

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/08/2020.

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

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA ASSOCIADA À
INFECÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM
SUÍNOS DOMÉSTICOS NO BRASIL**

Karina Sonálio
Médica Veterinária

2020

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

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA ASSOCIADA À
INFECÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM
SUÍNOS DOMÉSTICOS NO BRASIL**

Karina Sonálio

Orientador: Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira

Coorientador: 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 Medicina Veterinária, área: Clínica Médica
Veterinária

2020

S698o Sonálio, Karina
Ocorrência e diversidade genética associada à infecção por
micoplasmas hemotrópicos em suínos domésticos no Brasil / Karina
Sonálio. -- Jaboticabal, 2020
40 p. : il., tabs.

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

Orientador: Luis Guilherme de Oliveira

Coorientador: Marcos Rogério André

1. Sanidade de suínos. 2. Hemoplasmose. 3. Diagnóstico molecular.
4. Diversidade genética. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

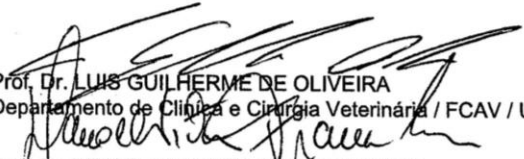
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA ASSOCIADA A INFECÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM SUÍNOS DOMÉSTICOS NO BRASIL

AUTORA: KARINA SONALIO

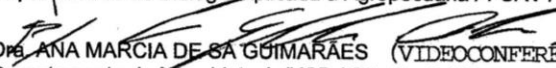
ORIENTADOR: LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA

COORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIS GUILHERME DE OLIVEIRA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Dra. ANA MARCIA DE SA GUIMARÃES (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Microbiologia/USP / São Paulo/SP

Jaboticabal, 20 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KARINA SONALIO – Nascida em 5 de janeiro de 1993, na cidade de Arroio Trinta, Santa Catarina - Brasil, é médica veterinária formada pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em 2018. Foi bolsista do Programa Ciência sem Fronteiras, tendo como instituição acolhedora a Iowa State University (EUA) no ano de 2014. Ainda, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial Medicina Veterinária - UFU de 2015 a 2018, sob a orientação do Prof. Dr. Marcus Vinícius Coutinho Cossi. No ano de 2017 participou do Programa Supervisor Trainee na empresa BRF, na cidade de Uberlândia. Em 2018, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária, pela UNESP - Câmpus de Jaboticabal, como bolsista CAPES, sob a orientação do Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira e coorientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André.

“Compreender constantemente. Trabalhar sempre. Descansar, quando se mostre necessária a pausa de refazimento. Parar nunca.”

Francisco Cândido Xavier

Dedico

Aos meus pais, Iracema e Agostinho Sonálio por tudo que fazem para que possa continuar os estudos, e a Deus por guiar os meus passos ao longo do caminho.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos anjos de luz por guiarem o meu caminho, de forma que eu pudesse utilizar a sabedoria recebida para chegar até a finalização deste trabalho.

Aos meus Pais Agostinho e Iracema Sonálio pelo apoio e amor incondicional recebido em todos os momentos da minha vida, mas acima de tudo, por todo o sacrifício que vocês têm feito para que eu pudesse dar continuidade aos meus estudos. Serei eternamente grata por TUDO, e lembrem-se, essa vitória é nossa! Amo vocês!

As minhas irmãs Kati e Kely pelos puxões de orelha, pelo apoio, mas principalmente por contribuírem para a minha formação pessoal e profissional, pois vocês são um exemplo para mim.

Ao meu cunhado Nilo por compartilhar conhecimento técnico e profissional, além de todo apoio recebido até hoje. Ainda, agradeço imensamente você e a minha irmã Kati, por um dos melhores presentes recebidos até hoje, a Sofia, uma mocinha inteligentíssima e amorosa, que poderá contar sempre com a Tia Karina.

Ao meu namorado Tiago por estar sempre ao meu lado independentemente da situação, me ajudando, com a sua calma, a superar todas as adversidades encontradas ao longo do caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Guilherme de Oliveira pelo conhecimento passado no decorrer da pós-graduação, pela compreensão demonstrada, mas principalmente pela oportunidade de evoluir pessoalmente e profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Marcos Rogério André, pelos ensinamentos, coorientação e todo auxílio prestado para que a realização desse trabalho fosse possível. Agradeço ainda toda a equipe do Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV, em especial a Lívia, Priscila e Renan, pela prestatividade, persistência (porque entre sequenciamento e clonagem, não sei o que foi pior), auxílio e colaboração demonstrada durante todo o período de execução do projeto.

