

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/03/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOPLASMAS EM BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL
BRASILEIRO, ÁREA ENDÊMICA PARA TRIPANOSSOMÍASE
BOVINA NA AMÉRICA DO SUL**

Victória Valente Calfre de Mello

Bióloga

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOPLASMAS EM BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL
BRASILEIRO, ÁREA ENDÊMICA PARA TRIPANOSSOMÍASE
BOVINA NA AMÉRICA DO SUL**

Victória Valente Califre de Mello

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

M527o

Mello, Victoria Valente Califre de

Ocorrência e caracterização molecular de hemoplasmas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro, área endêmica para tripanossomíase bovina na América do Sul / Victoria Valente Califre de Mello. -- Jaboticabal, 2019

75 p. : tabs., fotos, mapas + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

1. Micoplasmas hemotrópicos. 2. Trypanosoma vivax. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. 16S rRNA. 5. Diversidade genotípica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOPLASMAS EM BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL BRASILEIRO, ÁREA ENDÊMICA PARA TRIPANOSSOMÍASE BOVINA NA AMÉRICA DO SUL

AUTORA: VICTÓRIA VALENTE CALIFRE DE MELLO

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Marcos R. André

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Darci Moraes Barros-Battesti

Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV-UNESP / Câmpus de Jaboticabal

Ana Patrícia Yatsuda Natsui

Profa. Dra. ANA PATRÍCIA YATSUDA NATSUI
Departamento Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas-FCFRP/USP / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 08 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Victória Valente Calfre de Mello – nascida na cidade de Jaboticabal, São Paulo, em 9 de janeiro de 1995. Formada em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, no ano de 2016. Durante a graduação, realizou iniciação científica sem bolsa ICSB/UNESP, trabalhando com pesquisas na área de Parasitologia sob a orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André. Ingressou no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP em março de 2017, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Carla V. Califre e Wanilton I. Califre,
à minha irmã Maríssa V. Califre e ao meu marido
Felipe Gurgel, pelo apoio, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida.

Aos meus pais, Carla Valente Califre e Wanilton Isaías Califre, pelas batalhas diárias para me dar o presente que ninguém pode me tirar: a educação. Agradeço pelo infinito amor, cuidados e carinhos ao longo da minha vida.

À minha irmã Maríssa Valente, pelos incentivos, amor e parceria, juntas até o fim.

Ao meu marido, Felipe Gurgel, por compartilharmos nossas vidas e pelo amor diário.

Aos meus demais familiares, agradeço pelas orações ao longo desta minha jornada.

Aos meus cães, Kira, Layla, Cherrie, Gaia, Mike e Kiara, pelo amor puro que me inspira a ajudar outros animais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Rogério André, pela oportunidade concedida de vivenciar a pesquisa científica, por todo o conhecimento compartilhado e pela confiança a mim depositada.

Às Professoras Dra. Rosangela Z. Machado e Dra. Darci Moraes Barros-Battesti pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao Prof. Dr. Heitor Herrera Miraglia e orientados, pelo auxílio na colheita das amostras.

À Inalda Angélica Souza Ramos pela colheita das amostras. Aos demais colegas de laboratório, Luiz Ricardo Gonçalves, Natália Serra, Maria Eduarda Furquim, Diego Zanatto, Amanda Barbosa, Ana Cláudia Calchi, Kayo Neto, Priscila Ikeda, Lívia Perles, Renan Amaral, Leidiane Lima pelos conhecimentos e momentos compartilhados.

À Imunodot Diagnósticos pelo auxílio nos ensaios sorológicos, especialmente à Carla Freschi e à Marcia Jusi.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, principalmente à Mabel Mastro Custódio e Rafaela Beraldo, que de forma direta ou indireta, possibilitaram a realização desse trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 2015/14896- 1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 2014 / 401.403.120.16-5) pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização do presente trabalho.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária.

