

Diagnostico y análisis filogenético de la infección natural por *Mycoplasma* spp en felinos domésticos

Diagnosis and phylogenetic analysis of natural mycoplasma spp infection in domestic felines

Pérez-Macchi Sandra¹, Villalba Micaela², Sepúlveda-García Paulina³, Villagra Viviana⁴,
Maldonado Edith⁵, Brítez Laura¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Clinicas Veterinarias. División Laboratorio de Patología Clínica. San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Clinicas Veterinarias. Orientación Medicina Veterinaria. San Lorenzo, Paraguay

³Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Laboratorio de Patología Clínica. Valdivia, Chile.

⁴Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias. Coordinación de Tesis. San Lorenzo, Paraguay

⁵Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias. Dirección Académica. San Lorenzo, Paraguay

RESUMEN.

Los micoplasmas son agentes bacterianos que tienen afinidad por los eritrocitos de mamíferos. Su detección es fundamental a la hora de evaluar su frecuencia y potencial riesgo en felinos u otras especies, incluyendo el hombre. Se han reportado en todo el mundo cuatro especies en felinos: *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm), *Candidatus Mycoplasma turicensis* (CMT) y "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum-like*" (CMhp). El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de presentación de infección por *Mycoplasma* spp. por microscopía óptica a través del extendido de sangre periférica (ESP) en gatos domésticos atendidos en el Hospital de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción e identificar la especie de *Mycoplasma* mediante técnicas moleculares. Se evaluaron 67 muestras de sangre periférica de gatos domésticos a través de la tinción de Giemsa, del total de muestras; en 22 (33%) se observaron estructuras compatibles con hemoparásitos siendo consideradas positivas a *Mycoplasma* spp., 4,54% (1/22) de las muestras positivas por ESP fueron confirmadas con diagnóstico molecular mediante PCR convencional con el gen específico 16S rRNA, resultando positivo a *Mycoplasma haemofelis*, a través de la caracterización molecular. El análisis de secuencias determinó la presencia de *M. haemofelis* con un nivel de identidad de 100%. En la construcción del árbol filogenético, se estableció que la muestra obtenida en ésta investigación (OR428160), se encontró estrechamente relacionada en el linaje de secuencias previamente reportadas en otros países del mundo. Los hallazgos de éste estudio revelan la presencia de *M. haemofelis* en felinos domésticos de Paraguay.

Palabras claves: Diagnóstico, felinos, infección, PCR, sangre.

ABSTRACT.

Mycoplasmas are bacterial agents that have affinity for mammalian erythrocytes. Its detection is essential when evaluating its frequency and potential risk in felines or other species, including humans. Four species have been reported worldwide in felines: *Mycoplasma haemofelis* (Mhf), "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" (CMhm), "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" (CMT) and "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum-like*" (CMhp). The present study aimed to determine the occurrence of *Mycoplasma* spp. infection in domestic cats attended in Veterinary Hospital of National University of Asuncion, by peripheral blood smears (ESP) and identified the *Mycoplasma* sp. by molecular techniques. Of the total samples, 67 peripheral blood samples from domestic cats were evaluated using Giemsa staining; In 22 (33%) structures compatible with hemoparasites were observed were considered positive for *Mycoplasma* spp., 4.54% (1/22) of the positive samples by ESP were confirmed with molecular diagnosis using conventional PCR with the specific 16S gene. rRNA. positive result for *Mycoplasma haemofelis*, through molecular characterization. Sequence analysis determines the presence of *M. haemofelis* with a 100% identity level. In the construction of the phylogenetic tree it was developed that the sample obtained in this research (OR428160) was found to be closely related in the lineage of sequences previously reported in other countries of the world. The findings of this study reveal the presence of *M. haemofelis* in domestic felines from Paraguay.

Keywords: Diagnosis, felines, infection, PCR, blood

Dirección para correspondencia: Dra. Sandra Perez-Macchi - Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Clínicas Veterinarias. División Laboratorio de Patología Clínica. San Lorenzo, Paraguay.

E-mail: stperez@vet.una.py

Recibido: 31 de agosto de 2023 / **Aceptado:** 28 de diciembre 2023

INTRODUCCIÓN.

