



Facultade de Veterinaria

Traballo de
Fin de Grao

Presenza de *Mycoplasma
haemofelis* e outros
micoplasmas hemotrópicos
en gatos do noroeste de
España

MIRIAM PARGA BRAÑA

Grao en Veterinaria

Ano 2023

Modalidade do Traballo Experimental

Licenza

Agás onde se faga constar explicitamente, esta obra pertence a Miriam Parga Braña e está baixo unha licenza de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



Resumo

Os micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) son bacterias intracelulares que infectan os glóbulos vermellos dunha gran variedade de mamíferos provocando anemias hemolíticas graves; no caso dos gatos, estes patóxenos provocan a anemia infecciosa felina. Os micoplasmas hemotrópicos atópanse amplamente estendidos mundialmente, e nos últimos anos están adquirindo gran relevancia en España.

Os obxectivos deste traballo de fin de grado foron determinar a posible presenza de micoplasmas hemotrópicos nos gatos do noroeste de España e identificar as especies atopadas de xeito molecular e, tamén, se existe influencia de factores como a idade, o sexo, a presenza de pulgas e o estilo de vida dos gatos sobre a presenza destes microorganismos. Para isto realizouse unha mostraxe dun total de 74 mostras de sangue enteiro de gatos do noroeste de España, recollendo ademais diferentes datos sobre a súa procedencia, sexo, idade, presenza de pulgas e o seu estilo de vida. A partir das mostras de sangue enteiro realizouse unha PCR convencional para a detección de micoplasmas hemotrópicos, e a continuación as mostras positivas foron secuenciadas mediante o método Sanger. Por último, construíuse unha árbore filoxenética coas secuencias obtidas e outras de referencia previamente descritas e realizouse unha análise estatística para estudar si entre as variables recollidas e a positividade había diferencias significativas.

Un total de 12 mostras (16,22 %) resultaron positivas a *Mycoplasma* spp. hemotrópicos mediante PCR. As especies atopadas e as súas prevalencias foron as seguintes: *Mycoplasma haemofelis*, 6,76 %; “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, 6,76 %; *Mycoplasma wenyonii*, 1,35 %; e “*Candidatus Mycoplasma haemobos*”, 1,35 %; así, este traballo arroxa nova información sobre a presenza das diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos no noroeste de España. Polo que respecta ao estudo estatístico, as variables idade e sexo non presentaron relacións significativas coa positividade ($p > 0,05$), mentres que a presenza de pulgas e o estilo de vida colonia-acceso ao exterior si mostraron diferenzas significativas ($p < 0,05$). Estes resultados reforzan a idea de que a transmisión mediante vectores como as pulgas e a transmisión por contacto directo son as formas de transmisión máis importantes nestas infeccións. Ademais, este estudo supón a primeira descrición de “*Candidatus M. haemobos*” en gatos, un micoplasma hemotrópico cuxo hospedeiro principal son os bóvidos.

Palabras chave: micoplasmas hemotrópicos, gatos, PCR, factores de risco, secuenciación, filoxenia

Resumen

Los micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) son bacterias intracelulares que infectan los glóbulos rojos en una amplia variedad de mamíferos y causan anemias hemolíticas graves; en el caso de los gatos, estos patógenos causan la anemia infecciosa felina. Los micoplasmas hemotrópicos están muy extendidos a nivel mundial y, en los últimos años, han adquirido gran relevancia en España.

Los objetivos de este trabajo de fin de grado fueron determinar la posible presencia de micoplasmas hemotrópicos en gatos del noroeste de España e identificar las especies encontradas molecularmente y, también, si factores como la edad, el sexo, la presencia de pulgas o el estilo de vida influyen en la presencia de estos microorganismos. Para lograr esto, se realizó un muestreo de un total de 74 muestras de sangre entera de gatos del noroeste de España, recogiendo además diferentes datos sobre su procedencia, sexo, edad, presencia de pulgas y su estilo de vida. A partir de las muestras de sangre entera, se realizó una PCR convencional para la detección de micoplasmas hemotrópicos, y a continuación las muestras positivas fueron secuenciadas mediante el método de Sanger. Finalmente, se construyó un árbol filogenético, con las secuencias obtenidas y otras de referencia previamente descritas, y un análisis estadístico para estudiar si había diferencias significativas entre las variables recogidas y la positividad.

Un total de 12 muestras (16,22%) resultaron positivas para *Mycoplasma* spp. hemotrópicos por PCR. Las especies encontradas y sus prevalencias fueron: *Mycoplasma haemofelis*, 6,76%; “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”, 6,76%; *Mycoplasma wenyonii*, 1,35%; y “*Candidatus* *Mycoplasma haemobos*”, 1,35%; así, este trabajo aporta nueva información sobre la presencia de diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos en el noroeste de España. Por lo que respecta al estudio estadístico, las variables edad y sexo no presentaron relaciones significativas con la positividad ($p > 0,05$), mientras que la presencia de pulgas y el estilo de vida colonia-acceso al exterior sí mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Estos resultados refuerzan la idea de que la transmisión a través de vectores como las pulgas y la transmisión por contacto directo son las formas de transmisión más importantes de estas infecciones. Además, este estudio representa una primera descripción de “*Candidatus* *M. haemobos*” en gatos, un micoplasma hemotrópico cuyo huésped principal son los bóvidos.

Palabras clave: micoplasmas hemotrópicos, gatos, PCR, factores de riesgo, secuenciación, filogenia

Abstract

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are intracellular bacteria that infect red blood cells in a wide variety of mammals and cause severe hemolytic anemias; in the case of cats, these pathogens cause feline infectious anemia. Hemotropic mycoplasmas are widespread worldwide and, in recent years, have gained great importance in Spain.

The objectives of this The Final Project were to determine the possible presence of hemotropic mycoplasmas in cats from the Northwest of Spain and to identify molecularly the species found, moreover, the influence of factors such as influence of factors such as age, sex, the presence of fleas or the lifestyle of cats on the presence of these microorganisms was evaluated. A total of 74 whole blood samples were collected from cats from the Northwest of Spain as well as data on their origin, sex, age, presence of fleas and their lifestyle. From the whole blood samples, a conventional PCR was performed for detecting hemotropic mycoplasmas, and then the positive samples were sequenced using the Sanger method. Subsequently, a phylogenetic tree was built with the sequences obtained and other reference sequences previously described. Finally, a statistical analysis was performed to evaluate if there were significant differences between the variables collected and the positivity.

A total of 12 samples (16.22%) were positive for *Mycoplasma* spp. hemotropic by PCR. The species found and their prevalence were: *Mycoplasma haemofelis*, 6.76%; "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*", 6.76%; *Mycoplasma wenyonii*, 1.35%; and "*Candidatus Mycoplasma haemobos*", 1.35%; so, this work provides new information on the presence of different species of hemotropic mycoplasmas in northwestern Spain. As regards the statistical study, the variables age and sex did not present significant relationships with the positivity ($p > 0.05$), while the presence of fleas and the colony-access lifestyle show significant differences ($p < 0.05$). These results reinforce the idea that transmission through vectors such as fleas and direct transmission by direct contact are the most important forms of transmission of these infections. In addition, this study represents a first description of "*Candidatus M. haemobos*" in cats, a hemotropic mycoplasma whose main host is bovids.

Keywords: hemotropic mycoplasmas, cats, PCR, risk factors, sequencing, phylogeny

ÍNDICE

Resumo	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Índice de abreviaturas	8
Índice de táboas e figuras	10
1. Introducción	11
1.1 Etioloxía	11
1.2 Epidemioloxía	12
1.2.1 Distribución xeográfica	12
1.2.2 Hospedeiros	12
1.2.3 Transmisión	13
1.2.4 Factores de risco	15
1.3 Patoxénese.....	16
1.4 Signos clínicos e lesións	17
1.5 Diagnóstico	17
1.5.1 Hemograma e Bioquímica	17
1.5.2 Frotis sanguíneo.....	18
1.5.3 Proba de Coombs.....	18
1.5.4 PCR.....	19
1.6 Tratamento	19
1.7 Prevención e control.....	20
2. Obxectivos	21
3. Material e métodos	22
3.1 Criterios de selección	22
3.2 Análise de laboratorio.....	22
3.2.1 Extracción de ADN	22
3.2.2 PCR convencional	23
3.2.3 Secuenciación do ADN.....	26
3.3 Análise filoxenético.....	26
3.3.1 Ensamblaxe e corrección de secuencias.....	26
3.3.2 Identificación de secuencias especies de <i>Mycoplasma</i> spp. hemotrópicos.....	27
3.3.3 Aliñamento	27
3.3.4 Construción da árbore filoxenética	28
3.4 Análise estatística.....	29

4.	Resultados e discusión.....	30
4.1	Presenza de micoplasmas hemotrópicos	30
4.2	Especies de micoplasmas hemotrópicos atopadas	30
4.3	Árbore filoxenética.....	33
4.4	Factores de risco avaliados que poden influír na transmisión	34
5.	Conclusións	39
6.	Bibliografía	40

Índice de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIC: *Akaike Information Criterion*

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

°C: grados Celsius

CPDA-1: Citrato-fosfato-dextrosa-adenina

dnaK: proteína de choque térmico 70 de la chaperona de ADN

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EF-Ts: factor de elongación - sensible a temperatura

ELISA: Inmunoadsorción ligada a enzimas

F: *Forward*

g: gramo

gapA: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GTR + I + G: *General Time Reversible + Invariant sites + Gamma-distributed*

h: hora

M.: *Mycoplasma*

mA: miliamperio

MEGA X: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X*

mg/kg: miligramo/kilogramo

Mhf: *Mycoplasma haemofelis*

min: minuto

Mhm: “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”

ml: mililitro

mM: milimolar

Mtc: “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

PCR: Reacción en cadena da polimerasa

pgk: fosfoglicerato quinasa

pb: par de bases

R: *Reverse*

rpm: revolución por minuto

Rt- PCR: PCR en tempo real

TAE: Tris, acetato e EDTA

UI: Unidades internacionais

μm : micrómetro

μl : microlitro

μM : micromolar

V: voltios

W: vatio

χ^2 : Chi-cadrado

Índice de táboas e figuras

Táboa 1. Clasificación taxonómica de <i>Mycoplasma haemofelis</i>	12
Táboa 2. Principais micoplasmas hemotrópicos descritos e hospedeiro tipo para cada un deles.	13
Táboa 3. Listado dos reactivos necesarios para a preparación da <i>Master mix</i> empregada para a detección de micoplasmas hemotrópicos.....	24
Táboa 4. Protocolo térmico empregado para a amplificación das mostras de este estudo mediante PCR convencional.	24
Táboa 5. Datos das secuencias descritas na base do genbank empregadas para a realización do análise filoxenético.....	28
Táboa 6. Resume dos datos das mostras positivas a micoplasma hemotrópicos neste estudo, coa identificación a nivel de especie e porcentaxe de homoloxía coas secuencias previamente descritas en Genbank.....	32
Táboa 7. Táboa de continxencia para as variables sexo e positividade á PCR.....	34
Táboa 8. Táboa de continxencia para as variables idade e positividade á PCR	35
Táboa 9. Táboa de continxencia para as variables presenza de pulgas e positividade á PCR	35
Táboa 10. Táboa de continxencia para as variables estilo de vida e positividade á PCR.....	35
Táboa 11. Resultados táboas de continxencia	35
Figura 1. Micoplasmas hemotrópicos na superficie dos eritrocitos. Frotis sanguíneo en Diff- quick, 1000x.....	18
Figura 2. Columnas de filtrado e tubo colector empregados durante a extracción de ADN.....	23
Figura 3. Imaxe obtida tras a electroforese en xel de agarosa ao 1% dos produtos de PCR obtidos a partir de mostras do presente estudo	26
Figura 4. Vista da enxablaxe dos cromatogramas no programa ChromasPro 2.1.4.	27
Figura 5. Árbore filoxenética obtida a partir das mostras de este estudo e secuencias de referencia da base de datos Genbank.....	33

1. Introducción

Os micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) son bacterias cocoides Gram negativas, de menos de 1 μm e sen parede bacteriana que infectan os glóbulos vermellos dunha ampla variedade de mamíferos provocando anemias hemolíticas graves e, incluso, mortais. Nos gatos, estes micoplasmas considéranse o axente etiolóxico da anemia infecciosa felina (Barker, 2019).