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

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Micoplasmas hemotrópicos	3
2.2. Transmissão e ciclo biológico	5
2.3. Hemoplasmas em bovinos no Brasil e no mundo.....	8
2.4. Hemoplasmas em outras espécies de ruminantes no Brasil	14
2.5. Sinais clínicos, diagnóstico e tratamento da hemoplasmosse bovina ...	15
2.6. <i>Trypanosoma vivax</i> e imunossupressão	18
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Espécies amostradas e área de estudo	23
4.2. Colheita das amostras	24
4.3. Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA) para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Trypanosoma vivax</i>	25
4.4. Extração de DNA das amostras de sangue de bovinos.....	26
4.5. Controle endógeno da PCR.....	27
4.6. Detecção e caracterização molecular de hemoplasmas.....	27
4.6.1. PCR convencional para hemoplasmas dirigida ao gene 16S rRNA	27
4.6.2.....PCR convencional para hemoplasmas dirigida ao gene RNase P	28
4.7. Eletroforese em gel de agarose	29
4.8. Purificação dos produtos amplificados	30
4.9. Sequenciamento.....	30
4.10. Análise das sequências e construção da árvore filogenética	31
4.11. Análise de genótipos de <i>Mycoplasma</i> spp. baseada no gene 16S rRNA pelo software DnaSP	31
4.12. Análise de distância pelo software SplitsTree	31
4.13. Rede de genótipos pelo software PopART.....	32
5. RESULTADOS.....	33

5.1. Soropositividade para <i>Trypanosoma vivax</i> pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)	33
5.2. Qualidade das amostras de DNA extraídas a partir de amostras de sangue de bovinos e PCR convencional para o gene <i>gapdh</i>	33
5.3. Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp. por meio de ensaios de cPCR baseados no gene 16S rRNA	34
5.4. Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp. por meio da cPCR baseada no gene RNase P	35
5.5. Análise da identidade das sequências obtidas pelo BLASTn	35
5.5.1. Análise das sequências de <i>Mycoplasma</i> spp. para o gene 16S rRNA	35
5.5.2. Análise filogenética pelo método de Inferência Bayesiana.....	36
5.6. Análise de genótipos de <i>Mycoplasma</i> spp. baseada no gene 16S rRNA pelo software DnaSP	39
5.7. Análise de distância pelo SplitsTree	39
5.8. Análise filogeográfica pelo software PopART	43
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOPLASMAS EM BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL BRASILEIRO, ÁREA ENDÊMICA PARA TRIPANOSSOMÍASE BOVINA NA AMÉRICA DO SUL

RESUMO - Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias Gram-negativas que parasitam a superfície de eritrócitos de uma ampla variedade de mamíferos. *Mycoplasma wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ são espécies de hemoplasmas relatadas em bovinos, podendo causar anemia hemolítica e redução na produção de carne e leite e, consequentemente, prejuízos econômicos. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência de hemoplasmas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro, área endêmica para tripanossomíase bovina na América do Sul. Adicionalmente, objetivou-se caracterizar molecularmente os genótipos de hemoplasmas encontrados. Para tal, amostras de sangue e soro de 400 bovinos de corte foram colhidas em cinco propriedades do município de Corumbá, sub-região da Nhecolândia, estado de Mato Grosso do Sul, centro-oeste brasileiro. As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA e a ensaios de PCR convencional para hemoplasmas baseados no gene 16S rRNA. As sequências obtidas foram submetidas a inferências filogenéticas, análises de distância e de diversidade genotípica. O Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA) mostrou a presença de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em 89,75% dos animais amostrados, confirmando a endemicidade para o referido agente na região sob estudo. Dentre as 400 amostras de sangue de bovinos testadas, 2,25% (9/400) mostraram-se positivas na cPCR para hemoplasmas. A análise filogenética das sequências obtidas confirmou a presença de DNA ‘C. M. haemobos’ e *M. wenyonii* em 0,5% (2/400) e 1,75% (7/400) animais, respectivamente. Cinco genótipos de *M. wenyonii* e um de ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ foram detectados entre os amplicons sequenciados. A diversidade genotípica encontrada entre as sequências de hemoplasmas detectadas em bovídeos ao redor do mundo revelou a presença de sete genótipos para *M. wenyonii* (três deles ocorrendo no Pantanal), e dois genótipos para as sequências de ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ (um deles ocorrendo no Pantanal). O presente estudo mostrou baixa ocorrência molecular de hemoplasmas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro, área endêmica para tripanossomíase bovina.