Ao colega Igor Gatto, pela ajuda na condução deste e outros trabalhos já realizados. Ao colega José Vanderlei, que se dispôs a realizar todas as coletas de sangue necessárias para a execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Suínos: Marina, Henrique, Marcela, Maria Eugênia, Gabriel, Fernando e Beatriz pela amizade, apoio (inclusive emocional), espetinhos, caminhadas, e principalmente pela disposição em ajudar independentemente da situação. Obrigada!

Aos meus amigos Patrícia, Rafa, Letícia, Sthefany, Gabi, Vanessa e Renato por todos os momentos compartilhados até aqui, e por todos os outros que virão! Contém comigo sempre!!!

Ao Grupo de Estudos em Suínos da FCAV por me receberem de braços abertos e acreditarem que eu posso contribuir para o bom andamento deste.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal pela estrutura necessária e fundamental para a realização do trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS	xvi
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Etiologia da hemoplasmosose em suínos	3
2.2. Ocorrência e aspectos epidemiológicos associados à doença	4
3 REFERÊNCIAS	8
CAPÍTULO II – MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENETIC DIVERSITY ASSOCIATED WITH SWINE HEMOTROPHIC MYCOPLASMAS IN DOMESTIC PIGS IN BRAZIL	11
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUCTION	13
2 MATERIAL E METHODS	15
2.1 Study design.....	15
2.2 Epidemiologic data collection.....	16
2.3 Sampling and DNA extraction.....	16
2.4 Conventional PCR for the mammals- <i>gapdh</i> gene.....	16
2.5 Porcine hemoplasmas-qPCR based on the 16S rRNA gene.....	17
2.6 cPCR for mycoplasmas based on the 16S rRNA gene.....	18
2.7 cPCR for mycoplasmas based on the 23S rRNA gene.....	19
2.8 Cloning of 16S and 23S rRNA amplicons.....	19
2.9 Amplification reaction of plasmid DNA fragments	20
2.10 Sequencing.....	21
2.11 Sequence analyses	21

2.12 Phylogenetic analysis.....	21
2.13 Statistical analyses.....	22
3 RESULTS	23
3.1 High occurrence of porcine hemoplasmas on qPCR	23
3.2 Genetic diversity and coinfection of <i>M. parvum</i> genotypes in pigs	26
3.3 Characterization of <i>M. parvum</i>	28
3.4 Impact of <i>M. parvum</i> on pig production.....	31
4 DISCUSSION.....	32
5 CONCLUSION.....	36
6 CONFLIT OF INTEREST.....	36
7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	36
8 REFERENCES.....	36

CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

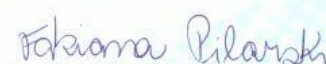
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma suis* em suínos de terminação**", protocolo nº 005173/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	03/05/2018 a 31/01/2020
Espécie / Linhagem	<i>Sus scrofa domesticus</i>
Nº de animais	450
Peso / Idade	130Kg / 150 dias
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Granjas tecnificadas no estado de Goiás