Los mycoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) son agentes bacterianos que tienen afinidad por los eritrocitos en muchas especies de mamíferos, dentro de éstas, los felinos domésticos (1). Su detección es fundamental a la hora de evaluar su frecuencia y potencial riesgo en felinos u otras especies, incluyendo el hombre (2,3,4), considerando que se ha documentado en todos los continentes. Para esto, la microscopía óptica surge como la prueba de elección en laboratorios de rutina comparada a otros métodos de diagnóstico en nuestro medio, por la rapidez y economía. Su identificación en la superficie del eritrocito va depender de la naturaleza cíclica de la parasitemia y probablemente del manejo de la muestra (5,6). También se emplea la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) siendo ésta efectiva y sensible para el diagnóstico, en cuanto a la confirmación mediante secuenciación ya que permite realizar comparaciones evolutivas a partir de dependencias que existen desde el punto de vista estadístico entre las secuencias, siendo la forma más precisa y confiable para inferir en las relaciones filogenéticas (1).

La frecuencia de infección por *Mycoplasma* spp. en felinos domésticos ha sido reportada en diversos estudios; en Argentina y Colombia, se han reportado prevalencias del 20% para *Mycoplasma* spp., obtenida a través de evaluación de frotis sanguíneo (7). Se indica que las ubicaciones geográficas son un factor importante en las tasas de infección, siendo aquellas con climas más cálidos, las que presentan mayores prevalencia (1).

El Paraguay es un país con un clima sub tropical, seco y húmedo con temperaturas promedio estacional anual que varían entre los 20 °C y 24 °C (8), siendo propicio para la aparición de enfermedades. La presencia de mycoplasmas hemotrópicos en felinos domésticos del país, ha sido probada en un estudio mediante PCR convencional en Encarnación y Asunción (9), detectando *Mycoplasma haemominutum* (Mhm) en el 4,7% (28/2) del total de muestras en estudio.

Ésta investigación tuvo como objetivo principal determinar la frecuencia de presentación de infección por *Mycoplasma* spp. por microscopía óptica a través del extendido de sangre periférica (ESP) en gatos domésticos atendidos en el Hospital de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción e identificar la especie mediante técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Área de muestreo

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Hospital Veterinario “Prof. Dr. José Vicente Núñez” de la Facultad de Ciencias Veterinarias y en el Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, ubicados en el km 10.5, en la Ciudad de San Lorenzo, dentro del Campus Universitario.

Tamaño muestral

Procedimiento para calcular el número de felinos muestreados según (10):

*Proporción esperada (p): 0,225.

*Amplitud del Intervalo de confianza (w): 0,20

*Nivel de confianza (NC): 9521

*Desviación normal estandarizada de α ($Z\alpha$): 1, 96.

- Número total de individuos muestreados (n): 67

Características de la población

Se realizó un muestreo de 67 felinos domésticos que acudieron al Hospital Veterinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias “Prof. Dr. José Vicente Núñez” para un control general. Cada propietario firmó una autorización otorgando su consentimiento antes de tomar las muestras de sangre periférica. Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes de la especie felina sin distinción de sexo y raza. Se excluyó del estudio aquellos pacientes de la especie felina cuyos propietarios no autorizaron la participación en el estudio.

Material biológico

Las muestras fueron obtenidas de la vena marginal de la oreja y posteriormente procesadas, utilizando el método de frotis sanguíneo lineal que consistió en la realización de un extendido de sangre con 2 portaobjetos y remitidas posteriormente al Laboratorio de Patología Clínica.

La muestra fue fijada con metanol previa a la lectura por microscopía óptica, cuyo objetivo es la permeabilización de las células sanguíneas, preparando de ésta manera la entrada de la tinción Giemsa, que consistió en la mezcla de 20 gotas de Giemsa con 2 ml de solución Buffer para cada muestra. Se cubrió la parte superior de la lámina con el frotis utilizando la mezcla mencionada y se esperaron 15 minutos. Posteriormente se lavó la

lámina portaobjeto en posición horizontal y se secó la extensión colocando la lámina verticalmente sobre un portaobjeto. Una vez secada la lámina, se evaluó a través de microscopía óptica la búsqueda de glóbulos rojos con estructuras compatibles con *Mycoplasma* spp. observándolos solos, en pares o en cadenas cortas de 3 o 6 organismos, si es que la infección es aguda (5,11).