A especie máis patóxena no caso dos felinos é *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf*) que provoca anemias hemolíticas graves incluso en gatos inmunocompetentes. Outras especies como “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” tamén se describen en gatos, pero producen a anemia só no caso de que o animal estea inmunodeprimido ou presente unha enfermidade concorrente (Tasker, 2010).

1.1 Etioloxía

Os hemoplasmas foron descritos por primeira vez en roedores de laboratorio na década de 1920 (Ford e Eliot, 1928). Unha característica importante dos hemoplasmas é que son bacterias intracelulares obrigatorias, polo que non se poden cultivar *in vitro* e deste xeito todos os estudos precisan ser realizados dentro do seu hospedeiro (Harvey, 2008).

Orixinalmente, os micoplasmas hemotrópicos foron clasificados no xénero *Bartonella*. Os motivos desta clasificación foron a súa gran afinidade polos glóbulos vermellos, o seu pequeno tamaño ($< 1 \mu\text{m}$) e tamén pola posible implicación dos artrópodos na súa transmisión. Posteriormente, reclasificáronse dentro da orde *Rickettsiales* da familia *Anaplasmataceae* e, finalmente, tras a aparición da secuenciación do ADN e da análise filoxenética baseada na comparación de secuencias de xenes dos ribosomas, foron reclasificados oficialmente como *Mycoplasma* spp. (Neitz, 1934; Clark, 1942; Neimark *et al.*, 2001).

Respecto a *Mycoplasma haemofelis*, esta especie foi descrita por primeira vez por Clark en Sur África no ano 1942 baixo o nome de *Eperythrozoon felis* (Clark, 1942). Anos máis tarde, Flint e Moss describiron un patóxeno, que igual que o anterior, causaba anemia infecciosa nos gatos en Estados Unidos e, en 1955, Flint e McKelvie utilizaron o nome *Haemobartonella felis* para describir este patóxeno (Tasker e Lappin, 2002). Foi xa no século XXI cando adoptou oficialmente o nome dentro do xénero *Mycoplasma* (Neimark *et al.*, 2001). Na Táboa 1 móstrase a clasificación taxonómica que ten na actualidade (Brown *et al.*, 2010).

Táboa 1. Clasificación taxonómica de *Mycoplasma haemofelis*.

Dominio	<i>Prokaryota</i>
Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Mollicutes
Orden	<i>Mycoplasmatales</i>
Familia	<i>Mycoplasmataceae</i>
Xénero	<i>Mycoplasma</i>
Especie	<i>Mycoplasma haemofelis</i>

1.2 Epidemioloxía

1.2.1 Distribución xeográfica

A distribución xeográfica destes patóxenos é mundial, e pódese atopar presenza tanto de *Mycoplasma haemofelis*, como de outras especies de micoplasmas hemotrópicas descritas en gatos, en todos os continentes (Willi et al., 2006b; Sykes et al., 2008; Méndez et al., 2022; Yasmin et al., 2022).

Se nos centramos en España hai dous estudos, un realizado no ano 2010 e outro no ano 2018, que informan da presenza de *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus M. haemominutum*” e “*Candidatus M. turicensis*” na área de Barcelona e Madrid respectivamente. A especie que máis abunda en España é “*Candidatus M. haemominutum*” con prevalencias ao redor do 10 %, mentres *Mycoplasma haemofelis* presentou en ambos estudos unha prevalencia do 3,7 %. No caso de “*Candidatus M. turicensis*”, o estudo de Barcelona supuxo a primeira descrición da presenza de esta especie en gatos en España (Roura et al., 2010; Díaz-Regañón et al., 2018).

No ano 2022 realizouse un segundo estudo en Barcelona, onde a prevalencia de *Mhf* situouse xa no 5,9 % mentres que *Mhm* deixou de ser a especie máis abundante pasando a un 4,4%. Ademais, neste estudo realizado en Barcelona describiuse por primeira vez *Mycoplasma wenyonii* en gatos (Álvarez-Fernández et al., 2022).

1.2.2 Hospedeiros

Mycoplasma haemofelis, “*Candidatus M. haemominutum*” e “*Candidatus M. turicensis*” son as especies nas que o gato é o hospedeiro principal.

Non obstante, no ano 2007 atopáronse dous gatos positivos a un hemoplasma cunha secuencia similar a “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”, cuxo hospedeiro principal son os cánidos. Curiosamente, “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” parece estar máis ligado xeneticamente con “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” que con *Mycoplasma haemocanis*, a outra especie que ten como hospedeiro principal os cánidos (Sykes *et al.*, 2007).

Na Táboa 2 móstranse as principais especies e candidatos a especie de micoplasmas hemotrópicos descritos ata a actualidade e o seu hospedeiro principal.

Táboa 2. Principais micoplasmas hemotrópicos descritos e hospedeiro tipo para cada un deles.

Hospedeiro principal	Micoplasmas hemotrópicos	Referencia
Gato	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Willi <i>et al.</i> , 2010
	“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ”	
	“ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ”	
Can	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Willi <i>et al.</i> , 2010
	“ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ”	
Vacún	“ <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ”	Gladden <i>et al.</i> , 2016
	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	
Ovinos e caprinos	<i>Mycoplasma ovis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2017
	“ <i>Candidatus Mycoplasma haemovis</i> ”	
Porcino	<i>Mycoplasma suis</i>	Quiroz-Castañeda <i>et al.</i> , 2020
	<i>Mycoplasma parvum</i>	

1.2.3 Transmisión

O mecanismo de transmisión non está totalmente claro, pero podemos dividilo da seguinte maneira:

- **Transmisión por artrópodos.** A transmisión mediante picadura de pulgas e carrachas é das máis apoiadas pola comunidade científica. As pulgas, e máis frecuentemente *Ctenocephalides felis* en gatos, necesitan altas temperaturas e unha humidade relativa próxima ao 100 % para reproducirse e sobrevivir, polo que os lugares con climas cálidos son os que mostran maior prevalencia, reforzando a idea de que si están involucradas na transmisión (Willi *et al.*, 2006a).

No ano 2005 demostrouse mediante PCR en tempo real (rt-PCR) a presenza de micoplasmas hemotrópicos en pulgas, larvas e feces de pulgas de gatos infectados; con todo, non se demostrou que as pulgas infectadas de forma experimental fosen capaces de infectar a gatos sans (Woods *et al.*, 2005; Willi *et al.*, 2007a).

O papel das carrachas na transmisión parece ter menor importancia, aínda que se chegou a confirmar mediante rt-PCR a presenza de micoplasmas hemotrópicos en carrachas recollidas na vexetación (Willi *et al.*, 2007a, 2010).

Os mosquitos tamén se estudaron como posibles vectores implicados na transmisión de micoplasmas hemotrópicos, pero non se atoparon evidencias de que transmitisen micoplasmas hemotrópicos felinos (Reagan *et al.*, 2017).

Outra proba que apoia a implicación dos artrópodos na transmisión foi o estudo realizado por Baumann *et al.* (2013) no que, tras a inoculación por vía subcutánea de 0,05 µl de sangue infectado a un grupo de gatos sans, 34 días despois todos resultaron positivos a rt-PCR e acadando unha carga máxima en sangue de 10⁹ copias/ml. Isto demostrou que as doses baixas do patóxeno, como as que poden transportar os artrópodos, son suficientes para provocar a enfermidade nos gatos (Baumann *et al.*, 2013).

Outra forma de transmisión na que as pulgas poden estar implicadas pero que non supón unha picadura é durante o acicalamento diario dos gatos. Os gatos adoitan inxerir pulgas, ovos, larvas e feces das mesmas ao lamberse, o que pode ser considerado outro medio de transmisión da enfermidade entre a pulga e o gato (Woods *et al.*, 2005).

- **Transmisión de forma iatroxénica.** As transfusións sanguíneas, o uso de agullas entre gatos ou o uso inadecuado do mesmo equipo (por exemplo, instrumentos cirúrxicos) en diferentes gatos son tamén formas recoñecidas de transmisión de micoplasmas hemotrópicos (Foster, 2000; Willi *et al.*, 2006a; Tasker, 2010).

Nun estudo realizado con sangue almacenado a 4 °C en solución de citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA-1), solución na que adoita almacenarse o sangue que se emprega para transfusións felinas, demostrouse mediante rt-PCR e PCR convencional a presenza de hemoplasmas no sangue almacenado durante un mes. Con todo, a concentración bacteriana non se incrementou durante este mes, indicando que o patóxeno non é capaz de replicarse no sangue almacenado baixo estas condicións; ademais, ningún gato resultou positivo cando se lle inoculou este sangue, o que suxire que os hemoplasmas non eran viables e polo tanto non chegaron a replicarse no animal. Polo que respecta aos gatos que se inocularon directamente despois dun hora ou unha semana con *Mhm*, estes resultaron positivos durante tres semanas e unha semana respectivamente, e daqueles aos que se lles inoculou *Mhf*, só un dos gatos inoculado despois de unha hora deu positivo e tivo unha febre transitoria (Gary *et al.*, 2006).

Con este estudo demostrouse que os hemoplasmas sobreviven no sangue durante un tempo, pero pasado este tempo a viabilidade e virulencia diminúen paulatinamente. Entre os motivos que poden influír diminuíndo a viabilidade podemos sinalar os efectos que produce o CPDA-1, a temperatura e a posible alteración que sofren os glóbulos vermellos ao almacenarse (Gary *et al.*, 2006).

- **Transmisión directa.** Confirmouse a presenza de micoplasmas hemotrópicos na saliva e nas feces de gatos positivos. Non obstante, crese que as condutas de lambidos ou compartir comedeiros ou bandexas non son suficientes para transmitir a infección, e que se necesitan condutas agresivas que impliquen mordeduras para transmitir a enfermidade; por iso, un dos grupos de risco son os machos sen castrar e que teñen acceso ao exterior (Willi *et al.*, 2006a, 2007a; Tasker, 2010).

Simulando unha interacción agresiva entre gatos confirmouse mediante rt-PCR que aos animais que se lles inoculaban 10 µl de sangue infectado con “*Candidatus M. turicensis*” por vía subcutánea resultaban todos positivos posteriormente, demostrando que as interaccións agresivas si son un modo efectivo de transmisión da infección. Por outro lado, a pesar de atopar saliva positiva a micoplasmas hemotrópicos non houbo resultados positivos tras a inoculación da mesma por vía subcutánea, e tampouco se atoparon resultados positivos nos gatos expostos ao sangue ou saliva vía oral (Museux *et al.*, 2009).

