

## Detección de *Mycoplasma haemofelis* y "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" a través de PCR en gatos de la comuna de Chillán. Estudio preliminar.

*Mycoplasma haemofelis* and "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" detection by PCR assay in cats of Chillán commune. Preliminary study.

**Victoria Merino** BQ, MSc<sup>1</sup>; **Armando Islas** MV, MSc<sup>1</sup>; **Pablo Rivera** MV, DMV<sup>1</sup>; **Alejandro Cruz** MV<sup>1</sup>; **Rodrigo Tardón** MV, DMV<sup>1</sup>.

Fecha de recepción : 19 de Mayo de 2011  
Fecha de aceptación : 07 de Junio de 2011

### Resumen

El objetivo del presente estudio fue implementar la técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar si las especies de micoplasmas hemotrópicos felinos, *Mycoplasma haemofelis* y *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, existen en gatos naturalmente infectados de la comuna de Chillán. Para ello, se extrajo el ADN de 30 muestras sanguíneas de gatos, de los cuales algunos eran clínicamente sanos y otros presentaban signos de hemoplasmosis felina. Los resultados obtenidos indican que 13,3% (4/30) de los gatos fueron positivo *Mycoplasma* spp. a través de PCR, de éstos un 3,3% (1/30) fue positivo a *Mycoplasma haemofelis*, un 10% (3/30) a *Candidatus Mycoplasma haemominutum* y ninguno fue positivo a ambas especies. Sólo un 10,7% (3/28) de las muestras en las cuales se observaron estructuras semejantes a micoplasma hemotrópico felino al frotis sanguíneo, fueron positivos al PCR. Del total de los gatos anémicos (4/30), un 25% (1/4) fue positivo a *Mycoplasma haemofelis* y de los gatos no anémicos (26/30) un 11,5% (3/26), fueron positivos a *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Así, *Mycoplasma haemofelis* parece ser más patogénica que *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, aunque no se encontró significancia estadística. Este es el primer estudio en Chile, que determina micoplasma felino utilizando la técnica de PCR.

**Palabras claves:** micoplasma, micoplasma hemotrópico felino, anemia felina.

Proyecto DIUC N° 202.151.013-1.0

### Summary

The objective of this study was to implement the polymerase chain reaction (PCR) in order to detect if species of Feline Hemotropic *Mycoplasma*, *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, it exist in naturally infected cats from Chillán commune. For it the DNA of 30 blood samples was extracted from cats, some of it were healthy clinically and other presented of feline *Mycoplasmosis* signs. The results indicate that 13.3% (4/30) were positive to *Mycoplasma* spp by PCR assay, from these 3.3% (1/30) was positive to *Mycoplasma haemofelis*, 10% (3/30) to *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and none with both species. From samples observed with similar structure of feline hemotropic *mycoplasma* at cytological examination only 10.7% (3/28) were positive to PCR. From the total of anemic cats (4/30), 25% (1/4) was positive to *Mycoplasma haemofelis* and from no anemic cats (26/30) 11.5% (3/26), were positive to *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Thus *Mycoplasma haemofelis* seems to be more pathogenic than *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, although was not found statistical significance. This it is the first study in Chile that to determine feline *Mycoplasma* by PCR assay.

**Key words:** *Mycoplasma*, Feline Hemotropic *Mycoplasma*, feline anemia.

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Casilla 537, Chillán, Chile. (vmerino@udec.cl)