Palavras-chave: micoplasmas hemotrópicos, *Trypanosoma vivax*; 16S rRNA; diversidade genotípica

Abreviações: ‘CMh’ – ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’; Mw – *Mycoplasma wenyonii*; BI – Método Bayesiano

OCCURRENCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HAEMOPLASMAS IN BEEF CATTLE IN THE BRAZILIAN PANTANAL, AN ENDEMIC AREA FOR BOVINE TRYPANOSOMIASIS IN SOUTH AMERICA

ABSTRACT - Hemotrophic mycoplasmas (haemoplasmas) are Gram-negative bacteria that parasitize the surface of erythrocytes of a wide variety of mammals. *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos' are hemoplasma species reported in cattle, which can cause hemolytic anemia and reduction in meat and milk production and, consequently, economic losses. The present study aimed to investigate the occurrence of haemoplasmas in beef cattle in the Brazilian Pantanal, an area endemic for bovine trypanosomiasis in South America. In addition, the work aimed to characterize molecularly the genotypes of haemoplasmas found. For this purpose, blood and serum samples of 400 beef cattle were collected from five properties in the municipality of Corumbá, sub-region of Nhecolândia, in the state of Mato Grosso do Sul, central-western Brazil. Blood samples were subjected to DNA extraction and cPCR assays for haemoplasmas based on 16S rRNA gene. The sequences obtained were submitted to phylogenetic inferences, distance analysis and genotype diversity. The Indirect Immunoenzymatic Assay (iELISA) showed the presence of anti-*Trypanosoma vivax* IgG antibodies in 89.75% of the animals sampled, confirming the endemicity for this agent in the studied region. Among the 400 bovine blood samples tested, 2.25% (9/400) were positive in cPCR for haemoplasmas. Phylogenetic analysis of the sequences obtained confirmed the presence of DNA 'C. M. haemobos' and *M. wenyonii* in 0.5% (2/400) and 1.75% (7/400) animals, respectively. Five genotypes of *M. wenyonii* and one of 'Candidatus M. haemobos' were detected among the sequenced amplicons. The genotype diversity found among hemoplasma sequences detected in bovids around the world revealed the presence of seven genotypes for *M. wenyonii* (three of them occurring in Pantanal), and two genotypes for the 'Candidatus Mycoplasma haemobos' sequences (one of them occurring in Pantanal). The present study showed low molecular occurrence of haemoplasmas in beef cattle sampled in the Brazilian Pantanal, an area endemic for bovine trypanosomiasis.

Key words: hemotrophic mycoplasmas, *Trypanosoma vivax*; 16S rRNA; genotypic diversity

Abbreviations: 'CMh' – 'Candidatus Mycoplasma haemobos'; Mw – *Mycoplasma wenyonii*; BI – Bayesian Method

1. INTRODUÇÃO

A aproximação constante entre animais domésticos e selvagens com seres humanos tem propiciado a troca de vetores e patógenos entre diferentes espécies. Com esse tráfego de vetores, o aumento da disseminação de agentes patogênicos por eles veiculados pode ocasionar danos à saúde e mortalidade de uma ampla gama de animais, inclusive aos seres humanos (Palatnik-de-Souza e Day, 2011). Neste cenário, encontram-se os micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, que emergem como importantes patógenos na medicina humana e veterinária (Maggi et al., 2013^{a,b}; Hornok et al., 2011).

Hemoplasmas são bactérias do gênero *Mycoplasma* que caracterizam-se pela ausência de parede celular e localização epi-eritrocítica (Neimark et al., 2001). Tal localização facilita a transmissão via vetores artrópodes hematófagos, tais como piolhos, moscas e mosquitos. Embora as condições climáticas do Brasil favoreçam o desenvolvimento dos vetores, os artrópodes envolvidos na transmissão desses agentes ainda permanecem desconhecidos (Biondo et al., 2009).

A bovinocultura mostra-se como um dos principais setores econômicos do Brasil, representando 6% do Produto Interno Bruto (PIB), capaz de movimentar anualmente cerca 400 bilhões de reais (EMBRAPA). O Brasil possui um rebanho bovino de aproximadamente 218,2 milhões de cabeças e o município de Corumbá-MS apresenta o segundo maior efetivo a nível municipal (IBGE). Dentre as espécies de micoplasmas hemotrópicos descritas até o momento, *Mycoplasma wenyonii* e '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' vêm sendo detectadas em bovinos da Inglaterra (Mcauliffe et al., 2006), Japão (Tagawa et al., 2008), China (Su et al., 2010), Suíça (Meli et al., 2010) e Brasil (Giroto et al., 2012; Witter et al., 2017). Ambas as espécies podem ocasionar anemia hemolítica neste grupo de ruminantes (Fujihara et al., 2011).