- **Outras formas posibles de transmisión** que están menos estudadas inclúen a transmisión vertical da nai aos gatiños durante a xestación, o nacemento ou a través da lactación. Tamén se investigaron os roedores polo hábito de caza dos gatos, pero non se obtiveron evidencias que confirmasen que se podía transmitir a partir deles, xa que todos os roedores foron negativos aos micoplasmas hemotrópicos felinos (Foster, 2000; Willi *et al.*, 2007a; Tasker, 2010).

1.2.4 Factores de risco

Como factores de risco que poden potenciar a capacidade patóxena das especies de micoplasmas hemotrópicos nos gatos podemos sinalar os seguintes (Palmero e Carballés, 2010):

- A idade: os animal novos ou maiores son máis susceptibles xa que teñen un sistema inmunitario máis inmaturo ou debilitado respectivamente, dando como resultado unha anemia máis grave (Willi *et al.*, 2007b).
- O sexo: os machos son os máis propensos xa que están máis involucrados en liortas nas que hai mordeduras (Willi *et al.*, 2006a; Tasker, 2010).

- Os gatos que viven no exterior e teñen contacto con outros gatos e cos artrópodos teñen máis probabilidade de infectarse (Willi *et al.*, 2007a).
- A coinfección con outras especies de hemoplasmas, que potencian a acción entre eles.
- A coinfección con outros patóxenos ou patoloxías, que pode potenciar a anemia e reactivar a infección en gatos portadores. Entre as patoloxías asociadas encontramos por exemplo o virus da leucemia felina, o virus da inmunodeficiencia felina, o virus da peritonitis infecciosa felina, a bacteria *Bartonella henselae* e algunhas neoplasias.

1.3 Patoxénese

A adhesión dos micoplasmas á superficie da membrana dos glóbulos vermellos produce dano na mesma que vai reducindo o tempo de vida das células infectadas. A isto hai que engadir a resposta inmunitaria que se produce fronte a bacteremia: a adhesión dos micoplasmas expón antíxenos e o hospedeiro responde con anticorpos, xerándose así unha reacción antíxeno-anticorpo complementaria que da lugar a hemólise. Esta hemólise acaba producindo a anemia hemolítica característica da infección por *Mycoplasma haemofelis* (Harvey, 2008). En xeral, a hemólise intravascular créese que é mínima; na maioría dos casos a anemia prodúcese por hemólise extravascular debida a eritrofagocitose por parte dos macrófagos do bazo, fígado, pulmóns e medula ósea (Harvey, 2008).

Na patoxénese da infección por *Mhf* pódense diferenciar catro etapas:

- O período de incubación oscila entre unha e tres semanas pasada a infección do patóxeno (Lobetti, 2007).
- A fase aguda dura ao redor dun mes e correspóndese co momento no que o animal presenta o maior nivel de bacteremia. Nesta fase aparecen os signos clínicos (aínda que non en todos os gatos), polo que este é o momento no que se adoita acudir ao veterinario (Sykes, 2010).
- Na fase de recuperación redúcense os micoplasmas en sangue e o hematócrito comeza a repoñerse (Palmero e Carballés, 2010).
- A fase crónica é a que experimentan algúns gatos durante toda a súa vida, estes recupéranse da infección pero quedan como portadores crónicos. Aínda que non está totalmente estudada, no ano 2009 atopáronse mediante rt-PCR algunhas evidencias que parecían indicar que o pulmón, fígado e bazo son os órganos onde quedan secuestrados os micoplasmas hemotrópicos, xa que nestes órganos atopáronse o maior número de copias dos micoplasmas. Non obstante, non foron capaces de confirmar esta hipótese (Tasker *et al.*, 2009a).

Con todo, se o protocolo de tratamento é adecuado o animal debería quedar completamente libre da bacteremia en sangue e sen signos clínicos (Novacco *et al.*, 2018). No caso de que o gato quede infectado de forma crónica, a reactivación da enfermidade pode ocorrer en calquera momento no que o gato se atope nun período de inmunosupresión; normalmente, os gatos infectados de forma crónica teñen hematócitos normais e resulta difícil atopar os hemoplasmas no frotis sanguíneo, polo que a única maneira de detectalos é mediante o uso de técnicas moleculares (Willi *et al.*, 2006a; Palmero e Carballés, 2010).

1.4 Signos clínicos e lesións

Mycoplasma haemofelis provoca cadros anémicos que varían dende subclínicos a severos, podendo chegar a comprometer a vida do animal. Aínda que na maioría dos casos é típica a presenza dunha anemia rexenerativa, describíronse casos con anemia non rexenerativa, posiblemente debido a que non transcorreu o tempo suficiente (3 a 5 días postinfección) para que se producise a resposta rexenerativa por parte da medula ósea (Palmero e Carballés, 2010).

A sintomatoloxía é moi variada e a maior parte prodúcese como resultado do proceso anémico que o animal está sufrindo. Entre os sinais máis frecuentes atopamos: letarxia, debilidade, inapetencia, colapso, palidez de mucosas, taquicardia, disnea/taquipnea, sopros cardíacos, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, deshidratación, febre, perda de peso e ictericia (Barker, 2019).

1.5 Diagnóstico

1.5.1 Hemograma e Bioquímica

Cando o animal presenta os signos clínicos e acude ao veterinario o hematócrito adoita estar por debaixo do 20 %, incluso por debaixo do 10 %. O normal neste momento é atopar unha anemia rexenerativa macrocítica e hipocrómica (Harvey, 2008). En canto ao glóbulos brancos, estes poden estar en valores normais ou presentar leucopenia ou mesmo leucocitose; no caso das plaquetas, o achado máis característico é a trombocitopenia (Sykes, 2010).

No perfil bioquímico podemos atopar hiperproteinemia fundamentalmente debida a deshidratación e, debido ao dano no fígado, os encimas hepáticos adoitan atoparse en valores por enriba do normal (Tasker, 2010). No caso de que a hemólise sexa masiva (intravascular e extravascular) e se supere a capacidade de conxugación da hemoglobina a nivel hepático, producirase bilirrubinemia e bilirrubinuria moderada e transitoria (Palmero e Carballés, 2010).

1.5.2 Frotis sanguíneo

Ao observar unha extensión de sangue no microscopio observase aglutinación, policromasia, anisocitose e máis corpos de Howell-Jolly do normal. Os eritrocitos adoitan ser de maior tamaño (macrocíticos), nucleados e dunha cor máis pálida ao transportar unha menor cantidade de hemoglobina (hipocrómicos (Harvey, 2008).

Os micoplasmas vense na superficie do eritrocito de xeito individual, en parellas ou en cadeas como un punteado azulado (Figura 1). As tinguiduras utilizadas para visualizalos poden ser Diff-quick, Romanowsky o Giemsa (Sykes, 2010).

O principal problema dos frotis sanguíneos é que tanto a sensibilidade como a especificidade son moi baixas; por exemplo, *Mhf* só é visible no 50% dos casos (Tasker, 2010). Podemos atopar tanto falsos negativos por desprendemento dos micoplasmas se o frotis non se realiza antes dunha hora postextracción do sangue, como falsos positivos se os confundimos con corpos de Howell-Jolly (Sykes, 2010; Tasker, 2010).

A aglutinación é outro achado característico da infección por *M. haemofelis* e débese a anemia hemolítica inmunomediada producida pola hiperproteinemia que cambia a carga da membrana dos glóbulos vermellos e favorece a súa agrupación (Palmero e Carballés, 2010; Sykes, 2010).

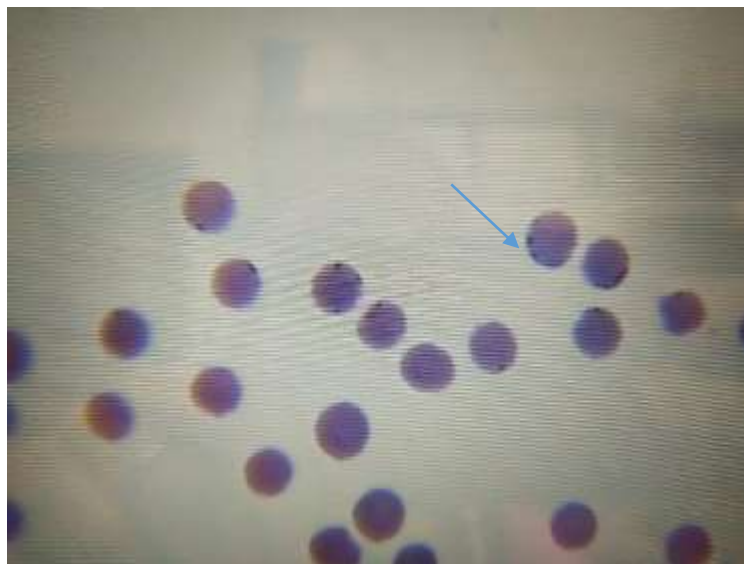


Figura 1. *Micoplasmas hemotrópicos na superficie dos eritrocitos. Frotis sanguíneo en Diff-quick, 1000x. Fonte propia.*

1.5.3 Proba de Coombs

Esta proba emprégase para demostrar que existe presenza de anticorpos na superficie dos eritrocitos. De xeito similar aos frotis, trátase dunha proba cunha baixa sensibilidade, polo que un

resultado negativo non descarta a infección. Ademais, nun estudo realizado no 2009 empregando esta proba en gatos infectados coas tres principais especies de micoplasmas hemotrópicos felinos, só se detectaron animais positivos nos gatos infectados experimentalmente con *Mhf*, polo que só se podería empregar para o diagnóstico desta especie (Tasker *et al.*, 2009b).

1.5.4 PCR

A reacción en cadea da polimerasa é a proba de elección para diagnosticar a infección por micoplasmas hemotrópicos, xa que é o método que presenta maior sensibilidade. Esta proba tipicamente detecta e amplifica o xene que codifica o fragmento 16S do ARNr dos micoplasmas hemotrópicos (Willi *et al.*, 2007b). É importante sinalar que as mostras de sangue se deben recoller sempre en tubos con EDTA, xa que a heparina de litio inhibe a PCR (Tasker, 2010).

Existen dous tipos de PCR que se poden empregar para a detección dos micoplasmas hemotrópicos, a PCR convencional e a PCR en tempo real (rt-PCR), sendo esta última a que se emprega con maior frecuencia. Entre as súas vantaxes atopamos que é máis específica e que permite cuantificar a cantidade de ADN dos micoplasmas hemotrópicos que presenta o paciente no sangue, de forma que se pode avaliar o curso da enfermidade e a resposta ao tratamento (Willi *et al.*, 2007b; Tasker, 2010).

1.6 Tratamento

O emprego de antibióticos como as tetraciclinas (doxiciclina, oxitetraciclina) ou as fluoroquinolonas (enrofloxacina, marbofloxacina) durante tres semanas logra a remisión da enfermidade clínica, e tamén a eliminación dos hemoplasmas do sangue (Foster, 2000; Tasker *et al.*, 2009a).