## Introducción

Los micoplasmas hemotrópicos felinos, previamente denominados *Haemobartonella felis*, corresponden a bacterias hemotrópicas parásitas, sin pared celular, pleomórficas e incultivables.<sup>1</sup> Miden menos de 1 mm de diámetro y la carencia de pared celular es la característica responsable de la tinción gram negativa y la nula susceptibilidad frente a ciertos fármacos antibacterianos.<sup>2</sup> Aunque no tienen núcleo, hay pequeños gránulos y algunas estructuras filamentosas que se encuentran en su citoplasma. Estos hemoparásitos se ubican en depresiones bajas y profundas, adhiriéndose a la superficie eritrocítica con 15 a 25 nm de separación entre el parásito y la membrana, pero no penetran la superficie del eritrocito; además, unas delgadas fibrillas parecen extenderse desde el parásito para anclarlo a la célula huésped.<sup>3</sup> Estos organismos son parásitos bacterianos obligados de los eritrocitos de los gatos y pueden causar anemia hemolítica aguda, como también iniciar un estado subclínico crónico.<sup>4</sup> Tres cepas o variedades de micoplasmas han sido descritas, comparadas y determinadas genéticamente en gatos, la variedad de mayor tamaño (0,5 – 1,0 mm) se denominó *Haemobartonella felis* Ohio (OH), se aisló en los estados de Ohio y Florida, en 1996 y 1989 respectivamente, y la de menor tamaño (<0,5 mm) se denominó *Haemobartonella felis* California (CA), detectada por la Universidad de Davis, California.<sup>5,6</sup> El análisis filogenético del gen 16S rRNA de cepas de *Haemobartonella felis* mostró que *H. felis* OH y *H. felis* CA son sólo un 85% similares.<sup>7,8</sup> Estos estudios sugirieron que *Haemobartonella spp* se reclasificara en el mismo género que la familia Mycoplasmataceae<sup>5,9</sup> *H. felis* variantes OH y CA se transfirieron al género *Mycoplasma* como *Mycoplasma haemofelis*.<sup>10,11</sup> y como "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*", respectivamente.<sup>10,11</sup> Se designa "*Candidatus*" porque es incultivable *in vitro* y se mantiene pasando entre gatos *in vivo*.<sup>12</sup> Otro hemoplasma se identificó en Suiza como "*Candidatus Mycoplasma turicensis*", utilizando la técnica de PCR, y no se ha determinado en muestras de sangre.<sup>13</sup> Este organismo se encontró también en Reino Unido, Australia, África del Sur, Estados Unidos de Norte América, Japón y Canadá.<sup>14-19</sup>

Se ha demostrado que estos microorganismos no tienen relación con *Bartonella* y, como hay otras causas infecciosas de anemia en gatos, se recomienda que los términos "Hemobartonelosis felina" y "anemia infecciosa felina" se abandonen y se reemplacen por "Mycoplasmosis hemotrópica felina". Además, se les denominará micoplasmas hemotrópicos felinos (FHM), proponiendo el nombre trivial de "hemoplasmas" para estos microorganismos.<sup>10, 20</sup>

El método que se utiliza comúnmente para el diagnóstico de FHM es la identificación del microorganismo sobre la superficie del eritrocito a través de examen microscópico de frotis sanguíneos de buena calidad. La forma pequeña aparece como cocos de diámetro menor a 0,5 mm, sin embargo, ambas formas no siempre pueden distinguirse confiando sólo en el frotis sanguíneo.<sup>1</sup> La parasitemia transitoria en infección aguda y los episodios cíclicos en gatos portadores complican el diagnóstico de la enfermedad. La necesidad de una prueba diagnóstica eficiente y confiable condujo a la secuenciación de los genes 16S rRNA y al desarrollo de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie específica.<sup>5, 21-23</sup>

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Mycoplasma haemofelis* y *Candidatus Mycoplasma haemominutum* desde muestras sanguíneas de gatos con o sin signos clínicos de FMH en la comuna de Chillán, implementando la técnica molecular de PCR.

## Materiales y métodos

### Animales:

Este estudio se realizó en 30 gatos de la comuna de Chillán con ausencia o presencia de signos de anemia.

### Muestras sanguíneas.

A cada gato se les extrajo 1 mL de sangre desde la vena safena y se depositó en tubos con ácido etilen-diamino-tetra acético (EDTA).

### Volumen globular (VG).

Se determinó el volumen globular, utilizando una centrífuga para microhematocrito (Boeco H-24, Germany) y se expresó en porcentaje.<sup>24</sup> Los gatos con VG de 24 a 45% se clasificaron dentro del rango normal para la especie y aquellos con VG menor a 24% se consideraron anémicos.

### Examen citológico.

Los frotis sanguíneos se tiñeron con Giemsa.<sup>24</sup> Se observó el hemoparásito (100x con aceite de inmersión) para clasificarlos en gatos con y sin evidencia citológica, es decir, frotis positivos y negativos a micoplasmas, respectivamente.

### Extracción de ADN.

Para obtener el templado final de ADN se utilizó 0,5 mL de sangre entera por muestra, siguiendo el protocolo de extracción que se indica en el producto comercial DNAzol® BD Reagent (Laboratorios Invitrogen); se dispuso de agua ultra pura (libre de ARNasas y ADNasas) para la elusión final.