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

OCORRÊNCIA DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM SUÍNOS DOMÉSTICOS NO BRASIL

RESUMO – *Mycoplasma suis* e *Mycoplasma parvum* se ligam fortemente aos eritrócitos e causam hemoplasmoses em suínos. Os animais infectados podem ser portadores assintomáticos ou apresentar sinais inespecíficos, acometendo todas as faixas etárias. No Brasil, os estudos sobre a ocorrência e a diversidade genética associada aos hemoplasmas suínos (HS) são escassos. Portanto, este trabalho teve como objetivo detectar, quantificar e caracterizar a diversidade genética da HS em animais terminados de granjas tecnificadas no estado de Goiás, Brasil. Amostras de sangue total de 450 de 30 granjas diferentes localizadas no estado de Goiás, foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e armazenadas a -80 °C. A extração de DNA seguiu o método “in house” descrito previamente. A PCR convencional (cPCR) direcionada ao gene endógeno *gapdh* foi realizada para evitar resultados falso-negativos nos testes seguintes. Os ensaios de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foram realizados a fim de detectar e quantificar DNA de *Mycoplasma* baseado no gene 16S rRNA para HS. Para avaliar a diversidade genética da HS, realizou-se a clonagem e sequenciamento dos genes 16S rRNA e 23S rRNA para hemoplasmas. Os resultados da qPCR mostraram uma ocorrência de HS de 68,89%, onde todas as fazendas tinham pelo menos dois animais positivos. A quantificação na qPCR variou de 8.43×10^{-1} a 4.69×10^6 μL , e 52.71% das amostras apresentaram 1×10^3 cópias/ μL . Além disso, o teste do coeficiente de Spearman revelou que a ocorrência de HS está inversamente associada ao número de partos por semana, leitões desmamados por semana e peso de abate. Já a análise filogenética utilizando os métodos de Máxima Verossimilhança e Bayesiana, demonstrou que os 22 clones obtidos a partir do fragmento 16S rRNA formaram um único cluster intimamente relacionado a *M. parvum*. Ainda, sete genótipos foram encontrados nas análises genéticas dessas 22 sequências, mesmo se tratando de um gene conservado. Análises filogenéticas por Máxima Verossimilhança e Bayesiana realizadas para os sete clones do fragmento 23S rRNA, resultaram em um clado associado a *M. parvum* (NR121958). Portanto, os resultados demonstram pela primeira vez a presença de *M. parvum* em suínos amostrados no estado de Goiás, e confirmam a existência de diferentes genótipos de *M. parvum* circulando entre granjas de suínos no Brasil.

Palavras – Chave: hemoplasmas suínos, *Mycoplasma parvum*, granjas tecnificadas, genótipos, suínos domésticos

OCCURRENCE OF HEMOTROPIC MICOPLASMAS IN DOMESTIC PIGS IN BRAZIL

ABSTRACT – *Mycoplasma suis* and *Mycoplasma parvum* are strongly bound to erythrocytes and cause hemoplasmosis in pigs. Infected animals can be asymptomatic carriers or have nonspecific signs, affecting all age groups. In Brazil, studies on the occurrence and genetic diversity associated with porcine hemoplasmas (PH) are scarce. Therefore, this work aimed to detect, quantify and characterize the genetic diversity of PH in finished animals from technified farms in the state of Goiás, Brazil. Whole blood samples from 450 animals from 30 different farms located in the state of Goiás, were collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and stored at -80°C. DNA extraction followed the "in house" method previously described. Conventional PCR (cPCR) targeting the *gapdh* endogenous gene was performed to avoid false negative results in the following tests. Quantitative real-time PCR (qPCR) assays were performed in order to detect and quantify *Mycoplasma* DNA based on the 16S rRNA gene for PH. To assess the genetic diversity of PH, cloning and sequencing of the 16S rRNA and 23S rRNA genes for hemoplasmas was performed. The results of the qPCR showed a PH occurrence of 68.89%, where all farms had at least two positive animals. The quantification in the qPCR varied from 8.43×10^{-1} to 4.69×10^6 μL , and 52.71% of the samples presented 1×10^3 copies / μL . Furthermore, the Spearman coefficient test revealed that the occurrence of PH is inversely associated with the number of births per week, piglets weaned per week and slaughter weight. Phylogenetic analysis using the Maximum Likelihood and Bayesian methods, demonstrated that the 22 clones obtained from the 16S rRNA fragment formed a single cluster closely related to *M. parvum*. In addition, seven genotypes were found in the genetic analysis of these 22 sequences, even though it is a conserved gene. Phylogenetic analyzes by Maximum Likelihood and Bayesian performed for the seven clones of the 23S rRNA fragment, resulted in a clade associated with *M. parvum* (NR121958). Furthermore, the results demonstrate for the first time the presence of *M. parvum* in pigs sampled in the state of Goiás and confirm the existence of different genotypes of *M. parvum* circulating among pig farms in Brazil.