Para lograr a eliminación completa da infección un estudo realizado no ano 2018 propón empregar a doxiciclina 5 mg/kg dúas veces ao día por vía oral durante 28 días. Naqueles gatos que permanecían positivos a rt-PCR substituíron a doxiciclina polo marbofloxacino 2 mg/kg unha vez ao día por vía oral durante 14 días e, posteriormente, repetiron rt-PCR obtendo todos os resultados negativos. Este estudo tamén demostrou que tras un período de inmunosupresión con doses altas de metilprednisolona os gatos seguían sendo negativos a PCR, o que confirmaba que os protocolos de tratamento que eles propoñían eran suficientes para lograr eliminar completamente a bacteremia sanguínea provocada por *Mycoplasma haemofelis* (Novacco *et al.*, 2018).

Outro antibiótico que se adoita empregar logrando a eliminación completa dos micoplasmas é o enrofloxacino, a dose de 5 mg/kg unha vez ao día vía oral durante 14 días (Dowers, 2002).

En relación co tratamento da anemia, poden empregarse os glucocorticoides como a prednisolona a 1 a 2 mg/kg oral cada 12 horas (Harvey, 2008), pero só naqueles casos nos que o animal empeore a pesar da administración do antibiótico, cando se crea que a anemia hemolítica inmunomediada primaria teña un gran peso sobre a enfermidade ou cando o hemoplasma non sexa o principal responsable da anemia. No resto de casos é preferible non empregalos debido ao seu poder inmunosupresor que pode empeorar o cadro da enfermidade (Tasker, 2010).

A transfusión sanguínea debe realizarse nos casos no que o hematócrito estea por debaixo do 15 %, testando sempre aos animais doantes fronte a micoplasmas hemotrópicos (Foster, 2000; Palmero e Carballés, 2010). Tamén se recomenda administrar fluídos que inclúan glucosa intravenosa nos casos de animais graves e moribundos (Harvey, 2008).

Unha vez finalice o tratamento debería confirmarse mediante rt-PCR que o gato é negativo, dando por finalizada a bacteremia no sangue. Aínda que o resultado sexa negativo, para poder considerar cun risco mínimo que o gato non permanece como portador crónico debe repetirse esta análise dúas veces máis con intervalos dun mes (Tasker *et al.*, 2009a; Palmero e Carballés, 2010).

O pronóstico vai depender fundamentalmente de si o paciente presenta outras enfermidades concomitantes, do momento no que se comece a tratar e da facilidade ca que responda ao tratamento (Foster, 2000).

1.7 Prevención e control

Como medidas preventivas deben eliminarse os artrópodos que inxiran o sangue dos felinos mediante o emprego de produtos repelentes (fipronilo, selamectina, lotilaner...), e evitar a transmisión iatroxénica realizando análise mediante PCR ao doante antes de realizar a transfusión sanguínea, así como evitar compartir outros materiais como agullas, instrumentos quirúrxicos... (Foster, 2000; Harvey, 2008).

Polo momento non hai ningunha vacina fronte os micoplasmas hemotrópicos; non obstante, si existen na actualidade varios antíxenos candidatos a ser empregados en vacinas, como o dnaK (proteína de choque térmico 70 de la chaperona de ADN), pgk (fosfoglicerato quinasa), EF-Ts (factor de elongación - sensible a temperatura) y gapA (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa); ademais, estes polipéptidos poden empregarse tamén como marcadores da infección nos gatos (Barker *et al.*, 2012).

2. Obxectivos

Cos antecedentes descritos ata o de agora, os obxectivos propostos no presente Traballo de Fin de Grao foron os seguintes:

- 1°. Determinar se existe presenza de micoplasmas hemotrópicos nos gatos do noroeste de España e identificar de xeito molecular as especies atopadas.
- 2°. Determinar a influencia de factores como a idade, o sexo, a presenza de pulgas e o estilo de vida dos gatos sobre a presenza destes micoplasmas hemotrópicos.

3. Material e métodos

3.1 Criterios de selección

Este estudo levouse a cabo entre o 22 de setembro do 2022 e 15 de marzo do 2023. Durante este período recolléronse e analizáronse mostras dun total de 74 gatos, dos cales 68 eran de distintos concellos de Galicia (67 de Lugo e 1 de A Coruña), 4 procedían de Cantabria e 2 de Asturias.

As mostras foron extraídas das venas xugular ou ilíaca e enviadas ao laboratorio de Enfermidades Infecciosas da Facultade de Veterinaria de Lugo en tubos con EDTA nun sobre xunto ao historial dos animais. Ademais disto, coa información recollida de cada animal elaborouse un rexistro no cal se reflectían os datos de sexo, idade, estilo de vida e tamén se o animal presentaba pulgas no momento da recollida da mostra. Para as variables “idade” e “estilo de vida” establecéronse as seguintes categorías:

- Idade:
 - Gatos de menos de 12 meses.
 - Gatos entre 12 e 36 meses.
 - Gatos de máis de 36 meses.
- Estilo de vida:
 - Con acceso ao exterior (*outdoor*).
 - Sen acceso ao exterior (*indoor*).
 - Colonia.

3.2 Análise de laboratorio

3.2.1 Extracción de ADN

A partir das mostras de sangue enteiro realizouse unha extracción do ADN empregando un kit comercial (*High pure PCR template preparation kit*, Darmstadt, Alemania) adecuado para a obtención e purificación de ADN a partir de numerosos tipos diferentes de mostras. O protocolo empregado foi o descrito a continuación:

1. De cada tubo de EDTA transferimos a un tubo eppendorf 200 µl de sangue enteiro.
2. Engadimos 200 µl de *Binding Buffer* e 40 µl de *Proteínasa K* reconstituída a cada mostra.
3. Axitamos 1 minuto e incubamos 10 minutos a 70°C.
4. Engadimos 100 µl de isopropanol e axitamos 15 segundos.
5. Colocamos unha columna de filtrado nun tubo colector (Figura 2) e transferimos todo o contido dos eppendorf en cada correspondente columna.

6. Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
7. Colocamos a columna sobre un novo tubo colector e rexeitamos o restante.
8. Engadimos 500 μl de *Inhibitor Removal Buffer*.
9. Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
10. Colocamos a columna sobre un novo tubo colector e rexeitamos o restante.
11. Engadimos 500 μl de *Wash Buffer* (1º lavado).
12. Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
13. Colocamos a columna sobre un novo tubo colector e rexeitamos o restante.
14. Engadimos 500 μl de *Wash Buffer* (2º lavado).
15. Centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
16. Baleiramos o tubo colector e volvemos a colocar a columna.
17. Centrifugamos durante 3 minutos a 10400 rpm; este aumento de tempo de centrifuga faise para que se seque a membrana.
18. Colocamos a columna nun tubo eppendorf novo estéril onde se almacenará a mostra ata o seu análise, despois engadimos a cada columna 100 μl de *Elution Buffer* (prequentado a 70°C), deixamos a incubar 1 minuto e, posteriormente, centrifugamos 1 minuto a 9300 rpm.
19. Gardamos en conxelación a -80 °C os tubos eppendorf nos que temos o ADN extraído das mostras.

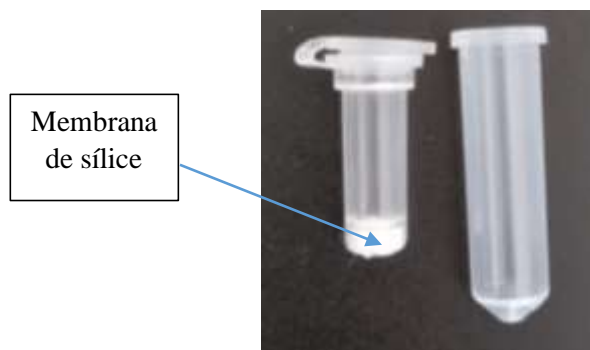


Figura 2. Columnas de filtrado e tubo colector empregados durante a extracción de ADN. Fonte propia.

3.2.2 PCR convencional

O ADN extraído a partir das mostras de sangue analizouse mediante PCR convencional para detectar a presenza de micoplasmas hemotrópicos mediante uns cebadores deseñados por Criado-Fornelio e colaboradores (2003); estes cebadores permiten detectar calquera dos micoplasmas hemotrópicos descritos ata a actualidade (Criado-Fornelio *et al.*, 2003).

O procedemento para realizar a PCR convencional descríbese a continuación:

1. Preparamos a *Master Mix* mesturando nun tubo eppendorf todos os reactivos necesarios para o correcto funcionamento da PCR (Táboa 3). Para calcular a cantidade de cada un destes reactivos precisamos multiplicar o volume final de cada un deles polo número de mostras que teñamos máis o control positivo e o negativo.

Táboa 3. Listado dos reactivos necesarios para a preparación da *Master Mix* empregada para a detección de micoplasmas hemotrópicos.

	Concentración inicial	Concentración final	Volume final/reacción
Cl₂Mg	50 mM	1,5 mM	1,5 µl
Tampón Tris-HCl	10 x	1 x	5 µl
Desoxirribonucleótidos trifosfato	2 mM	200 mM	5 µl
1F (Primer)¹	10 µM	1 µM	5 µl
1R (Primer)²	10 µM	1 µM	5 µl
Taq (encima polimerase)	5 UI/ µl	2,5 UI	0,5 µl
H₂O			25 µl
TOTAL			47 µl

¹Forward (HBT-F) = ATACGGCCCATATTCCTACG

²Reverse (HBT-R) = TGCTCCACCACTTGTTCA

2. Axitamos e centrifugamos durante 30 segundos a 9000 rpm.
3. Preparamos os tubos de PCR de 200 µl e en cada un engadimos 47 µl da *Master Mix* preparada no paso 1.
4. Engadimos 3 µl do ADN extraído no anterior protocolo a todas as mostras, menos aos controles positivos e negativos. Como control positivo empregouse unha mostra positiva a *Mycoplasma haemofelis* obtida e secuenciada previamente, e como control negativo auga bidestilada estéril. Este paso debemos facelo cos tubos inseridos nun pousatubos de frío para que a reacción de PCR non comece antes de tempo.
5. Centrifugamos os tubos de PCR a 1600 rpm durante un minuto.
6. Introducimos os tubos de PCR no termociclador (Bio-Rad T100, Bio-Rad Laboratories Inc., Estados Unidos) co seguinte protocolo térmico (Táboa 4):

Táboa 4. Protocolo térmico empregado para a amplificación das mostras de este estudo mediante PCR convencional.