O Pantanal, a maior planície inundável do mundo, de clima sazonal, com período de chuvas de outubro a abril, e um período de seca de maio a setembro (Amaral, 1986), é considerada endêmica para *Trypanosoma vivax* (Paiva et al., 2000; Madruga et al., 2006). A infecção por *T. vivax* está correlacionada a imunossupressão nos hospedeiros, podendo aumentar sua susceptibilidade a infecções secundárias (Giordani et al., 2016), como a hemoplasmosse, por exemplo. A pecuária de corte

destaca-se como principal atividade econômica da região (Cardoso et al., 2011), com predominância de rebanhos da raça Nelore, de origem indiana.

Ainda que hemoplasmas foram detectados em ruminantes domésticos e selvagens ao redor mundo, poucos estudos vêm sendo conduzidos no que diz respeito à epidemiologia, diversidade genética e ecologia de tais agentes. O presente estudo objetivou investigar a ocorrência e caracterizar molecularmente hemoplasmas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro, área endêmica para tripanossomose bovina. Infecções por *Trypanosoma vivax* estão associadas à imunossupressão nos hospedeiros infectados, predispondo a infecções secundárias. Desta forma, hipotetizou-se que o endemismo para *T. vivax* no Pantanal brasileiro estaria associado à alta ocorrência de hemoplasmas em bovinos.

7. CONCLUSÃO

Baixa ocorrência de *Mycoplasma wenyonii* e 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' foi verificada em bovinos de corte do Pantanal brasileiro, mesmo com o alto endemismo para tripanossomíase por *T. vivax*. O presente trabalho relatou, pela primeira vez, a ocorrência molecular de 'CMh' e *M. wenyonii* em bovinos de corte na América Latina. Apesar da conservação do gene 16S rRNA, foi verificado considerável diversidade de genótipos de hemoplasmas infectando os bovinos de corte amostrados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler S, Ellenbogen V (1934) A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. **General Articles** 219-221.

Aktas M., Ozubek S. (2017) A molecular survey of small ruminant hemotropic mycoplasmosis in Turkey, including first laboratory confirmed clinical cases caused by *Mycoplasma ovis*. **Veterinary Microbiology** 208: 217-222.

Amaral Filho ZP (1986) Solos do Pantanal Matogrossense; Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do Pantanal. Anais (**Documentos EMBRAPA**) 5 :91-104.

Aquino LPCT, Machado RZ, Alessi AC, Marques LC, Castro MB, Malheiros EB (1999) Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94:255-260.

Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF (2007) Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semi-arid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology** 143: 174–181.

Beerntsen BT, James AA, Christensen BM (2000). Genetics of mosquito vector competence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64: 115–137.

Benson DA, Mizrahi IK, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DI (2002) GenBank. **Nucleic Acids Research** 30: 17- 20.

Berent LM, Messick JB (2003) Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infection and Immunity** 71: 3657-3662.

Bhandari S, Asnani PJ (1989) Characterization of phospholipase A2 of mycoplasma species. **Folia Microbiologica** 34: 294-301.

Biondo AW, dos Santos AP, Guimarães AM, Vieira RF, Vidotto O, Macieira de B, Almosny NR, Molento MB, Timenetsky J, de Moraes HA, González FH, Messick JB

(2009) A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 18: 1-7.

Birkenheuer A.J, Levy MG, Breitschwerdt EB (2003) Development and evaluation of a semi nested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology** 41: 4172-4177.

Boulhosa J (1946) Informação Científica. **Boletim Técnico Ministério da Agricultura**: 21-26.

Bretaña A, Nañez B, Contreras-Bretaña M, Giardina S (2002) Multiple infection in bovines from the tropics: observation of blood parasites by scanning and transmission electron microscope. **Parassitologia** 44: 173-178.

Bretaña A, Nañez B, Contreras-Bretaña M, Giardina S (2002) Multiple infection in bovines from the tropics: observation of blood parasites by scanning and transmission electron microscope. **Parassitologia** 44: 173-178.

Cadioli FA, Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Santos GN, André MR, Castilho KJGA, Machado RZ (2015) Detection of *Trypanossoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. **Veterinary Parasitology** 214: 174-177.

Cardoso EL, Silva MLN, Curi N, Ferreira MM, de Freitas DAF (2011) Soil chemical and physical quality under natural tree vegetation and pasture in the Pantanal Wetlands, South of Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 35: 613-622.

Coronato S (1997) Mycoplasmas and AIDS. **Revista Argentina de Microbiología** 29:157-66.

