transmissão entre os cães.

Atualmente, desconhece-se a relação entre o tempo de armazenamento de hemocomponentes como o concentrado de eritrócitos, o uso da solução conservante (CPDA-1), metabolismo da hemácia e sobrevivência de hemoplasmas no sangue armazenado para transfusão em cães, gerando a necessidade de estudar e entender os processos e alterações celulares no armazenamento, com a finalidade de diminuir o risco de infecção para os receptores e garantir a qualidade dos hemocomponentes para transfusão (WARDROP *et al.*, 2016). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a presença do *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos canino correlacionando-o com alterações no metabolismo do eritrócito durante o armazenamento. Esses dados irão colaborar para estudos futuros que visam determinar o potencial infectante em receptores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Eritrócitos

Na espécie canina, as hemácias possuem 7 μm de diâmetro com 1,5 a 2,0 μm de largura, com uma vida média de 115 dias (SHALM; WILLIAM, 2010). As hemácias são células bicôncavas, sem núcleo ou demais organelas, o que impossibilita a síntese de ácidos nucleicos ou proteínas. A perda da mitocôndria durante a maturação resulta na perda da capacidade de realizar o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa (SHALM; WILLIAM, 2010).

A função primária da hemácia é o transporte de oxigênio, dos pulmões aos tecidos e de dióxido de carbono dos tecidos aos pulmões. A forma de disco bicôncavo é eficiente para a troca de oxigênio, e permite que a célula seja deformável e maleável para movimentar-se através da vasculatura (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

A membrana da hemácia consiste em uma bicamada lipídica que contém fosfolípidos, proteínas, colesterol, glicoproteínas e glicolípidos. Alterações na composição lipídica (principalmente fosfolípidos e colesterol) e proteínas da membrana pode resultar em formas anormais, comprometendo o citoesqueleto e a integridade da célula (SHALM; WILLIAM, 2010).

Estruturalmente, o citoesqueleto da hemácia está composto pela proteína espectrina, formando complexos com anquirina, actina e proteína banda 4.1 desde a membrana lipídica dando suporte e estabilidade. Os complexos de espectrina dependem da disponibilidade de ATP para funcionar adequadamente. Por tanto, a funcionalidade da hemácia depende da oferta de ATP e o dano oxidativo pode levar à perda da maleabilidade (HARRIS, 1990; MURADOR; DEFFUNE, 2007).

A membrana celular da hemácia apresenta uma distribuição assimétrica de fosfolípidos, com alto conteúdo de glicoproteínas como as glicoforinas (MURADOR; DEFFUNE, 2007). A proteína integral trans-membranal mais abundante das hemácias é a banda 3, e sua principal função é mediar a troca de cloro e ânions de bicarbonato através da membrana plasmática. A banda 3 contém sítios de ligação para proteínas do citoesqueleto e enzimas glicolíticas, desempenhando um papel na remoção de eritrócitos senescentes (HARRIS, 1990). A segunda proteína integral mais abundante na membrana é a sialoglicoproteína glicoforina A

(GPA). A GPA apresenta alto conteúdo de ácido siálico, portanto, fornece uma rede de carga negativa na superfície da membrana da hemácia para reduzir a interação célula-célula e prevenir sua aglutinação (HARRIS, 1990; MURADOR; DEFFUNE, 2007).

Água e ânions, como cloro (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-), fluem livremente através da membrana das hemácias. Acredita-se que isso ocorra por meio de canais de troca aniônica. Os cátions, no entanto, como sódio (Na^+) (extracelular em maior proporção) e potássio (K^+) (intracelular em maior proporção), na hemácia são controlados com bombas Na^+/K^+ dependentes de ATP. A concentração de cálcio (Ca^{2+}) também é controlada por bombas Ca^{2+} -dependentes de ATP (HARRIS, 1990).

2.1.1 Hemoglobina

A hemoglobina é 95% do peso seco e 35% do volume da hemácia. A hemoglobina é composta por duas cadeias de globina alfa (α) e duas de globulina beta (β), cada uma contendo um grupo heme que está composto por quatro anéis pirrólicos, com um núcleo de ferro em seu interior. O átomo de ferro no grupo heme liga-se aos quatro nitrogênios no centro do anel protoporfirínico, formando uma bolsa hidrofóbica na estrutura da molécula de globina, que protege da oxidação do ferro ferroso (Fe^{2+}) a férrico (Fe^{3+}). (HARRIS, 1990; SHALM; WILLIAM, 2010).