### Detección por PCR.

Los iniciadores que se utilizaron para amplificar el gen ribosomal (rRNA) 16S forward y reverse fueron 5'- ACG AAA GTC TGA TGG AGC AAT A -3' y 5'- ACG CCC AAT AAA TCC G(A/G)A TAA T -3', respectivamente.<sup>25</sup> Estos iniciadores se encargaron al Laboratorio Invitrogen. Un volumen final de 20 mL de mezcla de reacción contenía: tampón PCR 20 mM a pH 8,3; MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM; mezcla de dNTP's 0,3 mM ; cada primer 0,1 mM; Taq polimerasa 1U y agua ultra pura estéril en cantidad suficiente para obtener el volumen final. Luego se agregó 1 mL de templado de ADN, correspondiente a cada muestra.

La amplificación se realizó en un termociclador (MJ Research, Peltier Thermal Cycler PTC-200), con un protocolo de tiempo como se indica a continuación: 10 minutos de incubación a 20° C seguidos por dos minutos de desnaturalización a 95° C, luego 45 ciclos de un minuto de desnaturalización a 95° C, un minuto de alineación a 60° C, 30 segundos de extensión a 72° C, luego siete minutos a 72° C y finalmente se mantuvo a 4° C hasta el momento de la electroforesis.

Electroforesis en geles de agarosa.

Se preparó un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio; se colocaron las muestras en cada carril utilizando Orange C como marcador de migración y se realizó una electroforesis durante 20 minutos a 120 V. Se identificaron los controles positivos desde los mismos templados de ADN aislados y se utilizó como control negativo, agua ultra pura libre de DNAsas y RNAsas (Laboratorio Invitrogen) para monitorear contaminación. La identificación de los productos del PCR (amplicones), tanto para *Mycoplasma haemofelis* como para *Candidatus Mycoplasma haemominutum* se hizo por comparación de tamaño del control positivo con el de la escala de ADN marcador de 50 bp (Invitrogen) a través de un transiluminador de rayos UV (Modelo 15, UVP). No se utilizó DNA de otros microorganismos como controles negativos porque

se ha determinado que los templados utilizados son específicos para amplificar el fragmento del gen 16S rRNA de FHM e incapaces de amplificar productos de DNA extraídos de organismos relacionados con MHF como de *Eperythrozoon suis*, *Mycoplasma genitalium*, *Bartonella bacilliformes*.<sup>21,25</sup>

Análisis estadístico.

Sobre la base de los datos proporcionados por PCR, estos se dividieron en gatos PCR positivos y dentro de estos, gatos PCR *Mycoplasma haemofelis* positivos y gatos PCR *Candidatus Mycoplasma haemominutum* positivos. Luego se compararon con los gatos positivos al frotis sanguíneo y con los controles negativos al frotis, y también con los resultados del volumen globular, vale decir, gatos anémicos y no anémicos. Se utilizó el programa Epi Info versión 3.3.2, año 2005 para la prueba del  $\chi^2$ . Sin embargo, debido a los resultados, se usó una corrección denominada Test exacto de Fisher, que se debe considerar cuando las cifras numéricas resultantes son menores que cinco (5). El grado de significancia se definió en el valor  $P < 0,05$ . Además, se realizó el test de kappa para determinar concordancia entre las pruebas diagnósticas utilizadas.<sup>26</sup>

## Resultados

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de sangre de los gatos en estudio por análisis citológico y a través de la técnica de PCR se observan en la Tabla 1.

Al examinar al microscopio los frotis sanguíneos se observaron estructuras similares a FHM en los eritrocitos de 28 muestras (93,3%; 28/30) y no se distinguieron estas estructuras en 2 frotis (6,7%; 2/30). Al analizar los resultados de PCR, se distinguió un gato (3,3%; 1/30) positivo a *Mycoplasma haemofelis* y tres gatos (10%; 3/30) positivos a *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

**Tabla 1.** Gatos de la comuna de Chillán positivos y negativos a *Mycoplasma hemotrópico felino* (MHF) de acuerdo al análisis del frotis sanguíneo y a través de PCR.