Temperatura	Tempo	Ciclo
94 °C	10 minutos	1
95 °C	30 segundos	40
60 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundo	
72 °C	10 minutos	1

A continuación, para comprobar o resultado da PCR convencional é preciso visualizar os fragmentos obtidos en xel. O protocolo de electroforese que se segue é o seguinte:

1. Facemos o xel de agarosa ao 1 %: preparáramos nun matraz 60 ml de tampón TAE (trisaminometano, acetato e EDTA) a concentración 1x e engadimos 0,6 g de agarosa. Quentamos a mestura no microondas (1 min, 900 W) e cando comece a burbullar, paramos o microondas, axitamos o matraz e quentamos durante outros 30 segundos.
2. Deixamos arrefriar o matraz lixeiramente antes de engadir 3 μ l RedSafe, e removemos suavemente xirando o matraz para que non se formen burbullas. A solución de tinguidura de Ácidos Nucleicos RedSafe emite fluorescencia verde ao unirse ao ADN ou ARN tras a súa exposición a luz ultravioleta.
3. Preparáramos o soporte para o xel, axustándoo e equilibrándoo coa axuda do nivel. A continuación colocamos o peite, que serve para formar os pozos nos que colocaremos as mostras.
4. Baleiramos o xel nunha esquina do soporte para que non se formen burbullas e se reparta por si mesmo por toda a superficie. Deixamos solidificar durante 40 minutos.
5. Preparáramos unha placa de microtitulación con 2 μ l de tampón de mostra para cada unha das mostras.
6. Unha vez que o xel se endureza, retiramos primeiro o peite. A continuación, desmontamos o soporte de xel e colocámolo na cubeta de electroforese. Por último, cubrimos o xel con tampón TAE 1x.
7. Cargamos 5 μ l do Ladder no primeiro pozo do xel. Este ladder é o marcador que se emprega para estimar o tamaño dos fragmentos obtidos na PCR.
8. Cargamos as mostras e mesturamos 10 μ l de cada mostra co tampón de mostra que tiñamos preparado na placa de microtitulación. Cargamos todo o volume e dispensámolo no correspondente pozo situado no xel.
9. Pechamos a cubeta e configuramos o programa de electroforese (100 V, 400 mA, 45 min).
10. Unha vez rematado o tempo, apagamos a fonte de alimentación e abrimos a cubeta. Retiramos o soporte do xel e escorrémolo e secamos por debaixo cun anaco de papel.
11. Observamos os resultados no analizador de imaxes (Figura 3).

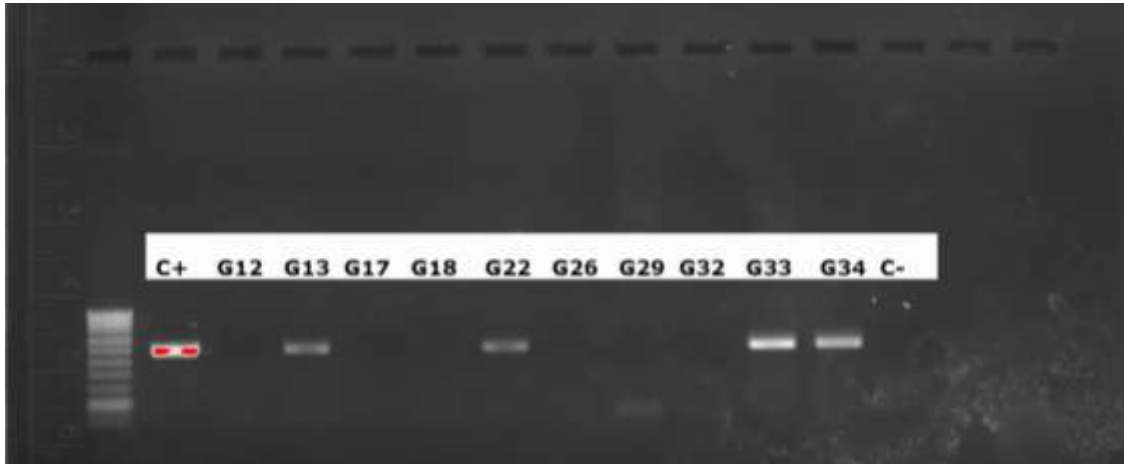


Figura 3. Imaxe obtida tras a electroforese en xel de agarosa ao 1% dos produtos de PCR obtidos a partir de mostras do presente estudo.

3.2.3 Secuenciación do ADN

Unha vez tivemos todas as mostras analizadas, aquelas que resultaron positivas cun tamaño do amplicón que coincide a mesma altura que o control positivo (entorno a 600 pb), enviáronse a un laboratorio externo (STABVida Lda., Caparica, Portugal) onde foron purificadas e secuenciadas mediante o método Sanger. Posteriormente, este laboratorio entréganos dous cromatogramas para cada mostra (un *Forward* e outro *Reverse*) que representan de maneira gráfica os nucleótidos recoñecidos para cada posición da secuencia do noso produto de PCR.

3.3 Análise filoxenético

3.3.1 Ensamblaxe e corrección de secuencias

Empregando o programa ChromasPro 2.1.4 (Technelysium, Brisbane, Australia) ensambláronse automaticamente os dous cromatogramas (*Forward* e *Reverse*) obtidos durante a secuenciación (Figura 4). O resultado foi unha única secuencia consenso que, posteriormente, foi revisada de xeito manual para corrixir as posibles discrepancias entre rexións homólogas, así como eliminar as rexións iniciais e finais que adoitan ser de mala calidade ou mesmo ilexibles.

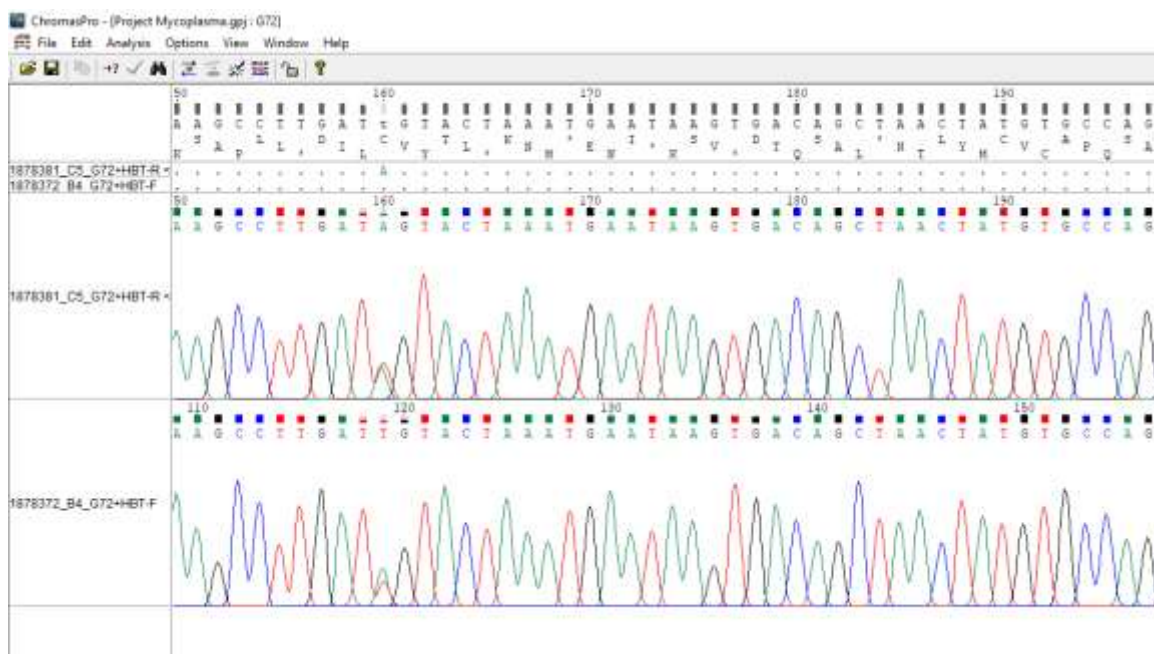


Figura 4. Vista da enxablaxe dos cromatogramas no programa ChromasPro 2.1.4.

3.3.2 Identificación de secuencias especies de *Mycoplasma* spp. hemotrópicos

Cada secuencia consenso obtida neste estudo comparouse coas previamente descritas na base de datos GenBank, empregando para iso a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) da propia páxina do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Deste xeito, cada secuencia deste traballo clasificouse como unha ou outra especie de *Mycoplasma* spp. en función da homoloxía obtida mediante o emprego da BLAST.

3.3.3 Aliñamento

Previo a construción da árbore filoxenética realizouse o aliñamento de todas as secuencias consenso obtidas. Para isto se empregou o algoritmo ClustalW inxerido no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis X* (MEGA X) 10.0 (Kumar *et al.*, 2018).

Neste aliñamento tamén se engadiron secuencias que se atopaban na base de datos do GenBank do NCBI para poder construír unha árbore filoxenética baseada nas relacións evolutivas existentes entre os diferentes micoplasmas hemotrópicos descritos nesta base de datos. Ademais, engadíronse secuencias doutros micoplasmas non hemotrópicos que servisen como *outgroup* para poder enraizar a árbore e deste xeito obter unha topografía máis realista (Táboa 5).

Táboa 5. Datos das secuencias descritas na base do GenBank empregadas para a realización do análise filoxenético.

Secuencia	Nº de acceso GenBank
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemovis</i> ”	JF931133.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemovis</i> ”	KU983755.1
<i>Mycoplasma ovis</i>	JF931135.1
<i>Mycoplasma ovis</i>	MH379800.1
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	KY412804.1
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	OP394157.1
<i>Mycoplasma parvum</i>	AB610850.1
<i>Mycoplasma parvum</i>	JX489599.1
<i>Mycoplasma suis</i>	KF740480.1
<i>Mycoplasma suis</i>	EU603330.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ”	MW598402.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ”	AY297712.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ”	MZ221181.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> ”	KC762746.1
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	MW633343.1
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	EU145745.1
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	MZ221174.1
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	MT345534.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ”	EU367965.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> ”	MH388481.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ”	DQ464425.1
“ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ”	DQ464422.1
<i>Mycoplasma agalactiae (outgroup)</i>	AY526880.1
<i>Mycoplasma agalactiae (outgroup)</i>	M24290.2
<i>Mycoplasma bovis (outgroup)</i>	KM576849.1
<i>Mycoplasma bovis (outgroup)</i>	JX993354.1

3.3.4 Construción da árbore filoxenética

O primeiro paso para construír unha arbore filoxenética é elixir o modelo de substitución nucleotídica que mellor encaixa co aliñamento obtido. Para isto empregouse o criterio de Akaike (AIC – *Akaike Information Criterion*) implementado no programa jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012). Así, debe seleccionarse o modelo que presente un menor valor de AIC, que no noso caso foi o GTR + I + G (*General Time Reversible + Invariant sites + Gamma-distributed*).

Finalmente, a árbore construíuse mediante inferencia bayesiana empregando o programa MrBayes 3.2.7. (Ronquist *et al.*, 2012). Para xerar esta árbore escolleuse o modelo indicado anteriormente e se seleccionou unha cadea de 10.000.000 xeracións na que cada 1.000 repeticións se tomaba unha mostra; deste xeito, se obtiveron un total de 10.000 árbores que permitiron construír a árbore consenso final.

3.4 Análise estatística

Por último, realizouse unha análise estatística para avaliar se as variables recollidas (sexo do gato, a presenza de pulgas, o seu estilo de vida -colonia, acceso ao exterior e sen acceso ao exterior- e a idade -menor de 12 meses, entre 12-36 meses e maior de 36 meses-) influían na positividade a micoplasmas hemotrópicos. Deste xeito, realizáronse táboas de continxencia e comparáronse estes factores de risco e os resultados obtidos mediante a proba de Chi-cadrado de Pearson, empregando para isto o programa R v. 4.2.2 (Viena, Austria). Nos casos nos que se observaron diferencias significativas, realizáronse posteriormente comparacións individuais entre os diferentes factores de risco e a positividade dos animais empregando o mesmo test estatístico para localizar entre cales variables se atopaba a diferenza. A relación estatística considerouse significativa cando o p-valor obtido foi inferior a 0,05.