2.1.2 Metabolismo do eritrócito

Para fornecer energia, os eritrócitos dependem de duas vias metabólicas, via das pentoses-fosfato e a via da glicólise anaeróbica. Na via das pentoses-fosfato, é metabolizada cerca de 10% da glicose. A primeira enzima desta via é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que desvia glicose-6-fosfato (G6P) para ribose-5 fosfato. No processo, o nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP) é convertido em sua forma reduzida (NADPH), substrato utilizado para reduzir a glutatona pela enzima glutatona redutase. A G6PDH fornece o único meio de gerar NADPH e reduzir a glutatona; na ausência dela, os eritrócitos são vulneráveis a danos oxidativos (KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016) (Figura 1).

Da glicose que entra na hemácia, 90% é metabolizada por via anaeróbia ou via Embden-Meyerhof, a qual produz dois ATP por cada molécula de glicose, sendo a única via de ATP

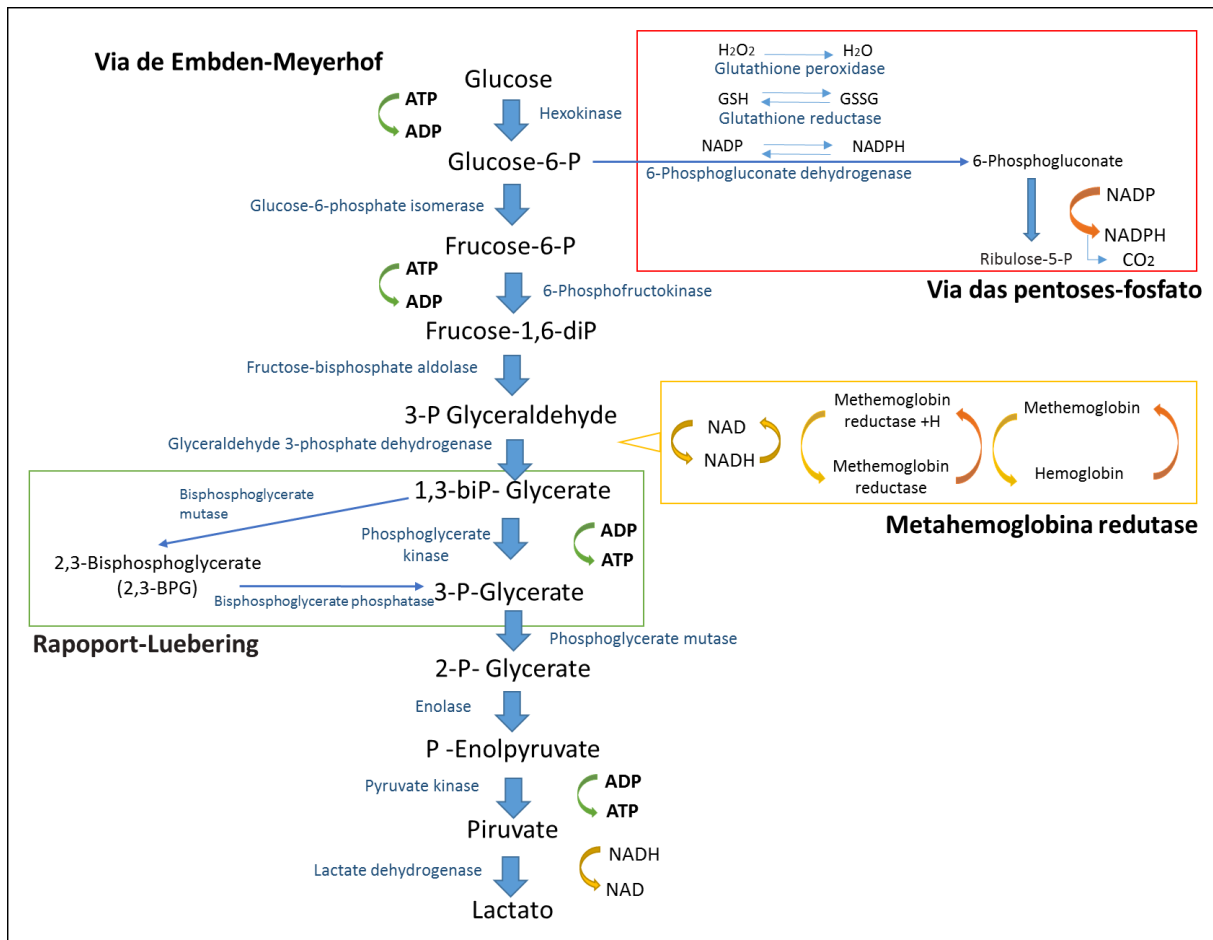


Figura 1 - Metabolismo do eritrócito (Modificado de KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016)