	Frotis sanguíneo (%)	PCR (%)
Número de gatos positivos a MHF	28 (93,3)	4 (13,3)
Número de gatos negativos a MHF	2 ( 6,7)	26 (86,6)
Número de gatos positivos a <b><i>M. haemofelis</i></b>	0	1 (3,3)
Número de gatos positivos a <b><i>Candidatus M. haemominutum</i></b>	0	3 (10,0)

Coefficiente kappa= 0,06 N=30

De las 28 muestras positivas al frotis sanguíneo, en una se determinó presencia de *Mycoplasma haemofelis* (3,6%; 1/28) y en dos se diagnosticó la existencia de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (7.1%; 2/28). De las muestras negativas al frotis sanguíneo, una fue positiva a *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (50%; 1/2). Al comparar los resultados del examen citológico con los del PCR no hay diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Además al realizar el test de kappa se obtuvo un valor de coeficiente kappa de 0.06, lo cual indica que no hay concordancia entre los diagnósticos emitidos por ambas pruebas.

Al analizar los valores de volumen globular (VG) de los gatos, se puede señalar que cuatro gatos (13,3%; 4/30) mostraron VG inferior a 24% y 26 gatos presentaron VG mayor a 24%. Al considerar el valor de VG con los resultados de PCR se puede indicar que un 25% (1/4) de los gatos con VG menor a 24% fue positivo a *Mycoplasma haemofelis*. De los gatos con VG mayor a 24% se determinó un 11,5% (3/26) infectados con *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (Tabla2).

Los productos amplificados por PCR de FMH se muestran en las figuras 1, 2 y 3. En la figura 1 se observa una banda de ADN de 170 bp que por su tamaño corresponde a *Mycoplasma haemofelis*. En la figura 2 se observa una banda de ADN de 193 bp que concuerda con la magnitud de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* y en la figura 3 se observa dos bandas de ADN de 170 bp y 193 bp que pertenecen al tamaño determinado para las dos formas de Micoplasma spp .

## Discusión

Los resultados obtenidos indican que es posible implementar la técnica de PCR para detectar la presencia de Micoplasma spp. en gatos. En las muestras de sangre de los gatos de este estudio, analizadas a través de PCR, se observó la existencia de las variedades *Mycoplasma haemofelis* y *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

La técnica de PCR es muy útil, precisa y altamente sensible; es necesario trabajar con

extrema precaución para reducir los falsos positivos y se debe utilizar agua destilada ultra pura libre de DNAsas y RNAsas como control negativos.<sup>27</sup>

En este trabajo, de las 30 muestras sanguíneas de gatos analizadas un 10,7% fueron positivas tanto al examen citológico como al PCR; un 3,3% fue positivo a *Mycoplasma haemofelis*, un 10% a *Candidatus Mycoplasma haemominutum* y ningún animal fue positivo a ambas formas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores, quienes determinaron un 13,2% de los gatos en estudio positivos al examen citológico y al PCR; sin embargo ellos encontraron un 9,4% positivos a *H. felis* OH (*Mycoplasma haemofelis*) y 1,9% infectados con *H. felis* CA (*Candidatus Mycoplasma haemominutum*).<sup>25</sup> Trabajos realizados en Canadá identificaron que el 12% de gatos eran positivos a PCR; un micoplasma 5,1 % presentaba *Mycoplasma haemofelis* y 6,9 % poseía *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.<sup>28</sup>

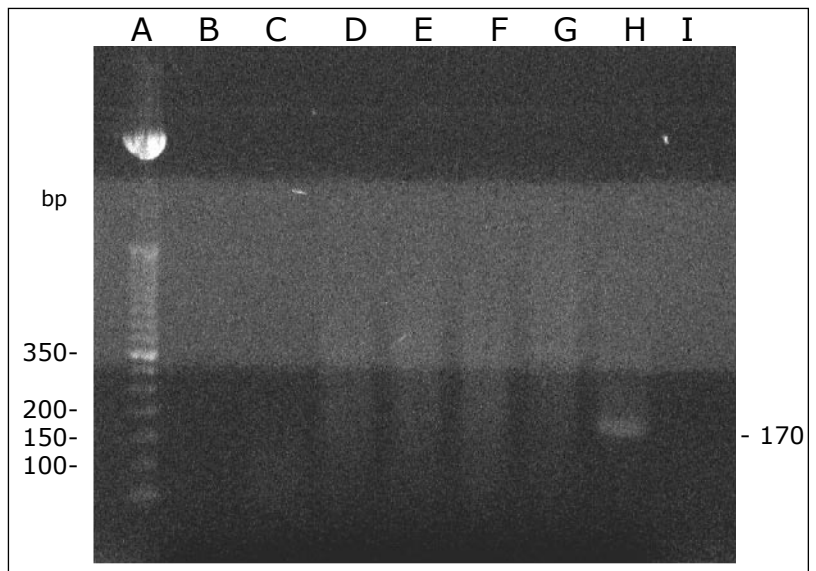
Al considerar el volumen globular, se encontró un 13,3% de los gatos con VG bajo los valores de referencia normal para la especie; de éstos, un 25% fue positivo a *Mycoplasma haemofelis* y correspondió a un gato anémico con VG de 17%. En contraposición, un 86,7% resultó no anémico, y de éstos un 11,5% fue positivo para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*. Estos resultados concuerdan con los publicados por investigadores que han encontrado que gatos con anemia, depresión intensa y fiebre están relacionados con *Mycoplasma haemofelis* y, que la mayoría de los gatos no anémicos y levemente letárgicos, presentan *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.<sup>2, 22,25, 29-31</sup>