4. Resultados e discusión

4.1 Presenza de micoplasmas hemotrópicos

Das 74 mostras de sangue de gatos de Galicia, Asturias e Cantabria que se analizaron neste estudo obtivéronse 12 animais positivos ás diferentes especies de micoplasmas hemotrópicos, o que se corresponde cunha porcentaxe do 16,22 % de gatos positivos (Táboa 6).

Comparando con outros estudos realizados en España, concretamente en Madrid (10,6 %) e Barcelona (14 %), a porcentaxe atopada neste estudo é superior. Non obstante, si o comparamos con Portugal a porcentaxe é máis baixa, xa que no centro e sur de dito país foi dun 27,1 % e no norte dun 43,43 %. Cabe sinalar que en todos os estudos mencionados o número de gatos analizados era superior ao incluído neste estudo (Martínez-Díaz *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2015; Díaz-Regañón *et al.*, 2018; Álvarez-Fernández *et al.*, 2022).

4.2 Especies de micoplasmas hemotrópicos atopadas

Como se pode ver na Táboa 6 atopáronse catro especies de micoplasmas diferentes, todas elas cun porcentaxe de homoloxía entre o 94,35% e o 100% con secuencias previamente descritas na base de datos GenBank. Isto indica que as mostras obtidas neste estudo tiñan unha boa porcentaxe de homoloxía con respecto as especies identificadas mediante BLAST en cada caso.

As especies de micoplasmas hemotrópicos atopadas e o seu porcentaxe de detección foron as seguintes:

- *Mycoplasma haemofelis*: 6,76 % (5/74)
- “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”: 6,76 % (5/74)
- *Mycoplasma wenyonii*: 1,35 % (1/74)
- “*Candidatus Mycoplasma haemobos*”: 1,35 % (1/74).

Mycoplasma haemofelis e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” están descritas como especies propias dos felinos xunto a “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”; cabe mencionar que desta última non se obtivo ningún resultado positivo nas mostras incluídas neste estudo. A porcentaxe de detección de *Mhf* e *Mhm* deste traballo de fin de grado foron iguais para ambas especies (6,76 %), sendo similares ás atopadas en Madrid e Barcelona, pero moi inferiores as atopadas nos dous estudos portugueses. Nestes estudos as prevalencias de *Mhf* foron do 3,7 % en Madrid, 5,9 % en Barcelona, 14,4 % no centro e sur de Portugal e 12,81 % no centro-norte de Portugal. No caso de *Mhm*, considerada a especie máis habitual, as prevalencias foron do 8,1 % en Madrid, 4,4 % en Barcelona, 17,8 % no centro e sur de Portugal e do 41,56 % no centro-norte

de Portugal. En relación con *Mtc*, o presente estudo foi o único dos realizados na península ibérica no que non se atoparon gatos infectados por esta especie; isto pode deberse a que o número de gatos incluídos no presente estudo foi inferior, pero tamén pode deberse a diferenzas xeográficas, xa que o presente estudo se realizou unicamente con gatos que viven na zona norte da península (Martínez-Díaz *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2015; Díaz-Regañón *et al.*, 2018; Álvarez-Fernández *et al.*, 2022).

Polo que respecta a *Mycoplasma wenyonii* e “*Candidatus Mycoplasma haemobos*”, estas son especies descritas en bovinos, polo que atopar resultados positivos en gatos en Galicia foi un achado inesperado. A presenza destes micoplasmas hemotrópicos característicos da especie bovina representa unha das primeiras citas da detección dos mesmos na especie felina; de feito, no caso de “*Candidatus Mycoplasma haemobos*”, este é o primeiro estudo que describe esta especie nos gatos. A primeira descrición de *Mycoplasma wenyonii* en gatos foi no estudo realizado no ano 2022 en Barcelona, no cal se detectou un único animal positivo a esta especie; como foi posible a infección por *M. wenyonii* non está totalmente clara, pero os autores especulan que o contacto entre bovinos e gatos cando comparten o mesmo ecosistema poda ser o culpable desta infección accidental (Álvarez-Fernández *et al.*, 2022). No presente estudo, as dúas mostras positivas a estes micoplasmas típicos de bovinos proviñan de gatos do rural, unha de Vimianzo e a outra de Castro de Rei, que en ambos casos son zonas con abundante gandería de vacún de leite o que podería explicar unha infección accidental por contacto co gando vacún.

Táboa 6. Resume dos datos das mostras positivas a *Mycoplasma* spp. hemotrópicos neste estudo, coa identificación a nivel de especie e porcentaxe de homoloxía coas secuencias previamente descritas en

Código mostra	Sexo	Pulgas	Estilo de vida	Idade (meses)	Lugar	Especie	Homoloxía (%)
G.6	Macho	Si	Acceso ao exterior	48	Begonte (Lugo)	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	94,35
G.7	Femia	Si	Acceso ao exterior	5	Castro de Rei (Lugo)	<i>Mycoplasma haemobos</i>	99,81
G.8	Femia	Si	Acceso ao exterior	12	Vimianzo (A Coruña)	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	99,83
G.13	Macho	Si	Colonia	36	Lugo (Lugo)	“Candidatus Mycoplasma haemominutum”	100
G.22	Macho	Si	Colonia	96	Lugo (Lugo)	“Candidatus Mycoplasma haemominutum”	99,84
G.33	Macho	Si	Acceso ao exterior	24	Lugo (Lugo)	“Candidatus Mycoplasma haemominutum”	99,84
G.34	Femia	No	Acceso ao exterior	24	Camargo (Cantabria)	“Candidatus Mycoplasma haemominutum”	99,67
G.62	Macho	Si	Colonia	6	Lugo (Lugo)	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	99,83
G.63	Macho	Si	Colonia	72	Lugo (Lugo)	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	99,83
G.67	Femia	Si	Colonia	24	Lugo (Lugo)	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	99,83
G.72	Macho	Si	Acceso ao exterior	47	Lugo (Lugo)	“Candidatus Mycoplasma haemominutum”	99,51
G.88	Macho	No	Acceso ao exterior	5	Gijón (Asturias)	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	99,83

GenBank.

4.3 Árbore filoxenética

En relación co estudo filoxenético baseado nas relacións evolutivas construído a partir do modelo GTR + I + G obtívose a árbore que se mostra a continuación na Figura 5. Esta árbore filoxenética permite ver as relacións existentes entre as diferentes especies do estudo e as especies de referencia recollidas da base de datos GenBank.

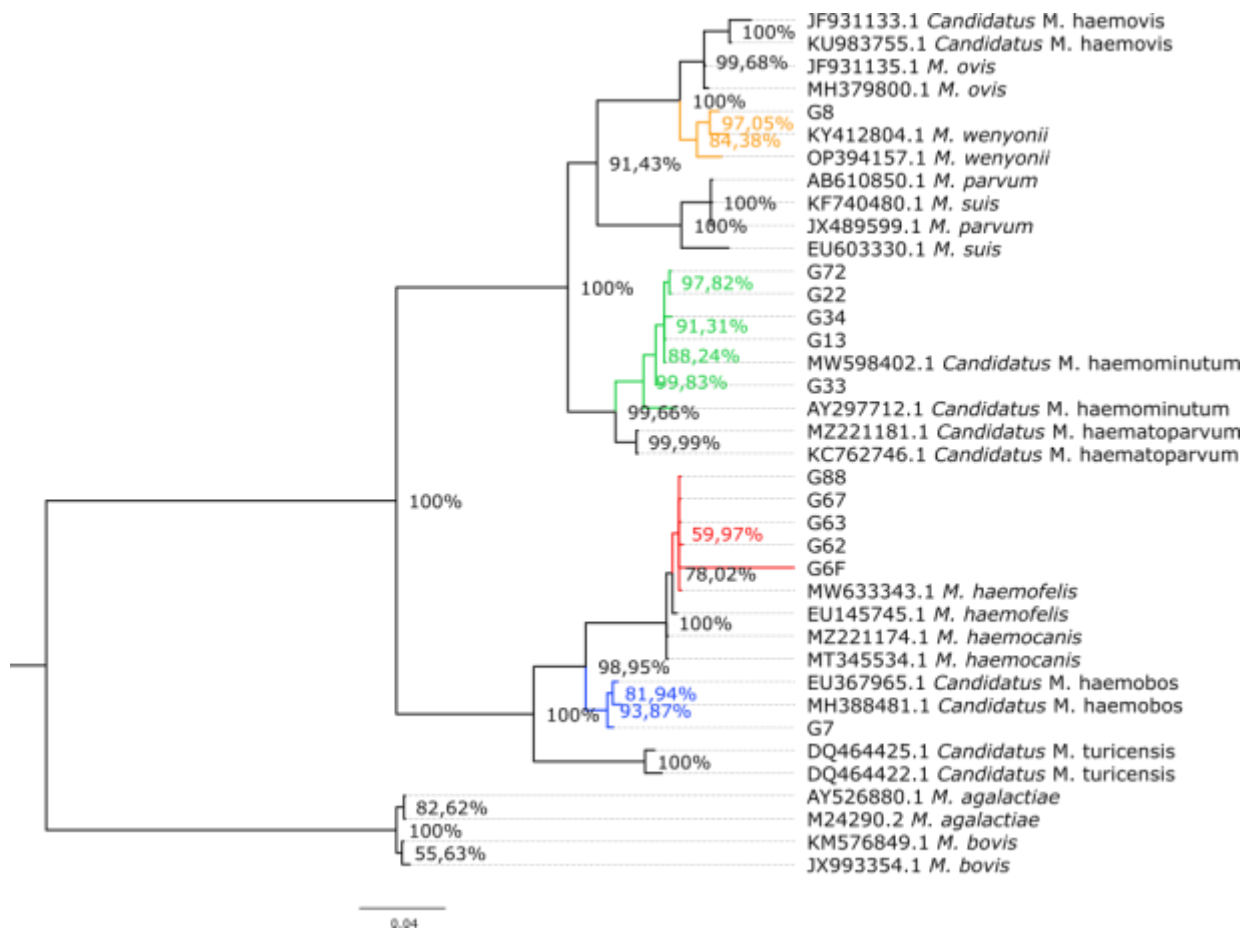


Figura 5. Árbore filoxenética obtida a partir das mostras de este estudo e secuencias de referencia da base de datos GenBank. En diferentes cores móstranse os subclados para as diferentes especies atopadas neste traballo (amarelo: *M. wenyonii*; verde: “*Candidatus M. haemominutum*”; vermello: *M. haemofelis*; azul: “*Candidatus M. haemobos*”). As porcentaxes próximas aos nodos das ramas da árbore sinalan a probabilidade posterior obtida para dito nodo no análise filoxenético.