Keywords: porcine hemoplasmas, *Mycoplasma parvum*, technified farms, genotypes, domestic swine

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Parameters for PH-qPCR assays	23
Tabela 2. Herd-level prevalence and range of qPCR results	25
Tabela 3. Genotype identification of <i>Mycoplasma parvum</i> 16S and 23S rRNA sequences from five different samples	27

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

	Página
Figura 1. Location of the farms according to its geographical coordinates...	15
Figura 2. Box plot showing qPCR quantification cycle (Cq) results and distribution of starting quantity (SQ)	24
Figura 3. Genotypic network of previously deposited 16S rRNA PH sequences and the sequences obtained on this study, generated with TCS v.1.21 software. GEN #1 to GEN #7 represent the seven genotypes obtained from the 22 16S rRNA sequences	28
Figura 4. Phylogenetic tree based on an alignment of ~800 bp fragment of <i>Mycoplasma</i> spp. 16S rRNA sequences, using ML method and the TIM1+I+G evolutionary model. Numbers at the nodes correspond to bootstrap. Accession numbers are indicated in the sequences. <i>Mycoplasma</i> spp. Sequences detected in the present study are highlighted in bold and colored in purple.....	29
Figure 5. Phylogenetic tree based on <i>Mycoplasma</i> spp. 23S rRNA sequences, using the Bayesian method and the TIM1+G evolutionary model. Numbers at the nodes correspond to bootstrap.....	30
Figura 6. Network analysis of <i>Mycoplasma</i> 16S rRNA sequences obtained from pigs sampled in the present study, compared to mycoplasma sequences retrieved from GenBank. The analysis was performed with Splitstree software using the parameters “Neighbor-Net and” Uncorrected p-distance”. <i>Mycoplasma</i> spp. sequences detected in the present study are colored in purple. <i>M. suis</i> sequences are	

colored in blue, while *M. parvum* sequences are colored in
yellow.....

31

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Micoplasmas hemotrópicos são parasitas de hemácias que acometem diversas espécies, incluindo os suínos. Dentre os hemoplasmas suínos, encontram-se *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma parvum* e *Mycoplasma haemosuis*, descrito recentemente. São micro-organismos pequenos, desprovidos de parede celular e que ainda não foram cultivados “in vitro”. *M. suis* possui grande tropismo pelas hemácias ocasionando quadros de anemia infecciosa, enquanto *M. parvum* e *M. haemosuis* são menos estudados e parecem não ter ação patogênica para os suínos.

Na infecção por *M. suis*, o agente pode aderir à superfície das hemácias ou invadi-las, fazendo com que o sistema imune do animal desencadeie o processo de apoptose dos glóbulos vermelhos, resultando em quadros de anemia hemolítica severa, além de danos vasculares e imunossupressão. Ainda, a doença pode apresentar-se de forma aguda ou crônica, sendo a última a mais comum. A fase aguda ocorre quando há intensa bacteremia, de forma que os animais podem apresentar anemia severa, febre, icterícia, enterite, necrose gangrenosa de orelhas, hipoglicemia, e até morte. Já a fase crônica costuma estar associada a baixa bacteremia e à redução do desempenho produtivo e reprodutivo dos suínos. Além disso, *M. suis* pode predispor os animais a infecções secundárias, permitindo que outros agentes os infectem e causem doença, o que pode desencadear um grande impacto econômico na suinocultura. Por outro lado, a infecção por *M. parvum* foi descrita como não-patogênica para suínos, mesmo em quadros de intensa bacteremia. Apesar de ser geneticamente parecido com *M. suis*, *M. parvum* infecta apenas alguns eritrócitos, e, portanto, não resulta em sinais clínicos.

Dentre os possíveis fatores associados à cronicidade da hemoplasmosse suína, pode-se citar o uso de antimicrobianos em subdoses, prática comum na produção suinícola brasileira, que pode mascarar os sinais clínicos e perpetuar a infecção no rebanho, uma vez que o agente não é destruído e pode evadir-se à ação do sistema imune por mecanismos de resistência. Além disso, crescem as preocupações relacionadas ao mercado consumidor de carne suína que busca uma criação livre do

uso de antimicrobianos, prática que tende a desafiar o atual sistema produtivo brasileiro.

Ainda, a ocorrência de hemoplasmas em suínos tem sido reportada nos principais países produtores, incluindo no Brasil, onde *M. suis* e *M. parvum* já foram descritos. Apesar dos trabalhos realizados, dados sobre a ocorrência de hemoplasmas em suínos domésticos no Brasil ainda são escassos, bem como informações sobre variações genéticas desse agente. Portanto, o presente trabalho é importante para elucidar a hipótese de que a ocorrência de hemoplasmas em suínos terminados é alta e que existem diversidades genéticas entre o agente. Sendo assim, objetivou-se realizar a detecção e a quantificação de hemoplasmas suínos em animais de terminação pela técnica de qPCR visando o gene 16S rRNA, além de avaliar a ocorrência de diversidade genética com base nos genes 16S e 23S rRNA.