Se ha demostrado que los gatos PCR positivos para *Mycoplasma Haemofelis* muestran anemia moderada a severa y anemia regenerativa y macrocítica.<sup>30-32</sup> En este estudio, los gatos positivos a *Candidatus Mycoplasma haemominutum* no presentaron anemia; esta baja o nula patogenicidad podría deberse a la existencia de un agente patógeno concomitante, que no se determinó, ya que no era el objetivo de este estudio. Se ha señalado que la coinfección de *Candidatus Mycoplasma*

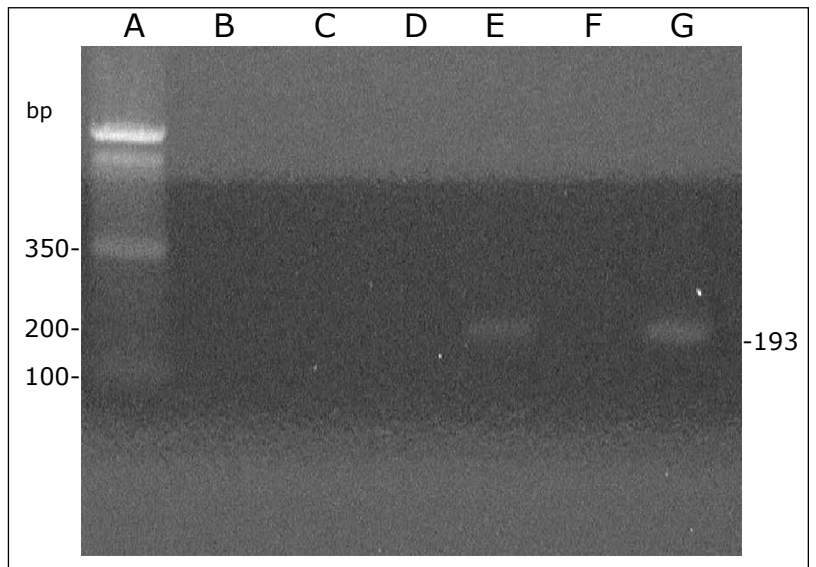
**Tabla 2.** Volumen globular (%) de gatos de la comuna de Chillán positivos y negativos a *Mycoplasma haemofelis* y a *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

Volumen globular (número de gatos)	<i>M. haemofelis</i> (%)	" <i>Candidatus</i> " <i>M. haemominutum</i> " (%)	Total (%)
< 24% (4)	1 (25)	0 (0)	1 (25)
>24% (26)	0 (0)	3 (11,5)	3 (11,5)
Total (30)	1 (3,3)	3 (10)	4 (13,3)