utilizável na célula. Por outro lado, a via Embden-Meyerhof, também gera nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), molécula necessária para reduzir a meta-hemoglobina para hemoglobina. Nesta via, o gliceraldeído-3-P (G3P) é oxidado a 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) através da ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD). O 1,3-DPG é desfosforilado pela fosfoglicerato quinase, que gera duas moléculas de ATP e 3-fosfoglicerato (3-PG). Posteriormente o 3-PG é isomerizado pela fosfoglicerato mutase a 2-fosfoglicerato (2-PG). A enzima enolase converte então o 2-PG em fosfoenolpiruvato (PEP), a piruvato quinase (PK) separa os fosfatos, formando piruvato e liberando duas moléculas de ATP. O piruvato torna-se lactato, um substrato da ação da lactato desidrogenase, com a regeneração da forma oxidada da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) (HESS, 2010; KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016). Dentro desta via, ocorre a derivação Rapoport-Luebering onde o 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) é desviado pela difosfoglicerato mutase para formar 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), deixando de produzir duas moléculas de ATP. O 2,3-DPG regula a liberação de oxigênio para os tecidos, através da

competição pelo sítio de ligação do oxigênio na hemoglobina, que ocorre quando o 2,3-DPG se liga ao grupo heme da hemoglobina. A degradação de 2,3-DPG a 3-fosfoglicerato (3-PG) é catalisada pela atividade da difosfoglicerato fosfatase, onde é formado 2-fosfoglicerato (2-PG). pela ação da difosfoglicerato mutase (KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016) (Figura 1).

Aproximadamente 3% da hemoglobina contida nos eritrócitos é oxidada a meta-hemoglobina e, através da enzima citocromo-b5-redutase (Cb5R) é constantemente reduzida a hemoglobina novamente. Para isso, os elétrons da NADH, gerados na glicólise, retornam o ferro férrico (Fe^{3+}) ao seu estado ferroso (Fe^{2+}) para unir-se ao oxigênio (SHALM; WILLIAM, 2010; KEOHANE; SMITH; WALENGA, 2016).

2.2 Concentrado de eritrócitos

O aumento da demanda de produtos sanguíneos na medicina veterinária, levou à separação dos componentes do sangue para proporcionar um uso mais específico e eficiente, evitando os riscos de fornecer partes desnecessárias do sangue (LOGAN *et al.*, 2001). Para a obtenção do concentrado de eritrócitos, o sangue total é centrifugado e o plasma sobrenadante é removido. O concentrado de eritrócitos, o qual também contém leucócitos, plaquetas, plasma remanescente e anticoagulante, é um dos componentes sanguíneos mais utilizado na clínica de pequenos animais (KISIELEWICZ; SELF; BELL, 2014).

Dependendo do anticoagulante, das soluções aditivas usadas e das condições do banco de sangue, o concentrado de eritrócitos pode ser armazenado entre 35 a 42 dias, a uma temperatura entre 1 e 6°C (PRITTIE, 2003; PATTERSON *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2017). O armazenamento desse hemocomponente deve ser constantemente monitorado, para avaliar a qualidade das bolsas de sangue, devido a ocorrência de fatores limitantes que podem se apresentar como a hemólise, a qual pode interferir na capacidade dos concentrados de eritrócitos de transportar e fornecer oxigênio, diminuindo significativamente a eficácia da transfusão. Além de contribuir com a apresentação de reações transfusionais e mudanças bioquímicas e biomecânicas durante o armazenamento, também conhecidas como lesões de armazenamento (HARRELL; KRISTENSEN, 1995; PODER; NONKANI; TSAKEU LEPONKOUO, 2015 OBRADOR; MUSULIN; HANSEN, 2015).