Se observamos a árbore filoxenética en detalle vemos que todas as mostras e as especies de referencia escollidas parten dun antecesor común. Na parte inferior da árbore encontramos as especies de *Mycoplasma* spp. non hemotrópicas escollidas neste estudo como *outgroup* para poder realizar o enraizamento da árbore, mentres na parte superior vemos como as especies de micoplasmas hemotrópicos se dividen en dous clados claramente diferenciados:

- O clado superior divídese a súa vez en dous subclados, atopando no superior a mostra G8 estreitamente relacionada cas dúas especies de referencia de *M. wenyonii*, o cal confirma

o resultado de homoloxía obtido coa ferramenta BLAST. Cabe sinalar que nesta mesma rama atópanse tamén as especies “*Candidatus M. haemovis*” e *M. ovis*, típicas da especie ovina, e neste mesmo subclado pero noutra rama máis separada encóntranse tamén as especies *M. suis* e *M. parvum*, típicas do gando porcino. No subclado inferior atopamos as mostras G.72, G.22, G.34, G.13 e G33 xuntas na mesma rama coas secuencias de referencia de *Mhm*, o cal confirma de novo os resultados do BLAST, estando tamén moi relacionadas coas especies de “*Candidatus M. Hematoparvum*” pero que se encontran noutra rama lixeiramente separada pero no mesmo subclado.

- O clado inferior presenta tres ramas, onde en relación coa raíz da árbore podemos diferenciar unha primeira coas secuencias de referencia de *Mtc* e unha segunda coas secuencias de “*Candidatus M. haemobos*” onde se sitúa a mostra G7 deste estudio. A terceira rama recolle as mostras G.88, G.67, G.63, G.62 e G6F, que están directamente relacionadas coas mostras de referencia de *Mhf* e moi próximas as secuencias de *M. haemocanis*, o que indica que ambas especies están moi relacionadas dende un punto de vista filoxenético.

4.4 Factores de risco avaliados que poden influír na transmisión

A partir dos resultados obtidos neste estudo, as variables “sexo” e “idade” non parecen influír sobre a presenza de micoplasmas hemotrópicos nesta poboación (p-valor > 0,05). Sen embargo, as variables “presenza de pulgas” e “estilo de vida”, e dentro de esta en concreto a categoría “con acceso ao exterior” respecto da categoría “colonia”, si mostraron significativamente unha maior positividade a micoplasmas hemotrópicos (p-valor < 0,05). A continuación, móstranse as táboas de continxencia empregadas (Táboas 7, 8, 9 e 10), así como o estatístico χ^2 e os p-valores obtidos na análise estatística (Táboa 11).

Táboa 7. Táboa de continxencia para as variables sexo e positividade á PCR.

SEXO	Resultados de micoplasmas hemotrópicos		
	Negativo	Positivo	Total xeral
Femia	29	4	33
Macho	33	8	41
Total xeral	62	12	74

Táboa 8. Táboa de continxencia para as variables idade e positividade á PCR.

IDADE	Resultados de micoplasmas hemotrópicos		
	Negativo	Positivo	Total xeral
>36 meses	10	4	14
<12 meses	36	4	40
12-36 meses	15	4	19
Total xeral	62	12	74

Táboa 9. Táboa de continxencia para as variables presenza de pulgas e positividade á PCR.

PULGAS	Resultados de micoplasmas hemotrópicos		
	Negativo	Positivo	Total xeral
Negativo	29	2	31
Positivo	32	10	42
Total xeral	61	12	73

Táboa 10. Táboa de continxencia para as variables estilo de vida e positividade á PCR.

ESTILO DE VIDA	Resultados de micoplasmas hemotrópicos		
	Negativo	Positivo	Total xeral
Colonia	38	5	43
Sen acceso ao exterior	9	0	9
Acceso ao exterior	15	7	22
Total xeral	62	12	74

Táboa 11. Resultados da proba de Chi-cadrado para cada unha das variables estudadas en relación coa positividade a micoplasmas hemotrópicos.

Variables analizadas	Chi-cadrado	p-valor
Sexo/positividade	0,7351	0,3912
Pulgas/positividade	3,912	0,048
Estilo de vida/positividade	6,3498	0,0418
Colonia/sen acceso ao exterior	1,158	0,282
Colonia/con acceso ao exterior	3,941	0,048
Sen acceso ao exterior/con acceso ao exterior	3,699	0,054
Idade/positividade	3,002	0,2229

Entre os datos recollidos dos animais deste estudo encontrábase o sexo dos animais, no que dos 74 gatos estudados 33 eran femias e 41 eran machos. Das femias só catro foron positivas, mentres que nos machos houbo oito gatos positivos; isto significa que o 12,12 % das femias e o 19,51 % dos machos do estudo eran positivos a algún dos micoplasmas hemotrópicos. Non obstante, estatisticamente non se atoparon diferencias significativas neste traballo, se ben é certo que o número de animais deste estudo non é moi elevado e isto puido influír neste sentido. Este resultado concorda con algúns estudos nos que tampouco se sinala asociación estatística entre o sexo e a positividade a micoplasmas hemotrópicos (Martínez-Díaz *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2015). Con todo, a pesar de non ser estatisticamente significativo, a maior porcentaxe de gatos machos infectados concorda cos autores que si asocian o sexo a unha maior positividade; estes autores defenden que os machos enteiros, ao estar máis involucrados en liortas nas que se producen mordeduras, e tamén ao desprazarse máis lonxe tendo máis probabilidade de contacto con outros gatos, poden estar máis expostos á infección resultando nun maior número de positivos (Martínez-Díaz *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2015; Álvarez-Fernández *et al.*, 2022). Que o sexo masculino estea máis involucrado na positividade reforza a idea de que as liortas que implican mordeduras entre os gatos poden propiciar a transmisión directa entre un gato positivo e un gato san. Ademais, confirmouse cun estudo de inoculación de *Mtc* vía subcutánea que son suficientes dúas gotas de sangue (10 μ L) para mostrar resultados positivos mediante PCR en gatos previamente sans (Museux *et al.*, 2009).

A idade foi outro dos factores que se tivo en conta á hora de recoller os datos dos gatos. Neste caso fixéronse tres grupos: o primeiro e máis numeroso, con 40 gatos de idade menor ou igual a 12 meses e no que houbo catro animais positivos (10 %); o segundo, con 19 gatos entre 12 e 36 meses, no que tamén houbo catro positivos (21 %); e o terceiro, eran 14 gatos de máis de 36 meses, onde outra vez atopamos catro positivos (29 %). Ao estudar a esta variable non se atoparon diferenzas significativas, o cal é oposto ao descrito por outros autores que mostran certa asociación entre a idade e a infección ao encontrar máis positivos nos gatos adultos; estes autores xustifican este achado polo feito de que os gatos de máis idade puideron estar expostos aos artrópodos chupadores durante máis tempo, ademais dunha maior probabilidade de interaccións agresivas neste grupo de idade que nos gatos máis novos (Sykes *et al.*, 2007; Martínez-Díaz *et al.*, 2013; Díaz-Regañón *et al.*, 2018). Así, aínda que no presente estudo hai unha maior porcentaxe de gatos positivos na categoría de gatos adultos, o feito de que non se atopase ningunha relación estatisticamente significativa pode estar probablemente relacionado co pequeno tamaño da mostraxe.

A transmisión de micoplasmas hemotrópicos en gatos mediante artrópodos, e especialmente mediante pulgas (*Ctenocephalides felis*), é un dos mecanismos máis estudados; con todo, non se chega a un acordo de consenso entre os autores. Neste estudo, o 23,8 % dos animais que foron

positivos a micoplasmas hemotrópicos presentaban pulgas, fronte só a un 6,45 % dos animais positivos nos que non se evidenciou a presenza deste parasito. Así a todo, debemos mencionar que todos os animais positivos que non presentaban pulgas si que tiñan acceso ao exterior, polo que non se pode descartar que, a pesar de que no momento da toma de mostras non se atoparon pulgas, non as tiveran previamente. O porcentaxe de animais positivos e con pulgas deste estudo é parecido ao descrito en Reino Unido, onde se demostrou que o 36,4 % das mostras recollidas de gatos con pulgas foron positivas (Shaw *et al.*, 2004). En relación co estudo estatístico, no presente traballo si se atoparon diferencias significativas ao estudar a presenza de pulgas, o que reforza a idea da súa implicación na transmisión destes micoplasmas hemotrópicos.

Outro dato importante a ter en conta é que gran parte das mostras recollidas neste traballo de fin de grado recolléronse nos meses de inverno, entre o 22 de setembro do 2022 e 15 de marzo do 2023, nos cales as pulgas teñen menor actividade polo momento do ciclo no que se atopan. Estudos como o realizado en Madrid apoian a idea de que un tempo cálido inflúe na presenza de pulgas e por tanto na transmisión de micoplasmas hemotrópicos, xa que se observou unha maior presenza de animais positivos (63,5 %) nas mostras recollidas durante a primavera e o verán que nas recollidas en outono e inverno (36,5 %) (Díaz-Regañón *et al.*, 2018). Con todo, hai lugares onde non abundan as pulgas e se detectan igualmente gatos positivos aos micoplasmas hemotrópicos, o que suxire que existan outros mecanismos de transmisión (Jensen, 2001).

En relación a transmisión de micoplasmas hemotrópicos mediante pulgas, e respecto a detección de *Mycoplasma wenyonii* e “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” en mostras de gatos de este estudo, unha posible explicación para este achado podemos atopala na presenza destes axentes en vectores diferentes das pulgas, como por exemplo os mosquitos. No caso de *Mycoplasma wenyonii*, coñécese que algunha especie de culícidos como *Aedes aegypti* pode ser vector potencial deste patóxeno, xa que se descubriron exemplares na natureza que contiñan ADN deste micoplasma hemotrópico (Reagan *et al.*, 2017); con todo, este vector específico non está presente en Galicia, pero non podemos descartar por completo que outros vectores similares poidan estar implicados na transmisión. Aínda que non se demostrou se os mosquitos poden transmitir este micoplasma hemotrópico típico do vacún, nese mesmo traballo si se logrou a infección experimental de mosquitos no laboratorio tras alimentarse de gatos positivos a *Mhm* e *Mhf*, resultando positivos a ambos micoplasmas; con todo, ningún gato san se infectou tras a exposición aos mosquitos positivos a *Mhm* e *Mhf*, o que non aclara a súa implicación na transmisión (Reagan *et al.*, 2017). Esta podería ser unha liña de traballo a continuar a partir dos resultados que se obtiveron neste estudo de gatos positivos a micoplasmas hemotrópicos de bovinos.

O estilo de vida dos gatos é outro dos factores que parece influír na positividade dos animais. A maioría das mostras proviñan de gatos de colonia, cunha porcentaxe do 11,63 % de mostras positivas nestes animais (5/43); con todo, a maior porcentaxe de animais positivos (31,82 %) atopouse na categoría de gatos que eran de propietario e tiñan acceso ao exterior (7/22). Por último, os nove gatos que non tiñan acceso ao exterior todos resultaron negativos. Deste xeito, pódese observar que todos os gatos positivos a micoplasmas hemotrópicos do estudo viven en colonias ou teñen acceso ao exterior, motivo polo que teñen mais contacto con outros animais ou están mais expostos a posibles vectores. Así, isto reforza novamente a idea da transmisión ben por contacto directo ou ben mediante vectores. A pesar de que no presente estudo non se atopou ningún gato positivo sen acceso ao exterior, estudos como o de Barcelona demostran que si é posible. A explicación máis razoable para isto é que estes gatos puideron estar en contacto con pulgas cando eran máis pequenos, non se sabe o tempo que levaban cos seus donos, ou que a transmisión puido ser a través da nai; este último mecanismo non está estudado pero tampouco se descarta que sexa posible (Álvarez-Fernández *et al.*, 2022). Dende un punto de vista estatístico, a variable "estilo de vida" parece influír sobre a porcentaxe de gatos infectados; con todo, ao facer as comparacións das categorías desta variable dous a dous unicamente se observaron diferenzas significativas entre a vida en colonia e os gatos de propietario con acceso ao exterior, cunha maior porcentaxe de infectados nesta última categoría, aínda que hai que salientar tamén que a diferenza entre as categorías "sen acceso ao exterior" e "con acceso ao exterior" tende tamén a significación (p -valor = 0,054). Isto posiblemente sexa debido a unha falta de potencia estatística da mostraxe, xa que o dividir os datos en tres categorías o número resultante de cada un é pequeno, o que dificulta a aparición de diferenzas significativas. Non obstante, o feito de que os gatos de propietario vaian xeralmente de xeito máis frecuente ás clínicas veterinarias que os gatos de colonia tamén pode favorecer que se diagnostique esta infección nunha maior porcentaxe destes animais.