Dagnachew S, Bezie M (2015) Review on *Trypanosoma vivax*. **African Journal of Basic & Applied Sciences** 7:41-64.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) ModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9: 772.

de la Fuente J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas-Cruz A, Domingos AG, Estrada-Peña A, Johnson N, Kocan KM, Mansfield KL, Nijhof AM, Papa A, Rudenko N, Villar M, Alberdi P, Torina A, Ayllón N, Vancova M, Golovchenko M, Grubhoffer L, Caracappa S, Fooks AR, Gortazar C, Rego ROM (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 7:114.

Denman AM (1991) Infectious arthritis in primary disorders of immunoglobulin synthesis. **Current Opinion in Rheumatology** 3: 634-638.

Desquesnes M (2004) Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. **OIE & CIRAD**.

dos Santos AP, dos Santos RP, Biondo AW, Dora JM, Goldani LZ, de Oliveira ST, Guimarães AMS, Timenetsky J, de Moraes HA, González FHD, Messick JB (2008) Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases** 14: 1922-1924.

dos Santos AP, Guimaraes AM, do Nascimento NC, Sanmiguel PJ, Messick JB (2012) Complete genome sequence of *Mycoplasma wenyonii* strain *Massachusetts*. **Journal of Bacteriology** 194: 5458-5459.

Edward DG, Freundt EA (1967) Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. **International Journal of Systematic Bacteriology** 17: 267-268.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - Qualidade da carne bovina. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>> Acesso em 12 ago. 2018.

Ewing CA, Rumsey DH, Langberg AF, Sandler SG (1998) Immuno prophylaxis using intravenous Rh immune globulin should be standard practice when selected D-negative patients are transfused with D-positive Random donor platelets. **Immunology Hematology** 14:133-137.

Fidelis Junior OL, Sampaio PH, Machado RZ, André MR, Marques LC, Cadioli FA (2016) Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical

changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology** 25: 69-81.

Finlay BB, Cossart P (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science** 276: 718–725.

Fujihara Y, Sasaoka F, Suzuki J, Watanabe Y, Fujihara M, Ooshita K, Ano H, Harasawa R (2011) Prevalence of hemoplasma infection among cattle in the western part of Japan. **Journal of Veterinary Medical Science** 73: 1653-1655.

Gardiner, PR. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax* (1989) **Advances in Parasitology** 28: 229-317.

Genova SG, Streeter RN, Velguth KE, Snider TA, Kocan KM, Simpson KM (2011) Severe anemia associated with *Mycoplasma wenyonii* infection in a mature cow. **Canadian Veterinary Journal** 52: 1018-1021.

Gibson W. The significance of genetic exchanges in trypanosomes (1995) **Parasitology Today** 11: 465-468.

Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, De Koning HP, Barrett MP (2016) The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology** 143: 1862-1889.

Giroto A, Zangirólamo AF, Bogado AL, Souza AS, da Silva GC, Garcia JL, Vilas Boas LA, Biondo AW, Vidotto O (2012) Molecular detection and occurrence of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of Southern Brazil, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 21: 342- 344.

Giroto-Soares A, Soares JF, Bogado AL, de Macedo CA, Sandeski LM, Garcia JL, Vidotto O (2016) 'Candidatus Mycoplasma haemobos': Transplacental transmission in dairy cows (*Bos taurus*). **Veterinary Microbiology** 195: 22-24.

Gonçalves L.R., Teixeira M.M.G., Rodrigues A.C., Mendes N.S., Matos C.A., Pereira C.L., Machado R.Z., André M.R. (2018) Molecular detection of *Bartonella* species and haemoplasmas in wild African buffalo (*Syncerus caffer*) in Mozambique, Africa. **Parasitology Open** 15: 1-8.

González LF, García Núñez JA, Perrone C, González-Baradat TM, Gonzatti B, Reyna-Bello MIA (2005) *Trypanosoma vivax*: a novel method for purification from experimentally infected sheep blood. **Experimental Parasitology** 111: 126–129.

Grazziotin AL, Duarte JM, Szabó MP, Santos AP, Guimarães AM, Mohamed A, Vieira RF, de Barros Filho IR, Biondo AW, Messick JB (2011) Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer populations. **Journal of Wildlife Diseases** 47: 1005-1011.

Heinritzi K (1990) The diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection. **Tierärztliche Praxis** 18: 477–481.

Hoare CA (1972) The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. **Blackwell Scientific Publications** 401-429.

Hoelzle, L. E (2008) Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology** 130: 215-226.

Hofmann-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gönczi E, Deplazes P, Braun U, Engels M, Schüpbach J, Jörger K, Thoma R, Griot C, Stärk KD, Willi B, Schmidt J, Kocan KM, Lutz H (2004) Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology** 42: 3775-3780.