2.3 Lesões de armazenamento

O envelhecimento das hemácias armazenadas em bolsas de sangue é caracterizado pela ocorrência de acúmulo significativo de alterações bioquímicas e morfológicas. Mudanças bioquímicas incluem uma queda no pH, diminuição nas concentrações de glicose, ATP e da 2,3-DPG, aumento do potássio extracelular, lactato e amônia, além de danos oxidativos e enzimáticos que afetam proteínas e lipídios da hemácia (D'ALESSANDRO *et al.*, 2015).

O solução preservativa de armazenamento (CPDA) tem um pH entre 5,0 a 6,0, que ao momento de misturar-se com o sangue muda para 7,2 aproximadamente (HESS, 2010). À medida que as hemácias degradam a glicose via anaeróbica, o lactato se acumula e o pH das células armazenadas diminui gradualmente. Como a glicólise diminui, o nível de ATP dos eritrócitos se reduz, alterando assim os diferentes mecanismos que controlam o equilíbrio eletrolítico da célula e a integridade da membrana, produzindo também um aumento na susceptibilidade ao dano oxidativo (HESS, 2010; ORLOV; KARKOUTI, 2015).

O bicarbonato tem um efeito tamponante no meio extracelular, que neutraliza os ácidos produzidos do metabolismo energético anaeróbico dos eritrócitos (DOS SANTOS SOUSA *et al.*, 2012), assim como o efeito produzido pelo contato do sangue com a solução preservativa da bolsa de sangue, que também tem um pH ácido (HEINZ *et al.*, 2016). Essas são as causas prováveis dos relatos da diminuição gradual do bicarbonato durante o armazenamento de sangue (STERLING; REITHMEIER; CASEY, 2001; DOS SANTOS SOUSA *et al.*, 2012).

No armazenamento, a atividade das bombas Na^+/K^+ e Ca^{2+} dependentes de ATP no eritrócito são reduzidas. Portanto, com a diminuição do ATP no armazenamento há um aumento de potássio (K^+) extracelular, um acúmulo de sódio (Na^+) e cálcio (Ca^{2+}) no interior da célula, fato atribuído também à baixa temperatura de armazenamento (HESS, 2010). Além disso, aumento nas concentrações de cloro em concentrados de eritrócitos caninos têm sido reportados a partir do 28º dia de armazenamento, sugerindo que depósitos de cloro intracelular sejam liberados por causa da hemólise (WILSON *et al.*, 2017).

Durante o armazenamento de hemocomponentes, tem sido observado um aumento na concentração de amônia, resultado do catabolismo de compostos nitrogenados, como a desaminação de proteínas intra-eritrocitárias, aminoácidos e purinas como adenina, encontrada também em soluções conservantes (CONN, 1966; OBRADOR; MUSULIN; HANSEN, 2015).

A adenina é um precursor para a produção de ATP dos eritrócitos e pode contribuir à formação de amônia adicional nas bolsas de sangue durante o armazenamento (PECK *et al.*, 1981; WILSON *et al.*, 2017).

Além das alterações bioquímicas que podem alterar a qualidade dos produtos sanguíneos, patógenos potencialmente infectantes podem ser transmitidos nas transfusões, dentro dos quais se incluem o *M. haemocanis*, o qual pode causar doença subclínica e esses portadores assintomáticos podem ser identificados como doadores de sangue saudáveis, aumentando o risco de infecção iatrogênica (WARDROP *et al.*, 2016).

2.4 *Mycoplasma haemocanis*

O *M. haemocanis* é uma bactéria pleomórfica, epicelular, Gram negativa, que se fixa e desenvolve na superfície das hemácias de vertebrados (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007^a; PETERS *et al.*, 2008; DE SOUSA *et al.*, 2017;). Anteriormente foi classificado como membro da ordem *Rickettsia*, do gênero *Hemobartonella* e *Eperythrozoon*, família Anaplasmataceae. No entanto, baseado nas características moleculares (análises da sequência do gene 16S rRNA) e características fenotípicas como tamanho (< 1 µm), ausência de parede celular e flagelos, resistência a penicilinas ou análogos e susceptibilidade a tetraciclina foram reclassificados no gênero *Mycoplasma*, família Mycoplasmataceae, classe *Mollicutes*. Além disso, por sua característica de aderência à superfície do eritrócito, representam um novo agrupamento distinto dentro do gênero *Mycoplasma* e receberam o nome de mycoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas (CHALKER; BROWNLIE, 2004; MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007^b; PETERS *et al.*, 2008; BARKER *et al.*, 2011).