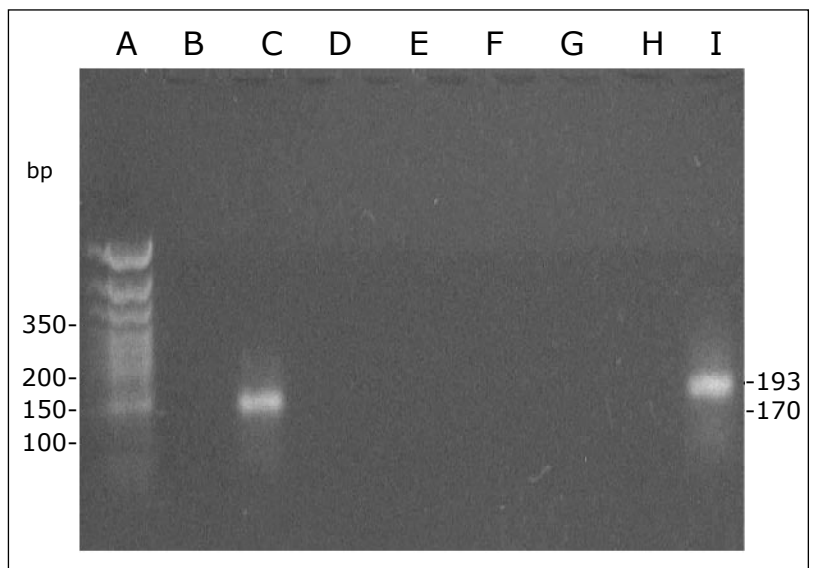
$P > 0,05$  N=30



**FIGURA 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, del producto amplificado por PCR de templados de ADN extraídos desde sangre de gatos. A: Escala marcadora de ADN (50 bp); B, C, D, E, F y G muestras PCR negativas; H: *Mycoplasma haemofelis* (170 bp); I: Control negativo.



**FIGURA 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, de los productos amplificados por PCR de templados de ADN extraídos desde sangre de gatos. A: Escala marcadora de ADN (50 bp); B, C y D: muestras PCR negativas; E y G: *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (193 bp); F: Control negativo.



**FIGURA 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, que muestra el producto amplificado por PCR de templados de ADN extraídos desde sangre de gatos de Chillán. A: Escala marcadora de ADN (50 bp); B, D, E, G y H: muestras PCR negativas; B: *Mycoplasma haemofelis* (170 bp); I: *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (193 bp); F: Control negativo.

*haemominutum* con Leucemia viral felina (FeLV) predispondría a enfermedades mieloproliferativas y a anemia severa, así como también en gatos seniles con linfoma y negativos a FeLV.<sup>33, 34</sup>

Un resultado positivo obtenido a través de PCR debería interpretarse en concordancia con la especie identificada, con los hallazgos hematológicos y con los signos clínicos encontrados, ya que los resultados positivos no necesariamente significan que el agente aislado sea la causa de la enfermedad. Asimismo, si no existen signos clínicos en presencia de *Mycoplasma* spp. se puede sugerir que el microorganismo está causando una infección latente.<sup>1, 35-37</sup>

Al análisis estadístico de este estudio en particular, no se encontró una diferencia significativa, tanto para los grupos de gatos positivos y negativos al examen citológico, como para los anémicos y no anémicos con el resultado del PCR; sin embargo, de acuerdo al valor de kappa, no hay concordancia entre las pruebas diagnósticas utilizadas. Al examinar los resultados del frotis sanguíneo, se observó un 93,3% de los gatos con estructuras similares a hemoparásitos en los eritrocitos y, de éstos, un 10,7% fueron positivos también al PCR, un 3,6% para *Mycoplasma haemofelis* y un 7,1% para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*; en cambio, un 6,7% resultaron con frotis negativos y, de éstos, un 50% fue PCR positivo para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, lo que indica que la mitad de ellos resultó como falso negativo al frotis. Sin embargo, debido al bajo número de gatos controles, estos resultados no pueden considerarse concluyentes. Los resultados de este trabajo son similares a los encontrados por autores que describen que un 100% de los gatos estudiados se diagnosticaron con infección por hemoplasmas al analizar los frotis sanguíneos y, que después del PCR, fueron positivos un 32,1% para *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, un 6,4% *Mycoplasma haemofelis* y un 6,4% para ambas especies.<sup>31</sup>

Los iniciadores utilizados para el PCR de esta investigación son especie-específicos, sin embargo, sería necesario una secuenciación de los templados de ADN extraídos desde las muestras sanguíneas, con la finalidad de demostrar la identidad genética del hemoparásito en cuestión, al igual que estudios hechos en Inglaterra, donde la especie aislada mostró una homología con *Candidatus Mycoplasma haemominutum* y, en Australia, el organismo identificado tienen una similitud del 100% con *Mycoplasma haemofelis*.<sup>38,39</sup> Además, existe la variante *Candidatus Mycoplasma turicensis* que se ha detectado en gatos utilizando la técnica real-time PCR.<sup>40, 41</sup>

De los resultados obtenidos se puede

concluir que a través de la técnica PCR se detectó *Mycoplasma* spp. en gatos de la comuna de Chillán, infectados naturalmente. Por los tamaños de los productos amplificadas por PCR de los ADN aislados desde los gatos en estudio, las especies corresponderían a *Mycoplasma haemofelis* y a *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