Hornok S, Hofmann-Lehmann R, de Mera IG, Meli ML, Elek V, Hajtós I, Répási A, Gönczi E, Tánczos B, Farkas R, Lutz H, de la Fuente J (2010) Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp. **Veterinary Parasitology** 174: 335–338.

Hornok S, Micsutka A, Fernández de Mera IG, Meli ML, Gönczi E, Tánczos B, Mangold AJ, Farkas R, Lutz H, Hofmann-Lehmann R, de la Fuente J (2012) Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. **Research in Veterinary Science** 92: 30-35.

Hornok S, Micsutka A, Meli ML, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2011) Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Veterinary Microbiology** 152: 411-414.

Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution** 23-2: 254-67.

Ibelli AM, Ribeiro AR, Giglioti R, Regitano LC, Alencar MM, Chagas AC, Paço AL, Oliveira HN, Duarte JM, Oliveira MC (2012) Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Veterinary Parasitology** 186: 425–430.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -IBGE - Rebanho de bovinos tem maior expansão da série histórica. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica.html>> Acesso em 10 ago. 2018.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform". **Nucleic Acids Research** 30: 3059–66.

Kirchhoff H, Rosengarten R, Lotz W, Fischer M, Lopatta D (1984) Flask-shaped mycoplasmas: properties and pathogenicity for man and animals. **Israel journal of medical sciences** 20: 848-53.

Kloster AM, Descarga CO, Davies P, Piscitelli HG, Diaz LR, Zielinski GC (1987) Eperythrozoonosis porcina: observaciones sobre la infeccion natural y experimental. **Revista Veterinaria Argentina** 31: 27–40.

Kongsuwan K, Josh P, Colgrave ML, Bagnall NH, Gough J, Burns B, Pearson R (2010) Activation of several key components of the epidermal differentiation pathway in cattle following infestation with the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **International Journal for Parasitology** 40:499–507.

Korn G, Mussgay M (1968) A case of eperythrozoonosis suis and its differential diagnostic significance in relation to suspected swine fever. **Zentralblatt für Veterinärmedizin** 15: 617–630.

Kuramae-Izioka EE (1997) A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**. 19: 683-689.

Leigh JW, Bryant D (2015) PopART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods Ecology Evolution** 6: 1110–1116.

Librado P, Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics** 25: 1451-1452.

Machado CAL, Vidotto O, Conrado FO, Santos NJR, Valente JDM, Barbosa IC, Trindade PWS, Garcia JL, Biondo AW, Vieira TSWJ, Vieira RFC (2017) *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** 55: 1-5.

Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MRF, Valadão IFF, Barci LG, Malheiros EB (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology** 71: 17–26.

Madruga CR (2004) Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanossoma (Duttonella) vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13: 46-47.

Madruga CR, Araújo FR, Cavalcante-Goes G, Martins C, Pfeifer IB, Ribeiro LR, Kessler RH, Soares CO, Miguita M, Melo EP, Almeida RF, Lima MMJr (2006) The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 801-807.

Maggi RG, Compton SM, Trull CL, Mascarelli PE, Mozayeni BR, Breitschwerdt EB (2013a) Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animals contact. **Journal of Clinical Microbiology** 51: 3237-3241.

- Maggi RG, Mascarelli PE, Havenga LN, Naidoo V, Breitschwerdt EB (2013b) Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and “*Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum*” in a veterinarian. **Parasites & Vectors** 6: 103.
- Mcauliffe L, Lawes J, Bell S, Barlow A, Ayling R, Nicholas R (2006) The detection of *Mycoplasma* (formerly *Eperythrozoon*) *wenyonii* by 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology** 117: 292-296.
- McFadden A, Ha HJ, Donald JJ, Bueno IM, van Andel M, Thompson JC, Tisdall DJ, Pulford DJ (2016) Investigation of bovine haemoplasmas and their association with anaemia in New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal** 64: 65-68.
- Meli ML, Willi B, Dreher UM, Cattori V, Knubben-Schweizer G, Nuss K, Braun U, Lutz H, Hofmann-Lehmann R (2010) Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in Swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections, **Journal of Clinical Microbiology** 48: 3563-3568.
- Messick, JB (2004) Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology** 33: 2-13.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)** 1-8.
- Montes AJ, Wolfe DF, Welles EG, Tyler JW, Tepe E (1994) Infertility associated with *Eperythrozoon wenyonii* infection in a bull. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 204: 261-3.
- Nantulya VM (1990) Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Revue scientifique et technique** 9:357-367.
- Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG (2001) Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus* *Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus* *Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus* *Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus*

Mycoplasma wenyonii. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51: 891–899.