2.4.1 Prevalência

Mycoplasmas hemotrópicos de cães, como o *M. haemocanis*, têm sido descritos em todo o mundo (BARKER *et al.*, 2010; NOVACCO *et al.*, 2010; ROURA *et al.*, 2010; COMPTON; MAGGI; BREITSCHWERDT, 2012; HII *et al.*, 2012). No Brasil, os mycoplasmas hemotrópicos caninos foram relatados nas regiões Nordeste (RAMOS *et al.*, 2010), Sudeste (ALVES *et al.*, 2014; CONSTANTINO *et al.*, 2017), Sul (VALLE *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2016) e Centro-Oeste (DE SOUSA *et al.*, 2017), detectando a presença de *M. haemocanis* em todas as regiões do país (BIONDO *et al.*, 2009).

2.4.2 Transmissão

A transmissão dos hemoplasmas ainda não está completamente esclarecida, mas acredita-se que o patógeno possa ser transmitido através da picada de vetores hematófagos, como pulgas e carrapatos, sendo suspeito como principal vetor o carrapato do cão, o *Rhipicephalus sanguineus*. A transmissão também pode ocorrer devido a transfusão sanguínea e/ou fômites contaminados, assim como pela via transplacentária (WILLI *et al.*, 2007b, 2010; NOVACCO *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 2016).

2.4.3 Fisiopatologia

A fisiopatologia da infecção pelos hemoplasmas ainda não está completamente definida; vários mecanismos têm sido propostos, incluindo, a produção de radicais livres pelo organismo que induzem a oxidação e dano de membrana celular do hospedeiro; e a secreção de enzimas que podem levar ao rompimento das células (MESSICK, 2004).

Outros mecanismos patogênicos incluem depleção de nutrientes ou precursores biossintéticos, levando a danos nas células hospedeiras e ao desenvolvimento de anticorpos que desencadeiam distúrbios imunológicos comprometendo o metabolismo das hemácias (WILLI *et al.*, 2007; BARKER *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2011; DO NASCIMENTO *et al.*, 2012;).

2.4.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos atribuíveis aos hemoplasmas em cães são variáveis e inespecíficos, e a gravidade da doença depende da espécie de hemoplasma infectante e da presença de doenças concomitantes ou infecções (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004; ROURA *et al.*, 2010). O espectro clínico da infecção varia de assintomático a um estado comprometedor da vida do animal, dependendo parcialmente da suscetibilidade do hospedeiro e dos fatores de risco (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004).

A forma aguda, na qual, se apresentam sinais clínicos entre 1 a 2 semanas após a infecção-ativação (PRYOR; BRADBURY, 1975), é associada com anemia grave de rápido desenvolvimento, na maioria das vezes em cães imunocomprometidos ou esplenectomizados (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004). Sinais concomitantes, incluindo letargia, perda de peso, febre e anorexia também são encontrados em alguns casos. Em casos mais graves, ocorre anemia hemolítica aguda que geralmente se resolve. No entanto, em alguns cães isso

pode levar à morte (KEMMING *et al.*, 2004; MESSICK, 2004; CHALKER, 2005; WENGI *et al.*, 2008).

A forma crônica geralmente é assintomática, ocorrendo em animais aparentemente saudáveis e imunocompetentes que geralmente não desenvolvem a sintomatologia da doença, sendo necessária uma imunossupressão, esplenectomia, doenças associadas ou estresse para que os sinais clínicos tornarem-se evidentes (KEMMING *et al.*, 2004b; MESSICK, 2004). Os animais infectados com hemoplasmas, mesmo sendo tratados com antibióticos, provavelmente permanecem como portadores crônicos após a resolução dos sinais clínicos apresentados na fase aguda da doença, por meses a anos (KEMMING *et al.*, 2004b).