Cabe señalar que el examen citológico no es determinante en el diagnóstico de micoplasmosis felina. Mientras no se realice la técnica de PCR como un análisis de rutina en los laboratorios clínicos y/o se disponga de una prueba serológica confiable para detectar hemoplasma felino;<sup>42</sup> los médicos veterinarios tienen que considerar la concordancia entre el resultado del análisis del frotis sanguíneo y los signos clínicos que manifiestan los gatos, para implementar un tratamiento adecuado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Tasker S, Lappin MR. Haemobartonella felis: recent developments in diagnosis and treatment. J Feline Med Surg; 2002, 4: 3-11.
- 2.- Messick JB. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infection in dogs and cats. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract; 2003, 33: 1453-1465.
- 3.- Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet Clin Pathol; 2004, 33: 2-13.
- 4.- Flint y Moss, 1953
- 5.- Rikihisa Y, Kawahara M, Wen B, Kociba G, Fuerst P, Kawamori F, Suto CH, Shibata S, Futohashi M. Western Immunoblot Analysis of Haemobartonella muris and Comparison of 16S rRNA Gene Sequences of H. muris, H. felis, and Eperythrozoon suis. J Clin Microbiol; 1997, 35: 823-829.
- 6.- Tasker S, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Use a real-time PCR to detect and quantify Mycoplasma haemofelis and "Candidatus Mycoplasma haemominutum" DNA. J. Clin Microbiol; 2003, 41: 439-441.
- 7.- Tasker S, Helps CR, Day MJ, Harbour DA, Shaw SE, Harrus S, Baneth G, Lobetti RG, Malik R, Beaufils JP, Belford CR, Gruffydd-Jones TJ. Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. J Clin Microbiol; 2003, 41: 3877-3880.
- 8.- Berent LM, Messick JB. Physical map and genome sequencing survey of Mycoplasma haemofelis (Haemobartonella felis). Infect Immun; 2003, 71: 3657-3662.
- 9.- Johansson KE, Tully JG, Bolske G, Pettersson B. Mycoplasma cavipharyngis and Mycoplasma fastidiosum, the closets relatives to Eperythrozoon spp. and Haemobartonella

spp. FEMS Microbiol Lett; 1999, 174: 321-326.

10.- Neimark H, Johansson K, Rikihisa Y, Tully J. 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 wenyonni*”. *Int Journal of Sys And Evol Microbiology*; 2001, 51: 891-899.

11.- Neimark H, Johansson K, Rikihisa Y, Tully J. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *Int. Journal of Sys. And Evol. Microbiology*; 2002, 52: 683.

12.- Foley JE, Pedersen NC. “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, a low-virulence eperythrocytic parasite of cats. *Int. Journal of Sys. And Evol. Microbiology* ; 2001, 51: 815-817.

13.- Willi B, Boretti FS, Cattori V, Tasker S, Meli ML, Reusch C, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New *Hemoplasma* Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *J Clin Microbiol* ; 2005, 43: 2581-2585

14.- Fujihara M, Watanabe M, Yamada T, Harasawa R. Occurrence of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” infection in domestic cats in Japan. *J Vet Med Sci*; 2007, 69: 1061 – 1063.

15.- Tanahara M, Miyamoto S, Nishio T, Yoshii Y, Sakuma M, Sakata Y, Nishigaki K, Tsujimoto H, Setoguchi A, Endo Y. An epidemiologica survey of feline hemoplasma infection in Japan. *J Vet Med Sci*; 2010, 72: 1575 – 1581.

16.- Sykes JE, Terry JC, Lindsay LL, Owens SD. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc*; 2008, 232: 372 – 379.

17.- Kamrani A, Parreira VR, Greenwood J, Prescott JF. The prevalence of *Bartonella*, *Hemoplasma* and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *Can J Vet Res*; 2008, 72: 411 – 419.

18.- Peters IR, Helps CR, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Tasker S. The prevalence of three species of feline hemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real time duplex PCR assays. *Vet Microbiol*; 2008, 126: 142 – 150.

19.- Barrs VR, Beatty JA, Wilson BJ, Evans N, Gowan R, Baral RM, Lingard AE, Perkovic G, Hawley JR, Lappin MR. Prevalence of *Bartonella* species, *Rickettsia felis*, hemoplasmas and *Ehrlichia* group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. *Aust Vet J*; 2010, 88: 160 – 165.