Nishizawa I, Sato M, Fujihara M, Sato S, Harasawa R (2010) Differential detection of hemotropic *Mycoplasma* species in cattle by melting curve analysis of PCR products. **Journal of Veterinary Medical Science** 72: 77-79.

Njiru ZK, Ouma JO, Bateta R, Njeru SE, Ndungu K, Gitonga PK, Guya S, Traub R (2011) Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Veterinary Parasitology** 3-4:358-362.

Oliveira MC, Alencar MM, Giglioti R, Beraldo MC, Aníbal FF, Correia RO, Boschini L, Chagas AC, Bilhassi TB, Oliveira HN (2013) Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology** 197:168-75.

Osório AL, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LR, Costa SC (2008) *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 103: 1-13.

Paiva F, Lemos RAA, Nakasato L, Mori AE, Brum KB, Bernardo KC (2000) Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil; Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 9: 135–141.

Palatnik-de-Souza CB, Day MJ (2011) One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & Vectors** 4: 197.

Parker AM, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL, House JK (2018) A review of mycoplasma diagnostics in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 32: 1241-1252.

Patel JB (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Molecular Diagnostics** 4: 313-321.

Razin S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62:1084-1156.

Reagan KL, Clarke LL, Hawley JR, Lin P, Lappin MR (2017) Assessment of the ability of *Aedes* species mosquitoes to transmit feline *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*'. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 19: 798-802.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19: 1572-1574.

Rottem S, Hasin M, Razin S (1973) Differences in susceptibility to phospholipase C of free and membrane-bound phospholipids of *Mycoplasma hominis*. **Biochimica et Biophysica Acta** 323: 520-531.

Russel WC (1966) Alterations in the nucleic acid metabolism of tissue culture cells infected by mycoplasmas. **Nature** 212: 1537-1540.

Sampaio PH (2017) **Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *Trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados**. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Sampaio PH, Fidelis Junior OL, Marques LC, Machado RZ, Barnabé Pde A, André MR, Balbuena TS, Cadioli FA (2015) Acute-phase protein behavior in dairy cattle herd naturally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology** 3-4:141-145.

Sanger F, Niklen, Coulson SAR (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 74: 5163-5169.

Sannusi, A. (1979). Pathological changes associated with experimental *Trypanosoma vivax* infection in Zebu cattle. **Proceedings of the 16th Meeting of the International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control** 203-214.

Santos NJR, Brito DRB, Abate HL, Paixão SF, Soares EDS, Vieira TSWJ, Garcia JL, Vieira RFC, Vidotto O (2018) Hemotropic mycoplasmas infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases** 56:27-29.

Sasaoka F, Suzuki J, Fujihara M, Watanabe Y, Nagai K, Harasawa R (2012) Examination of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' and *Mycoplasma haemofelis*. **Journal of Veterinary Medical Science** 74: 83-87.

Sasaoka F, Suzuki J, Hirata T, Ichijo T, Furuhashi K, Harasawa R, Satoh H (2015) Vertical transmission of *Mycoplasma wenyonii* in cattle, supported by analysis of the ribonuclease P RNA gene - Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica** 63: 271-274.

Shaw JJ, Lainson R (1972) *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** 66: 25–32.

Shi H, Hu Y, Leng C, Shi H, Jiao Z, Chen X, Peng Y, Yang H, Kan Y, Yao L (2018) Molecular investigation of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' in goats and sheep in central China, **Transboundary and Emerging Diseases** 1: 22-27.

Silva RA, da Silva JA, Schneider RC, de Freitas J, Mesquita D, Mesquita T, Ramirez L, Rivera Dávila AM, Pereira ME (1996) Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 91: 561-562.

Singla LD, Juyal PD, Sharma NS (2010) Immune responses to haemorrhagic septicaemia (HS) vaccination in *Trypanosoma evansi* infected buffalo-calves. **Tropical Animal Health and Production** 42: 589–595.

Smith JA, Thrall MA, Smith JL, Salman MD, Ching SV, Collins JK (1990) *Eperythrozoon wenyonii* infection in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 196: 1244–1250.

Song Q, Wang L, Fang R, Khan MK, Zhou Y, Zhao J (2013) Detection of *Mycoplasma wenyonii* in cattle and transmission vectors by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Tropical Animal Health Production** 45: 247-250.