2.4.5 Alterações laboratoriais

Provavelmente os achados hematológicos e bioquímicos variem e dependam do estágio clínico da doença (VALLE *et al.*, 2014). Entretanto, as infecções do hemoplasma clinicamente manifestadas têm sido associadas a anormalidades hematológicas como anemia regenerativa, macrocítica e normocrômica, com valores de hematócritos de até 11% (MESSICK, 2004; HII *et al.*, 2015; CANNON *et al.*, 2016;), reticulocitose, anisocitose, policromasia e corpúsculos de Howell-Jolly podem ser verificados (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007a). Presença de esferócitos, leucocitose e trombocitopenia também foram relatadas (MESSICK, 2004; HII *et al.*, 2015;). A bioquímica sanguínea pode revelar hiperbilirrubinemia, hiperproteinemia e aumento dos níveis séricos de atividade das enzimas hepáticas que pode resultar de danos hipóxicos (WILLI *et al.*, 2007a). A infecção crônica tem sido associada com anemia discreta, leucopenia e apatia em cães infectados experimentalmente (MESSICK, 2004). Mesmo assim, é importante sinalizar que a anemia não é característica da doença produzida pelo *M. haemocanis*, e é relatada em vários estudos com baixa prevalência (WENGI *et al.*, 2008; ROURA *et al.*, 2010; HII *et al.*, 2015).

2.4.6 Diagnóstico

M. haemocanis nunca foi isolado pela cultura tradicional (DO NASCIMENTO *et al.*, 2012). Entretanto, o diagnóstico de infecções por hemoplasmas pode ser realizado através de diversas ferramentas como a citologia dos organismos em esfregaços sanguíneos, testes moleculares como PCR convencional e PCR em tempo real (BRINSON; MESSICK, 2001; BARKER *et al.*, 2010;), testes de Western *immunoblot* e imunofluorescência de anticorpos

(WILLI *et al.*, 2007^a; NOVACCO *et al.*, 2010;). Além disso, o diagnóstico terapêutico pode ser realizado avaliando a resposta clínica do animal ao tratamento com drogas de eleição para tratar o *Mycoplasma* spp. (BRADDOCK; TASKER; MALIK, 2004).

Nos esfregaços sanguíneos corados por Romanowsky, os hemoplasmas são diagnosticados com uma baixa sensibilidade (TASKER *et al.*, 2010; MASCARELLI *et al.*, 2016), e a especificidade diagnóstica é frequentemente prejudicada por artefatos como precipitados de corante ou corpúsculos Howell-Jolly (TASKER *et al.*, 2003; WILLI *et al.*, 2007a).

A PCR é o método padrão-ouro para diagnosticar infecções pelos hemoplasmas. Todos os ensaios de PCR desenvolvidos até o presente momento baseiam-se no gene 16S rRNA dos hemoplasmas e permitem a amplificação do gene alvo específico a partir de amostras de sangue ou tecido de animais infectados (MESSICK, 2003). Também são desenvolvidos ensaios quantitativos de PCR em tempo real por serem altamente específicos e permitir quantificação do DNA dos hemoplasmas (BARKER *et al.*, 2010).

2.4.7 Tratamento

Nenhum tratamento tem sido estabelecido consistentemente para eliminar a infecção por hemoplasmas. No entanto, foi relatado que os antibióticos doxiciclina e enrofloxacina reduzem as cargas do microorganismo no sangue e os sinais clínicos (KEMMING *et al.*, 2004a; PITORRI *et al.*, 2012), mas a eficácia na eliminação da hemoplasmose canina e investigações sobre a duração mínima da terapia não foram estabelecidas (PITORRI *et al.*, 2012).

Previamente foi documentada uma diminuição no número de cópias de *M. haemocanis* e resolução dos sinais clínicos num cão esplenectomizado, mas não a eliminação do organismo, com a administração prolongada durante 100 dias de oxitetraciclina e subsequentemente 240 dias de enrofloxacina (HULME-MOIR *et al.*, 2010). Em outro caso, foi observada uma redução acentuada no número de cópias de *M. haemocanis* e nos sinais clínicos no início da terapia, mas resultados negativos de qPCR foram obtidos depois de 3 meses de tratamento com doxiciclina (PITORRI *et al.*, 2012).

A combinação de antibióticos com corticosteroides como prednisolona para limitar a hemólise e a fagocitose de hemácias foi recomendada por alguns autores (WILLI *et al.*, 2007a). No entanto, o uso de corticosteróides pode ter um impacto negativo na infecção com a supressão