5. Conclusions

Our results indicate, for the first time, the occurrence of coinfections by different genotypes of *M. parvum* in the same animal and inside a technified pig herd. Molecular characterization of 16S and 23S partial gene of *M. parvum* was also described, along with porcine hemoplasmas occurrence (68.89%) in technified farms in Goiás State, Brazil.

6. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

7. Acknowledgements

The authors would like to thank the individuals who directly helped with the research. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. MRA is a fellowship researcher of “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq Process number # 302420/2017-7).

8. References

- Acosta, D.B., Ruiz, M., Sanchez, J.P., 2019. First molecular detection of *Mycoplasma suis* in the pig louse *Haematopinus suis* (Phthiraptera: Anoplura) from Argentina. *Acta Trop.* doi:10.1016/j.actatropica.2019.04.007
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GeneBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype)

- and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4172–4177. doi:10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Charlebois, A., Jacques, M., Archambault, M., 2014. Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2014.00183
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* doi:10.1046/j.1365-294X.2000.01020.x
- core Team, R., 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
- Darriba, D., Posada, D., 2012. jModelTest 2.0 Manual. *Nat. Methods* 9, 772. doi:10.1093/molbev/msn083
- Do Nascimento, N.C., Dos Santos, A.P., Chu, Y., Guimaraes, A.M., Baird, A.N., Weil, A.B., Messick, J.B., 2014. Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. *Vet. Res.* doi:10.1186/s13567-014-0086-7
- do Nascimento, N.C., Guimaraes, A.M.S., Dos Santos, A.P., Chu, Y., Marques, L.M., Messick, J.B., 2018. RNA-Seq based transcriptome of whole blood from immunocompetent pigs (*Sus scrofa*) experimentally infected with *Mycoplasma suis* strain Illinois. *Vet. Res.* doi:10.1186/s13567-018-0546-6
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. II. Error Probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186
- Ewing, B., Hillier, L.D., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185. doi:10.1101/gr.8.3.175
- Felder, K.M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Kilchling, T., Schiele, D., Heinritzi, K., Groebel, K., Hoelzle, L.E., 2011. Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 27, 557–564. doi:10.1159/000329957
- Fu, Y., Shi, T., Xu, L., Wei, W., Lu, F., Zhang, X., Yuan, X., Li, J., Lv, J., Fang, W., 2017. Identification of a novel Hemoplasma species from pigs in Zhejiang province, China. *J. Vet. Med. Sci.* doi:10.1292/jvms.16-0545
- Gatto, I.R.H., Sonálio, K., Amaral, R.B.D., Morés, N., Dalla Costa, O.A., André, M.R., de Oliveira, L.G., 2019. High frequency and molecular characterization of porcine

- hemotrophic mycoplasmas in Brazil. *Vet. Microbiol.* 231. doi:10.1016/j.vetmic.2019.02.024
- Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M.M., Ziegler, U., Hoelzle, L.E., 2009. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. *Infect. Immun.* 77, 576–584. doi:10.1128/IAI.00773-08
- Guimaraes, A.M.S., Biondo, A.W., Lara, A.C., Messick, J.B., 2007. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. *Vet. Rec.* 160, 50–53. doi:10.1136/vr.160.2.50
- Guimaraes, A.M.S., Vieira, R.F.C., Poletto, R., Vemulapalli, R., Santos, A.P., de Moraes, W., Cubas, Z.S., Santos, L.C., Marchant-Forde, J.N., Timenetsky, J., Biondo, A.W., Messick, J.B., 2011. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Mycoplasma suis*. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05053.x
- Henry, S.C., 1979. Clinical observations on eperythrozoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*
- Hoelzle, K., Engels, M., Kramer, M.M., Wittenbrink, M.M., Dieckmann, S.M., Hoelzle, L.E., 2010. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). *Vet. Microbiol.* 143, 405–409. doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.015
- Hoelzle, L.E., 2008. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.023
- Hoelzle, L.E., Adelt, D., Hoelzle, K., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., 2003. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/S0378-1135(03)00040-3
- Hoelzle, L.E., Helbling, M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Wittenbrink, M.M., 2007. First LightCycler real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in clinical samples. *J. Microbiol. Methods* 70, 346–354. doi:10.1016/j.mimet.2007.05.009
- Hoelzle, L.E., Zeder, M., Felder, K.M., Hoelzle, K., 2014. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. *Vet. J.* doi:10.1016/j.tvjl.2014.07.023
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2018. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* doi:10.1093/bib/bbx108
- Kuramae-Izioka, 1997. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation from *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* for RAPD. *Rev. Unimar.*
- Lau, A.O.T., Cereceres, K., Palmer, G.H., Fretwell, D.L., Pedroni, M.J., Mosqueda, J., McElwain, T.F., 2010. Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia*