Splitter, EJ (1950) *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp., 2 new blood parasites of swine. **Science** 111: 513–514.

- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. **Societ. of Systematic Biologists** 57: 758-771.
- Steer JA, Tasker S, Barker EN, Jensen J, Mitchell J, Stocki T, Chalker VJ, Hamon M (2011) A novel hemotropic *Mycoplasma* (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. **Clinical Infectious Diseases** 53: 147-151.
- Stoffregen W.C., Alt D.P., Palmer M.V., Olsen S.C., Waters W.R., Stasko J.A. (2006) Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). **Journal of Wildlife Diseases** 42: 249-58.
- Stover BC, Muller KF (2010) Tree Graph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics** 11: 1-9.
- Su QL, Song HQ, Lin RQ, Yuan ZG, Yang JF, Zhao GH, Huang WY, Zhu XQ (2010) The detection of 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' in cattle and buffalo in China. **Tropical Animal Health and Production** 42: 1805-1808.
- Sutton RH, Charleston WA, Collins GH (1977) *Eperythrozoon wenyonii* – A blood parasite of cattle. A first report in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal** 25: 8–9.
- Sykes, JE (2010) Feline hemotropic mycoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** 20: 62-69.
- Tagawa M, Matsumoto K, Inokuma H (2008) Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology** 132: 177-180.
- Tagawa M, Matsumoto K, Yokoyama N, Inokuma H (2010) Comparison of the effect of two hemoplasma species on hematological parameters in cattle. **Journal of Veterinary Medical Science** 1:113-115.
- Tagawa M, Yamakawa K, Aoki T, Matsumoto K, Ishii M, Inokuma H (2013) Effect of chronic hemoplasma infection on cattle productivity. **Journal of Veterinary Medical Science** 75: 1271-1275.

Tagawa M, Ybanez AP, Matsumoto K, Yokoyama N, Inokuma H (2012) Prevalence and risk factor analysis of bovine hemoplasma infection by direct PCR in Eastern Hokkaido. Japan. **Journal of Veterinary Medical Science** 74: 1171-1176.

Taylor K, Authié E. (2004) Pathogenesis of animal trypanosomiasis. **The Trypanosomiasis (ed. Maudlin I., Holmes P. H. and Miles M. A.)** 331–353.

Taylor-Robinson D (1996) *Mycoplasmas* in rheumatoid arthritis and other human arthritides. **Journal of Clinical Pathology** 49:781-782.

Wang X, Cui Y, Zhang Y, Shi K, Yan Y, Jian F, Zhang L, Wang R, Ning C. Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma ovis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemovis*') in sheep and goats in China. **BMC Veterinary Research** 13:142.

Wells EA (1984) Animal trypanosomiasis in South America. **Preventive Veterinary Medicine** 2: 31-41.

Wells EA, Betancourt A, Ramirez LE (1977) Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 71: 448-9.

Witter R, Melo ALT, Pacheco TA, Meneguzzi M, Boas RV, Nakazato VDL, Chitarra CS, Oliveira ACS, Pacheco RC (2017) Prevalence of 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil. **Ciência Rural** 47: 1-6.

Woese CR (1987) Bacterial evolution. **Microbiology Reviews** 51:221-271.

Yan Z, Liu J, Chen T, Cheng Z, Guo H, Wang Z, Wang Y (2008) Treatment of *Mycoplasma wenyonii* infection in cows with imidocarb dipropionate injection-acupuncture. **Journal of Acupuncture & Meridian Studies** 1: 143-148.

Yaro M., Munyard K.A., Stear M.J., Groth D.M. (2016) Combatting African Animal Trypanosomiasis (AAT) in livestock: The potential role of trypanotolerance. **Veterinary Parasitology**. 225 (2016) 43-52.

Yuan CL, Liang AB, Yao CB, Yang ZB, Zhu JG, Cui L, Yu F, Zhu NY, Yang XW, Hua XG (2009) Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research** 70: 890-894.

Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP (2014) **Biologia Molecular Básica**, Artmed Editora 5 (2014) 68-69.

Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M (2002) Cultivating the uncultured. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99: 15681–15686.

Zhao Y, Ren Z, Kang Q, Chen Y, Wang X, Tang X, Zhang F, Qin J (2017) Development of an antigen specific colloidal gold immunochromatographic assay for detection of antibody to *M. wenyonii* in bovine sera. **Journal of Microbiological Methods** 143: 58-62.