da resposta imune do hospedeiro em casos no confirmados (WILLI *et al.*, 2007^a; PITORRI *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de *Mycoplasma haemocanis* em concentrado de eritrócitos canino através da técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), realizando uma correlação com o metabolismo eritrocitário.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença do *M. haemocanis*, em cães com infecção assintomática, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (qPCR) e a presença do organismo em concentrado de eritrócitos com CPDA-1 durante os dias 1, 7, 18 e 29 de armazenamento.
- Avaliar as lesões de estoque em concentrado de eritrócitos com CPDA-1 nos dias 1, 7, 18 e 29 durante o armazenamento a 4°C.
- Correlacionar o número de cópias de DNA de *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos caninos com o metabolismo dos eritrócitos e lesões de estoque durante o armazenamento a 4°C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais e métodos, bem como resultados e discussão estão apresentados em forma de artigo científico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo permitiu identificar a presença de *M. haemocanis* em concentrado de eritrócitos armazenado a 4°C durante 29 dias. Porém, o potencial infectante desse patógeno não foi definido, sendo a transfusão ou inoculação de produtos sanguíneos contaminados de maneira experimental uma das possibilidades para verificar o risco de infecção. No entanto, os resultados do presente estudo, são a base para estudos futuros que visam determinar o potencial de infecção e transmissão de *M. haemocanis* em hemocomponentes caninos, considerando a importância das diferenças encontradas nos parâmetros bioquímicos analisados entre os grupos Controle e Mycoplasma.

No presente estudo também foram observadas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos amônia, glicose, lactato, pH, bicarbonato e eletrólitos nos concentrados de eritrócitos caninos com *M. haemocanis* em comparação com o grupo controle.

Além disso, a condição dos receptores de sangue geralmente é crítica e a transfusão com concentrado de eritrócitos contaminados com *M. haemocanis* pode representar um risco de introdução de um patógeno que piore o estado de saúde do paciente.

Este estudo ressalta a importância da triagem de componentes sanguíneos para patógenos como hemoplasmas pelas técnicas de PCR, devido a que estes patógenos podem causar doença subclínica em cães e os doadores podem ser identificados como saudáveis com testes laboratoriais de rotina.

REFERÊNCIAS

- ALVES, T. B. *et al.* Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Archivos de Medicina Veterinaria**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 333–336, 2014.
- BARKER, E. N. *et al.* Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” in dogs. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 140, n. 1–2, p. 167–170, 2010.
- BARKER, E. N. *et al.* Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 1–8, 2011.
- BIONDO, A. W. *et al.* A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 18, n. 03, p. 1–7, 2009.
- 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**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 161–165, 2004.
- BRINSON, J. 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**, [S. l.], v. 218, n. 12, p. 1943–1945, 2001.
- CANNON, S. H. *et al.* Infectious diseases in dogs rescued during dogfighting investigations. **Veterinary Journal**, [S. l.], v. 211, p. 64–69, 2016.
- CHALKER, V. J. Canine mycoplasmas. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 1–8, 2005.
- CHALKER, V. J.; BROWNLIE, J. Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 537–542, 2004.
- 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**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 557–562, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.06.004>

CONN, H. O. Studies on the origin and significance of blood ammonia. II. The distribution of ammonia in whole blood, plasma and erythrocytes of man. **Yale Journal of Biology and Medicine**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 38–53, 1966.

CONSTANTINO, C. *et al.* Survey of spatial distribution of vector-borne disease in neighborhood dogs in southern Brazil. **Open Veterinary Journal**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 50–56, 2017.

D’ALESSANDRO, A. *et al.* An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. **Transfusion**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 205–219, 2015.

DE SOUSA, K. C. M. *et al.* Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 171, n. January, p. 172–181, 2017.

DO NASCIMENTO, N. C. *et al.* Mycoplasma haemocanis - The canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 43, n. 1, 2012.

DOS SANTOS SOUSA, R. *et al.* Lesões de armazenamento durante a conservação de sangue nas diferentes espécies: Uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 68–79, 2012.

HARRELL, K. A.; KRISTENSEN, A. T. Canine transfusion reactions and their management. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1333–1364, 1995. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(95\)50158-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(95)50158-5)

HARRIS, J. R. **Cell biochemistry**. 1st ed. ed. New York [s. n.]. v. 271

HEINZ, J. A. *et al.* Biochemical evaluation of the effects of storage on feline erythrocytes. **Journal of Small Animal Practice**, [S. l.], v. 57, n. 11, p. 637–643, 2016.

HESS, J. R. Red cell changes during storage. **Transfusion and Apheresis Science**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 51–59, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>

HII, S. F. *et al.* Canine vector-borne disease pathogens in dogs from south-east Queensland and north-east Northern Territory. **Australian Veterinary Journal**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 130–135, 2012.