Extracción de DNA

Se procedió a la extracción de DNA de una de las muestras positivas por ESP. La muestra de sangre congelada con EDTA se descongeló a temperatura ambiente y homogeneizada mediante vortex. La extracción del ADN a partir de 200 µL de sangre se realizó utilizando el kit de extracción GeneJET (Thermo Fisher Scientific), según instrucciones del fabricante, para obtener 100µL de ADN purificado.

PCR convencional (c) para la detección de *Mycoplasma* spp.

La muestra se sometió a una PCR convencional para amplificar una región de 600 pb del gen 16SrRNA (16S) de *Mycoplasma* spp. Como control positivo se utilizó 1 muestra de ADN de gato naturalmente infectado por *Mycoplasma* spp. y como control negativo se utilizó agua ultra pura libre de nucleasas. La mezcla de reacción estaba compuesta por 5 µL de Gotaq® Master Mix (Promega®, Madison, EE. UU.), 300 nM de cada cebador externo; HemMycop 16S-322s (GCCCATATTCCTACGGGAAGCAGCAGT) y HemMycop 16S-938as (CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCGTC), 2 µL de ADN molde llevado a un volumen total de 25 µL con agua libre de nucleasas. (Thermo Scientific®, EE. UU.). El protocolo del perfil térmico fue el siguiente: 95°C por 2 min seguido de 45 ciclos de 94°C por 15 s, 68°C por 15 s y 72°C por 30 s. La amplificación se completó con una extensión final de 72°C durante 3 min (12).

Electroforesis

El producto de PCR convencional se separó mediante electroforesis en gel de agarosa (SeaKem® LE Agarose, Lonza) al 2%, teñido con Bromuro de etidio a un voltaje de 5 V/cm y se observó en el transluminador (JY-025 UV Transluminator) con luz ultravioleta. La extracción de ADN, la amplificación por cPCR y la electroforesis se realizaron en 3 salas separadas para evitar la contaminación cruzada.

Secuenciamiento y Análisis filogenético

Para confirmar el producto obtenido a través de la cPCR, la muestra fue enviada a Macrogen, Corea del Sur para su purificación y posterior secuenciamiento mediante método Sanger en secuenciador automático (A.B.I. Prism 310 genetic analyzer: Applied Biosystem ©/PerkinElmer).

Las secuencias forward y reverse se analizaron en el programa geneious version 7.1. Para obtener la secuencia consenso. El porcentaje de identidad se obtuvo utilizando la herramienta BLASTn (13) y la secuencia fue depositada en GenBank (14) bajo el número de acceso (OR42816)

Para el análisis filogenético, la secuencia obtenida en el presente estudio fue analizada junto con 25 secuencias de diferentes especies de hemoplasmas presentes en la base de datos genbank (AB758435, AB820288, KC512401, AY831867, AY171918, AY150984, AY150977, MN543634, MW406803, AY529641, KY432680, KF928964, AB848713, DQ825439, OQ421226, OP023145, MF192849, GQ129114, AF306346, KF306249, MH379799, MG948627, AB610849, AF178676, AF338269) y con la secuencia de *Mycoplasma pneumoniae* (NR_113659) para representar el grupo externo.

Primero se evaluó el mejor modelo evolutivo acorde al criterio de información de Akaike (15), determinando el modelo TIM3+F+G4 usando el programa ModelFinder (16). Posteriormente la reconstrucción filogenética fue inferida por método de Máxima verosimilitud, generando soporte de nodo a partir de un Bootstrap de 1000, usando el programa IQTREE (17).

Análisis de los datos

Para determinar la frecuencia de *Mycoplasma* spp. en gatos domésticos que acuden al Hospital de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Asunción, los gatos positivos por microscopía óptica se dividieron por el número total de animales analizados, se multiplicó por 100 y se expresó como porcentaje (%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Actualmente, el número de especies de *Mycoplasmas* en mamíferos ha ido en constante aumento, por tanto, las diferentes técnicas de

diagnóstico especialmente la de microscopía óptica surge como una gran herramienta rápida y efectiva para la detección de los mismos.