20.- Sykes JE.. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline haemobartonellosis). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* ; 2003, 33: 773-789.

21.- Berent LM, Messick JB, Cooper SK. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *Amer J Vet Res*; 1998, 59: 1215-1220.

22.- Foley J, Harrus S, Poland A, Chomel B, Pedersen NC. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Amer J Vet Res*; 1998, 59: 1581-1588.

23.- Messick JB, Berent L, Cooper S. Development and Evaluation of a PCR-Based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*; 1998, 36: 462-476.

24.- Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. Fifth edition, Lippincot Williams and Wilkins; 2000, pp 20- 29.

25.- Jensen WA, M Lappin, S Kamkar, W Reagan. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am J Vet Res*; 2001, 62: 604-608.

26.- Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*. Oxford UK, Blackwell Science; 2005 pp 327 -328.

27.- Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol*; 2004, 42: 1863-1868.

28.- Niblett BM, Waldner C, Taylor SM, Jackson ML, Knorr LM, Snead EC. Hemotropic mycoplasma prevalence in shelter and client-owned cats in Saskatchewan and a comparison of polymerase chain reaction (PCR) – Results from two independent laboratories. *Can J Vet Res*; 2010, 74: 91 – 96.

29.- Tasker S, Binns SH, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Helps CR, Jensen WA, Olver CS, Lappin MR. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in cats the United Kingdom. *Vet Rec*; 2003, 152: 193-198.

30.- Kewish KE, Appleyard GD, Myers SL, Kidney BA, Jackson ML. *Mycoplasma haemofelis* and “*Mycoplasma haemominutum*” detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. *Can Vet J*; 2004, 45: 749-752.

31.- Lobetti RG, Tasker S. Diagnosis of feline hemoplasma infection using a real-time PCR assay. *J South Afr Vet Assoc*; 2004, 75: 94-99.

32.- Watanabe M, Hisasue M, Hashizaki K, Furiuchi M, Ogata M, Hisamatsu S, Ogi E, Hasegawa M, Tsuchiya R, Yamada T. Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence-specific polymerase chain reaction (SS-PCR). *J Vet Med Sci*; 2003, 65: 1111-1114.

33.- George JW, Rideout BA, Griffey SM, Pedersen NC. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *Am J Vet Res*; 2002, 63: 1172-1178.

34.- De Lorimier LP, Messick JB. Anemia associated with "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*" in a feline leukaemia virus-negative cat with lymphoma. *J Amer Anim Hosp Assoc*; 2004, 40: 423-427.

35.- Cooper SK, Berent LM, Messick JB. Competitive, quantitative PCR analysis of *Haemobartonella felis* in the blood of experimentally infected cats. *J. Microbiol. Methods* ; 1999, 34: 235-243.

36.- Sellon RK. Update on molecular techniques for diagnostic testing of infectious disease. *Vet. Clin. Small Anim*; 2003, 33 : 677-693.

37.- Criado-Fornelio A, Martínez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Vet Microbiol*; 2003, 93 : 307-317.

38.- Tasker S, Helps CR, Belford CJ, Birtles RJ, Day MJ, Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. 16S rRNA comparison demonstrates near identity between an United Kingdom *Haemobartonella felis* strain and the American California strain. *Vet Microbiol*; 2001, 81 : 73-78.

39.- Clark P, Foster S, Spencer P. Detection of *Haemobartonella felis* (*Candidatus Mycoplasma haemofelis*) in Australia that is similar to the "Ohio" strain. *Australian Vet J*; 2002, 80:703-704.

40.- Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Cattori V, Meli ML, Doherr MG, Reusch C, Hofmann-Lehmann R. Feline hemoplasmas in Switzerland: identification of a novel species, diagnosis, prevalence, and clinical importance. *Schweiz Arch Tierheilkd*; 2006, 148: 139-140.

41.- Willi B, Tasker S, Boretti FS, Doherr MG, Cattori V, Meli M, Lobetti RG, Malik R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 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* ; 2006, 44: 4430-4435.

42.- Wolf-Jäckel GA, Jäckel C, Museux K, Hoelzie K, Tasker S, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Identification, Characterization and Application of Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotropic *Mycoplasma* Infections. *Clin Vaccine Immunol* ; 2010, 7: 1917 – 1925.