5. Conclusións

1ª. A porcentaxe de gatos infectados con micoplasmas hemotrópicos é do 16,22 % neste estudo realizado no noroeste de España.

2ª. Das especies de micoplasmas hemotrópicos propias dos gatos, neste estudo só se atoparon *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, mentres que “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” non se atopou en ningún dos gatos analizados.

3ª. Neste traballo atopáronse dous gatos positivos a *Mycoplasma wenyonii* e “*Candidatus Mycoplasma haemobos*”, sendo ambas as dúas especies de micoplasmas cuxo hospedeiro principal son os bóvidos. No caso de “*Candidatus Mycoplasma Haemobos*”, este estudo supón a primeira descrición desta especie en gatos.

4ª. As variables sexo e idade non mostraron asociación estatisticamente significativa ca presenza de micoplasmas hemotrópicos nos gatos analizados.

5ª. A variable “presenza de pulgas” si demostrou estatisticamente ser un factor de risco para a infección con micoplasmas hemotrópicos, o cal reforza a idea da transmisión destes patóxenos mediante vectores.

6ª. O estilo de vida dos gatos parece influír na probabilidade de infección con micoplasmas hemotrópicos, xa que unicamente se atoparon animais infectados entre os que viven en colonias e os que viven en domicilios con acceso ao exterior; isto apoia a teoría da transmisión directa e da transmisión mediante vectores, xa que os animais destas categorías teñen máis probabilidade de contacto entre si e tamén cos posibles vectores.

6. Bibliografía

- Álvarez-Fernández, A., Maggi, R., Martín-Valls, G.E., Baxarias, M., Breitschwerdt, E.B., Solano-Gallego, L., 2022. Prospective serological and molecular cross-sectional study focusing on *Bartonella* and other blood-borne organisms in cats from Catalonia (Spain). *Parasit Vectors* 15, 1–14.
- Barker, E., Peters, I., Helps, C., Tasker, S., 2012. Methods of diagnosis and vaccines (WO 2012/010849 A2). Acceso online: <https://patentimages.storage.googleapis.com/70/cf/8c/174597f58f3026/WO2012010849A2.pdf>
- Barker, E.N., 2019. Update on Feline Hemoplasmosis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 49, 733–743.
- Baumann, J., Novacco, M., Riond, B., Boretti, F.S., Hofmann-Lehmann, R., 2013. Establishment and characterization of a low-dose *Mycoplasma haemofelis* infection model. *Vet Microbiol* 167, 410–416.
- Brown, D.R., May, M., Janet M. Bradbury, J.M., Karl-Erik Johansson K.E., Neimark, H., 2010. Order I. Mycoplasmatales, in: Krieg, N., Ludwig, W., Whitman, W., Hedlund B., Paster, B., Staley, J., Ward, N., Brown, D. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, pp. 574–612.
- Clark, R., 1942. *Eperythrozoon felis* (SP.NOV) in a cat. *Journal of African Veterinary Medicine Association* 13, 15–16.
- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: A molecular study. *Vet Microbiol* 93, 307–317.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9, 772–772.
- Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllón, T., Rodríguez-Franco, F., García-Sancho, M., Agulla, B., Sainz, Á., 2018. Epidemiological study of hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in cats from central Spain. *Parasit Vectors* 11, 1–9.
- Dowers KL, Olver C, Radecki SV, Lappin MR, 2002. Use of enrofloxacin for treatment of large-form *Haemobartonella felis* in experimentally infected cats. *J Am Vet Med Assoc* 251, 250–253.

- Duarte, A., Marques, V., Correia, J.H.D., Neto, I., Bráz, B.S., Rodrigues, C., Martins, T., Rosado, R., Ferreira, J.P., Santos-Reis, M., Tavares, L., 2015. Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal. *J Feline Med Surg* 17, 516–522.
- Estela Quiroz-Castañeda, R., Amaro-Estrada, I., Rodríguez-Camarillo, S., Hugo Aguilar-Díaz, J., 2020. Micoplasmas hemotrópicos, presencia y métodos de detección en animales con importancia veterinaria. *Revista de Salud Animal* 42, 1–9.
- Ford William W, Eliot Calista P., 1928. The transfer of rat anemia to normal animals. *J Exp Med* 48, 475–492.
- Foster, D., 2000. *Haemobartonella felis*, in: Day, M., Mackin, A., Littlewood, J. (Eds.), *Manual of Canine and Feline Hematology and Transfusion Medicine*. British Small Animal Veterinary Association, pp. 79–83.
- Gary, A.T., Richmond, H.L., Tasker, S., Hackett, T.B., Lappin, M.R., 2006. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in blood of cats used for transfusions. *J Feline Med Surg* 8, 321–326.
- Gladden, N., Haining, H., Henderson, L., Marchesi, F., Graham, L., McDonald, M., Murdoch, F.R., Bruguera Sala, A., Orr, J., Ellis, K., 2016. A case report of *Mycoplasma wenyonii* associated immune-mediated haemolytic anaemia in a dairy cow. *Ir Vet J* 69, 1–8.
- Harvey J.W., 2008. Micoplasmosis hemotrófica (hemobartonelosis), in: Greene C.E. (Ed.), *Enfermedades Infecciosas Del Perro y Del Gato*. Elsevier, Buenos Aires, pp. 282–291.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547.
- Jensen WA, 2001. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am J Vet Res* 62, 604–608.
- Lobetti, R., 2007. Hemoplasmosis felina, in: *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings*. pp. 1–3.
- Martínez-Díaz, 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. *J Feline Med Surg* 15, 879–885.
- Méndez, L.C., Montoya, L.N.F., Mazo, M.M., Sepúlveda, J.C., Valencia, E., Portilla, T., Restrepo, L., 2022. Diagnostic comparison between cytological and molecular analysis for the detection of *Mycoplasma haemofelis* in resident cats of the city of Pereira, Risaralda, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 33.

- Museux, K., Boretti, F.S., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., Wittenbrink, M.M., Tasker, S., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2009. In vivo transmission studies of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” in the domestic cat. *Vet Res* 40, 1–14.
- 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*”. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 891–899.
- Neitz, W.O., 1934. *Eperythrozoon Ovis* (sp. nov.) Infection in Sheep. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal* 3, 263–271.
- Novacco, M., Sugiarto, S., Willi, B., Baumann, J., Spiri, A.M., Oestmann, A., Riond, B., Boretti, F.S., Naegeli, H., Hofmann-Lehmann, R., 2018. Consecutive antibiotic treatment with doxycycline and marbofloxacin clears bacteremia in *Mycoplasma haemofelis*-infected cats. *Vet Microbiol* 217, 112–120.
- Palmero Colado, M.L., Carballés Pérez, V., 2010. Anemia infecciosa, in: SERVET (Ed.), *Enfermedades Infecciosas Felinas*. Grupo Asís Biomedica S.L., Zaragoza, pp. 291–309.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, Viena, Austria. Disponible online: <http://www.R-project.org/> acceso o 5 Xuño de 2023
- Reagan, K.L., Clarke, L.L., Hawley, J.R., Lin, P., Lappin, M.R., 2017. Assessment of the ability of *Aedes* species mosquitoes to transmit feline *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”. *J Feline Med Surg* 19, 798–802.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61, 539–542.
- Roura, X., Peters, I.R., Altet, L., Tabar, M.-D., Barker, E.N., Planellas, M., Helps, C.R., Francino, O., Shaw, S.E., Tasker, S., 2010. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. *J Vet Diagn Invest* 22, 270–274.
- Shaw, S.E., Kenny, M.J., Tasker, S., Birtles, R.J., 2004. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Vet Microbiol* 102, 183–188.
- Sykes, J.E., 2010. Feline hemotropic mycoplasmas. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 20, 62–69

- 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. *J Vet Intern Med* 21, 685–693.
- Sykes JE, Terry JC, Lindsay LL, Owens SD, 2008. Prevalences of various hemoplasmas species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 232, 372–379.
- Tasker, S., 2010. Haemotropic mycoplasmas. What's their real significance in cats? *J Feline Med Surg* 12, 369–381.
- Tasker, S., Lappin, M.R., 2002. *Haemobartonella felis*: Recent developments in diagnosis and treatment. *J Feline Med Surg*.
- Tasker, S., Peters, I.R., Day, M.J., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T.J., Helps, C.R., 2009a. Distribution of *Mycoplasma haemofelis* in blood and tissues following experimental infection. *Microb Pathog* 47, 334–340.
- Tasker, S., Peters, I.R., Papasouliotis, K., Cue, S.M., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T.J., Knowles, T.G., Day, M.J., Helps, C.R., 2009b. Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: Copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. *Vet Microbiol* 139, 323–332.
- Wang, X., Cui, Y., Zhang, Y., Shi, K., Yan, Y., Jian, F., Zhang, L., Wang, R., Ning, C., 2017. Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma ovis* and “*Candidatus* *Mycoplasma haemovis*”) in sheep and goats in China. *BMC Vet Res* 13, 1–8.
- Willi, B., Boretti, F.S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2006a. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* 44, 961–969.
- Willi, B., Tasker, S., Boretti, F.S., Doherr, M.G., Cattori, V., Meli, M.L., Lobetti, R.G., Malik, R., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2006b. Phylogenetic analysis of “*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*” isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. *J Clin Microbiol* 44, 4430–4435.
- Willi, B., Boretti, F.S., Meli, M.L., Bernasconi, M. V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2007a. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Appl Environ Microbiol* 73, 3798–3802.

- Willi, B., Boretti, F.S., Tasker, S., Meli, M.L., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2007b. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. *Vet Microbiol* 125, 197–209.
- Willi, B., Novacco, M., Meli, M.L., Wolf-Jäckel, G.A., Boretti, F.S., Wengi, N., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2010. Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: Transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe. *Schweiz Arch Tierheilkd* 152, 237–244.
- Woods, J.E., Brewer, M.M., Hawley, J.R., Wisnewski, N., Lappin, M.R., 2005. Evaluation of experimental transmission of “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *Am J Vet Res* 66, 1008–1012.
- Yasmin, A.R., Peng, T.L., Abdul-Azeez, I.O., Nur Atikah, H., Salma, C.W.Z., Hamdan, R.H., Loong, S.K., 2022. Retrospective prevalence and associated risk factors of *Mycoplasma haemofelis* infection in owned cats. *Trop Biomed* 39, 444–450.