Debido a que éstos microorganismos no son cultivables a nivel *in vitro*, técnicas como la citología y la PCR son necesarias para su detección (18, 19, 20, 21).

De las 67 muestras examinadas, se identificaron estructuras compatibles con *Mycoplasma* spp. en las muestras de 22 (33%) felinos y 45 (67%) muestras resultaron negativas. Se han reportado prevalencia de *Mycoplasma* spp. en gatos domésticos que presentan una amplia variación, entre 3.6% a 28%, basado en diagnóstico citológico (22), variación que podría ser atribuible parcialmente a la naturaleza cíclica de la parasitemia dentro de episodios discretos; la cantidad de parásitos aumenta hasta alcanzar un valor máximo en 1 a 5 días, seguida de una disminución rápida (23).

En una investigación realizada (24), la prevalencia de *Mycoplasma* spp. fue de 22,5 %, éste porcentaje podría deberse a que se utilizó para el diagnóstico; muestras de sangre profunda (vena yugular y vena cefálica del antebrazo) mientras que en el presente estudio se utilizaron frotis de sangre periférica, demostrando una mayor sensibilidad (25). Otro estudio (26) registró que, de 30 gatos muestreados, 29 fueron positivos, representando el 96.7% de la población total muestreada. Este porcentaje elevado, podría atribuirse a los criterios de inclusión ya que fueron muestreados aquellos felinos sospechosos de padecer cuadros anémicos o de ictericia, incluyendo los gatos sospechosos de Leucemia viral felina.

Previamente se ha reportado una prevalencia de 66.6% en gatos de Asunción y

Encarnación, sin embargo, la población de Asunción estaba representada sólo por cuatro felinos (27), siendo así el presente estudio el primero en determinar una ocurrencia de *Mycoplasma* spp. de mayor representatividad en gatos de Asunción. La diferencia observada podría estar asociada al lugar geográfico de donde provienen las muestras, así como se puede atribuir a la técnica empleada en la detección (PCR versus ESP), basado en reportes previos de mayor sensibilidad de la técnica de PCR convencional para el diagnóstico de *Mycoplasma* en felinos comparado con examen citológico (28).

Es importante considerar que una vez infectado y recuperado de la enfermedad, el hospedador queda como portador sano, la reactivación de la enfermedad sigue siendo una amenaza en portadores crónicos (29), reportándose la reaparición de la parasitemia en animales inmunodeprimidos como se menciona anteriormente, ya sea por reinfección de la misma u otra especie de hemoplasma (30).

Con relación al estatus de raza (Tabla 1), según mencionan algunos autores (31), éste se considera un factor de riesgo de infección. En nuestro estudio, la mayor frecuencia de la enfermedad se dió en los gatos de la raza Común Europeo, lo que se podría deber a que la concurrencia de dicha raza fue mayor durante el periodo de muestreo, en donde de los 67 felinos, 62 correspondieron a la mencionada raza, lo cual se asemeja a los hallazgos en otras investigaciones (10) en donde el 84 % de los felinos con presencia de *Mycoplasma* spp. eran de la raza Común Europeo.

En cuanto al mayor porcentaje en machos (Tabla 1), coincide con lo que indican algunos estudios (23), en donde se observa un aumento de incidencia en machos adultos y lo atribuyen a que su comportamiento está caracterizado por mayor deambulación y pelea, lo que daba como resultado

Tabla 1. Frecuencia de *Mycoplasma* spp. en pacientes felinos según raza, sexo y rango etario. Hospital Veterinario de la FCV/UNA, año 2022.

Variable	Categoría	N° positivos	% positivos	N° negativos	% Negativos	Total
Raza	Común Europeo	21	33.87	46	74.19	62
	Mestizo de Siamés	0	0	2	0	2
	Siamés	0	0	1	0	1
	Bengalí	0	0	1	0	1
	Persa	1	100	0	0	1
Sexo	Macho	14	20.89	23	34.32	37
	Hembra	8	11.94	22	32.83	30
Edad	<1 año	5	7.46	10	14.92	15
	1-5 años	14	20.89	28	41.79	42
	> 5 años	3	4.47	7	10.44	10

mayor exposición a gatos infectados con *Mycoplasma* spp.