HII, S. F. *et al.* 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, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 58–66, 2015.

HULME-MOIR, K. L. *et al.* 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**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 582–587, 2010.

KEMMING, G. *et al.* Can we continue research in splenectomized dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old problem - New insight. **European Surgical Research**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 198–205, 2004 a.

KEMMING, G. I. *et al.* *Mycoplasma haemocanis* infection - A Kennel Disease? **Comparative medicine**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 404–409, 2004 b.

KEOHANE, M.; SMITH, L.; WALENGA, M. **Hematology Clinical principles and applications**. 5th ed. ed. New York [s. n.].

KISIELEWICZ, C.; SELF, I.; BELL, R. Assessment of clinical and laboratory variables as a guide to packed red blood cell transfusion of euvolemic anemic dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 576–582, 2014.

LOGAN, J. C. *et al.* Clinical indications for use of fresh frozen plasma in dogs: 74 dogs (October through December 1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 218, n. 9, p. 1449–1455, 2001.

MASCARELLI, P. E. *et al.* Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–5, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1920-8>

MESSICK, J. B. New perspectives about Hemotropic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1453–1465, 2003.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 2–13, 2004.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.

- NOVACCO, M. *et al.* Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 142, n. 3–4, p. 276–284, 2010.
- OBRADOR, R.; MUSULIN, S.; HANSEN, B. Red blood cell storage lesion. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 187–199, 2015.
- ORLOV, D.; KARKOUTI, K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. **Anaesthesia**, [S. l.], v. 70, p. 29–37, 2015.
- PATTERSON, J. *et al.* In vitro lysis and acute transfusion reactions with hemolysis caused by inappropriate storage of canine red blood cell products. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 927–933, 2011.
- PECK, C. C. *et al.* Adenine blood preservation. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 173–212, 1981.
- PETERS, I. R. *et al.* RNase P RNA gene (rnpB) phylogeny of hemoplasmas and other Mycoplasma species. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 1873–1877, 2008.
- PITORRI, F. *et al.* Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of Mycoplasma haemocanis infection with doxycycline in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 493–496, 2012.
- PODER, T. G.; NONKANI, W. G.; TSAKEU, L. É. Blood Warming and Hemolysis: A Systematic Review With Meta-Analysis. **Transfusion Medicine Reviews**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 172–180, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2015.03.002>
- PRITTIE, J. E. Triggers for use, optimal dosing, and problems associated with red cell transfusions. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1261–1275, 2003.
- PRYOR, W. H.; BRADBURY, R. P. **Haemobartonella canis infection in research dogs.** [S. l.: s. n.]
- RAMOS, R. *et al.* Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology Research**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 1115–1120, 2010.

ROURA, X. *et al.* Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 270–274, 2010.

SANTOS, Andrea P. *et al.* Genome of *Mycoplasma haemofelis*, unraveling its strategies for survival and persistence. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 42, n. 1, 2011.

SHALM, J.; WILLIAM, O. **Veterinary hematology**. 6th editio ed. New York [s. n.].

SOARES, R. L. *et al.* Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande , Mato Grosso do Sul , Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 359–363, 2016.

STERLING, D.; REITHMEIER, R. A. F.; CASEY, J. R. A transport metabolon: Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 51, p. 47886–47894, 2001.

TASKER, S. *et al.* Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 152, n. 7, p. 193–198, 2003.

TASKER, S. *et al.* Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 59, n. 11, p. 1285–1292, 2010.

VALLE, S. F. *et al.* Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 259–265, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2014.08.001>

WARDROP, K. J. *et al.* Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 135–142, 2005.

WARDROP, K. J. *et al.* Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 15–35, 2016.

WENGI, N. *et al.* Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 126, n. 1–3, p. 132–141, 2008.

WILLI, B. *et al.* From Haemobartonella to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 125, n. 3–4, p. 197–209, 2007 a.

WILLI, B. *et al.* Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 73, n. 12, p. 3798–3802, 2007 b.

WILLI, B. *et al.* Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: Transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, [S. l.], v. 152, n. 5, p. 237–244, 2010.

WILSON, C. R. *et al.* Biochemical evaluation of storage lesion in canine packed erythrocytes. **Journal of Small Animal Practice**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 678–684, 2017.

YAGI, K.; HOLOWAYCHUK, M. **Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking**. John Wiley ed. Chennai, India.: Wiley, 2016.