En un estudio realizado (10) los machos representaron un mayor porcentaje, 61% de los felinos infectados por *Mycoplasma* spp. lo que se asemeja con lo hallado en el presente estudio, pero con diferencias significativas con otro (26) en donde las hembras representaron al 68% y los machos al 31%. Esta discrepancia se debería a que la población muestreada era desigual; 10 machos y 20 hembras. Se describe (21) que los machos y los gatos jóvenes tienen más probabilidades de estar infectados, aunque no se ha encontrado evidencia de una predisposición de sexo o edad.

Referente a la edad, el mayor porcentaje en el rango etario fue de 1 a 5 años, lo que podría deberse a la coincidencia de la madurez sexual, lo que conlleva a una mayor socialización y exposición a felinos infectados. Sin embargo, algunos estudios (23) mencionan que la micoplasmosis aguda se desarrolla en gatos de todas las edades (Tabla 1). Estos porcentajes se diferencian de otro estudio (24), en donde no se encontraron diferencias significativas en la edad luego de realizar estudios estadísticos en 61 positivos de 262 felinos.

La Figura 1 presenta a las estructuras compatibles con *Mycoplasma* spp. afectando eritrocitos de felinos domésticos.

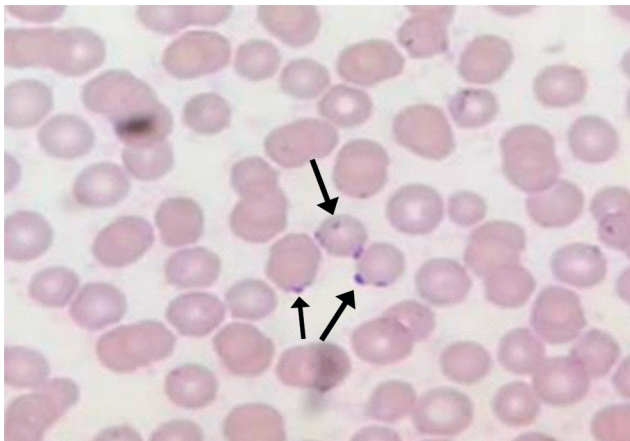


Figura 1. Se aprecian estructuras compatibles con *Mycoplasma* spp. en sangre (flechas negras), detectada en frotis sanguíneo, 100x. Tinción de Giemsa.

Con respecto al análisis de la secuencia del gen *16SrRNA*, se secuenció 1 muestra positiva por cPCR del gen *16SRNA*r. BLAST y los análisis filogenéticos respaldaron la identificación del 99,6% del producto (~600pb) como *Mycoplasma haemofelis* (número de acceso de GenBank (OR428160), mostrando 99-100% de identidad con

secuencias de *Mycoplasmas* detectadas en gatos de UK (AY150984), Australia (AY150977), Chile (MN543634) y Thailandia (MW406803), la secuencia de éste estudio permaneció estrechamente agrupada en el mismo clado, demostrando que los organismos son genéticamente muy similares, aunque no totalmente idénticos. El gen *16S* es altamente conservado por lo que es común observarse altas similitudes entre secuencias de la misma especie (Figura 2), siendo la primera identificación de *M. haemofelis* en nuestro país aportando información adicional a un reporte previo donde se determinó la presencia de ADN perteneciente a *Candidatus M. haemominutum*, sin embargo, este hallazgo no fue confirmado por secuenciación (27). Cabe mencionar la relevancia de la presencia de este hemoplasma, al ser descrito como el de mayor patogenicidad entre las tres especies de hemoplasmas que infectan a los felinos (32), por tanto es importante realizar futuros estudios orientados a establecer en que frecuencia se presentan las diferentes especies de *Mycoplasma* que infectan a los gatos de Paraguay

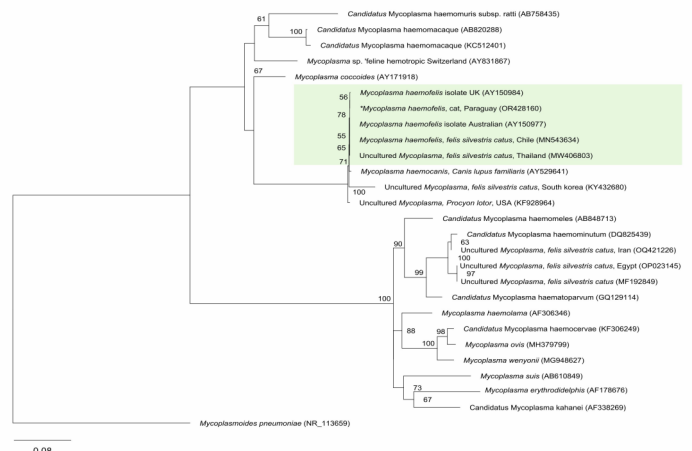


Figura 2. Relaciones filogenéticas de *Mycoplasma haemofelis* de gatos domesticos basado en el análisis de la secuencia de ADN del gen *16S* (600pb). Los números en los nodos corresponden al porcentaje de valores de arranque admitidos (1000 repeticiones). Se utilizó *Mycoplasma pneumoniae* (NR_113659) como grupo externo.

CONCLUSION.

Los resultados de este estudio revelaron una casuística considerable de gatos sospechosos a infección por *Mycoplasma* y la presencia de *Mycoplasma haemofelis* en felinos domésticos de Asunción Paraguay, el cual debe ser considerado como patógeno relevante, incluyéndolo en el panel de diagnóstico para felinos con signos asociados a patógenos transmitidos por vectores, así como promover la generación de estudios de prevalencia, epidemiología y caracterización molecular de este

patógenos en felinos de Paraguay. La técnica por microscopía óptica utilizada en éste estudio podría ser considerada como primera aproximación para la detección de este patógeno sin embargo, futuras investigaciones son requeridas para conocer el grado de correlación entre dicha técnica y la PCR.

AGRADECIMIENTOS.

Al Hospital Veterinario "Prof. Dr. José Vicente Núñez", al Laboratorio de Patología Clínica y Laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Clínicas Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción, que permitieron la realización de éste trabajo en sus instalaciones.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Martínez-Díaz V, A Silvestre-Ferreira, H Vilhena, J Pastor, O Francino, L Altet. 2013. Prevalence and coinfection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *J Feline Med Surg* 15:879-885.
2. Sykes J, J Terry J, L Lindsay, S Owens. 2008a. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *J Am Vet Med Assoc* 232: 372-379.
3. Willi B, F Boretti, V Cattori, S Tasker, M Meli, C Reusch, H Lutz, R Hofmann-Lehmann. 2005. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *J Clin Microbiol* 43: 2581-2585.
4. Santos A, R dos Santos, A Biondo, J Dora, L Goldani, S de Oliveira, A de Sa Guimaraes, J Timenetsky, H de Morais, F González, J Messick. 2008. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *E Infec Dis* 14: 1922-1924.
5. Tasker S, M Lappin. 2002. Review Article *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *J Feline Med Surg* 4:3-11.
6. Westfall D, W Jensen, W Reagan, S Radecki, M Lappin. 2001. Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *Am J Vet Res* 62:687-691.
7. Patiño P, J Villegas. 2011. Prevalencia de *Mycoplasma haemofelis* (anteriormente *Haemobartonella felis*) en pacientes felinos en 12 clínicas de Santiago de Cali durante el año 2010. *Boletín Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Antonio Nariño Colombia* 2, 9-14.
8. Schinini A. 2010. Orquídeas nativas del Paraguay. *Rojasiana* 9, 11-316.
9. Centurión Rossana, Messick Joanne. 2014. Uso del PCR como diagnóstico de Hemoplasmas en Encarnación y Asunción. *Revista sobre Estudios e Investigaciones del Saber Académico* 8(8), 29-32.
10. Bauer, N.; Balzer, H.; Thüre, S.; Moritz, A. 2008. Prevalencia de micoplasmas hemotrópicos felinos en muestras de conveniencia de gatos en Alemania (en línea). *Revista de medicina y cirugía felina (Estados Unidos)*. 10 (3): 252-258. consultado 6 jul. 2021. disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1016/j.jfms.2007.12.004>.
11. Willi B, F Boretti, S Tasker, M Meli, N Wengi, C Reusch, H Lutz, R Hofmann-Lehmann. 2007c. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. *Vet Microbiol* 125, 197-209.
12. Maggi RG, Chitwood MC, Kennedy-Stoskopf S, DePerno CS. Novel hemotropic *Mycoplasma* species in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;36(6):607-11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.08.00>
13. Altschul, S. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), 403-410. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1990.9999>
14. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2004). GenBank: Update. *Nucleic Acids Res.* 32 (DATABASE ISS.). <https://doi.org/10.1093/nar/gkh045>
15. Posada, D., & Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.*, 53(5), 793-808. <https://doi.org/10.1080/10635150490522304>
16. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, 14(6),

587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

17. Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

18. Jensen W, M Lappin, S Kamkar, W Reagan. 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.

19. Tasker S, J Braddock, R Baral, C Helps, M Day, T Gruffydd-Jones, R Malik. 2004. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real time PCR assay. *J Feline Med Surg* 6:345-54.

20. Willi B., S Tasker, F Boretti. 2006b. Phylogenetic and risk factor analysis for *Candidatus Mycoplasma turicensis* in United Kingdom, Australian and South African pet cats. *J Clin Microbiol* 44:4430-4435.

21. Barker E, C Helps, K Heesom, C Arthur, I Peters, R Hofmann-Lehmann, S Tasker. 2010. Detection of humoral response using a recombinant heat shock protein 70 (DnaK) of *Mycoplasma haemofelis* in experimentally and naturally hemoplasma infected cats. *Clin Vaccine Immunol* 17, 1926-1932.

22. Chandler, E. A.; Gaskell, C. J.; Gaskell, R. M. 2007. *Medicina y terapéutica felina*. 3a ed. Barcelona, España: Multiméica. 688 p.

23. Greene, C. E; Addie, D. D. 2008. *Enfermedades infecciosas del perro y el gato*. 3a ed. Buenos Aires, Argentina: Inter-Méica. 720 p.

24. Benard García, J. L. 2009. Determinación de la presencia del *Mycoplasma haemofelis* en gatos, en el refugio aware de Sumpango (en línea). Sacatepéquez, Guatemala. Consultado 26 feb. 2022. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/id/eprint/71>.

25. Caballero Méndez L, Franco Montoya L, María Mazo M, Sepúlveda J C, Valencia E, Portilla T, Restrepo L. 2022. Métodos diagnósticos para *Mycoplasma haemofelis* en felinos domésticos. *Rev Inv Vet Perú* 2022; 33(1):e20432 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v33i1.20432>.

26. Foley J, S Harrus, A Poland, B Chomel, N

Pedersen. 1998. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J Vet Res* 59:1581-1588.

27. Centurion, R., Messick, J., 2014. Uso del PCR como diagnóstico de Hemoplasmas en Encarnación y Asunción. *Rev. sobre Estud. e Investig. del saber académico* 8, 29–32.

28. Tasker, S., 2010. Haemotropic Mycoplasmas: What's their real significance in cats? *J. feline Med. surgery/medicine* 12, 369–381.

29. Hicks C, B Willi, B Riond, M Novacco, M Meli, C Stokes, C Helps, R Hofmann-Lehmann, S Tasker. 2015. Protective immunity against infection with *Mycoplasma haemofelis*. *Clin Vaccine Immunol* 22:108-118.

30. August, J. R. 2016. *Consultas en medicina interna felina*. Riverport Lane, Estados Unidos: Elsevier. 1061 p.

31. Alvarez Rodas, V.; Rivera Cuartas, J. 2021. Frecuencia de *Mycoplasma* spp. en felinos que acudieron al centro veterinario Huella Animal en Medellín (en línea). Medellín, Colombia. Consultado 26 feb. 2022. Disponible en: <https://repositorio.uniremington.edu.co/xmlui/handle/123456789/481>.

32. Stokes, J., 2012. *Infectious Diseases, The Cat*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0660-4.00033-8>