- bovis within an endemic population. *Mol. Biochem. Parasitol.* doi:10.1016/j.molbiopara.2010.03.017
- Maggi, R.G., Chitwood, M.C., Kennedy-Stoskopf, S., DePerno, C.S., 2013. Novel hemotropic *Mycoplasma* species in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 607–611. doi:10.1016/j.cimid.2013.08.001
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees, in: 2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010. doi:10.1109/GCE.2010.5676129
- Posada D., B.T.R., 2004. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics : Advantages of Akaike. *Syst.Biol.* 53, 793–808. doi:10.1080/10635150490522304
- Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* doi:10.1128/mmbr.62.4.1094-1156.1998
- Ritzmann, M., Grimm, J., Heinritzi, K., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Vet. Microbiol.* 133, 84–91. doi:10.1016/j.vetmic.2008.06.015
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2006. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep. *Cold Spring Harb. Protoc.* doi:10.1101/pdb.prot4084
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Schreiner, S.A., Hoelzle, K., Hofmann-Lehmann, R., Hamburger, A., Wittenbrink, M.M., Kramer, M.M., Sokoli, A., Felder, K.M., Groebel, K., Hoelzle, L.E., 2012. Nanotransformation of the haemotrophic *Mycoplasma suis* during in vitro cultivation attempts using modified cell free *Mycoplasma* media. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2012.05.022
- Seo, M.G., Kwon, O.D., Kwak, D., 2019. Prevalence and phylogenetic analysis of hemoplasma species in domestic pigs in Korea. *Parasites and Vectors.* doi:10.1186/s13071-019-3638-x
- Song, Q., Zhang, W., Song, W., Liu, Z., Khan, M.K., He, L., Fang, R., Li, P., Zhou, Y., Hu, M., Zhao, J., 2014. Seroprevalence and risk factors of *Mycoplasma suis* infection in pig farms in central China. *Prev. Vet. Med.* doi:10.1016/j.prevetmed.2014.07.006
- Splitter, E.G., 1950. *Eperythrozoon suis* and *Eperythrozoon parvum*: two new blood parasites of swine. *Science.* 111:513-514

- Stadler, J., Jannasch, C., Mack, S.L., Dietz, S., Zöls, S., Ritzmann, M., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2014. Clinical and haematological characterisation of *Mycoplasma suis* infections in splenectomised and non-splenectomised pigs. *Vet. Microbiol.* 172, 294–300. doi:10.1016/j.vetmic.2014.05.012
- Stadler, J., Willi, S., Ritzmann, M., Eddicks, M., Ade, J., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., 2019. Detection of *Mycoplasma suis* in pre-suckling piglets indicates a vertical transmission. *BMC Vet. Res.* doi:10.1186/s12917-019-2001-y
- Stöver, B.C., Müller, K.F., 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11. doi:10.1186/1471-2105-11-7
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Toledo, M.A., Leite, A.I., Gonçalves, L.R., Sousa, K.C.M. de, Amaral, R.B. do, Silva, G.C.P. da, Machado, R.Z., André, M.R., 2016. High occurrence of *Mycoplasma suis* infection in swine herds from non-technified farms in Mossoró, state of Rio Grande do Norte, Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária*. doi:10.1590/s1984-29612016084
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkw256
- Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K., Harasawa, R., 2011. Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16s rRNA and RNase P RNA genes. *J. Vet. Med. Sci.* doi:10.1292/jvms.11-0293
- Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K., Harasawa, R., 2012. Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers. *J. Vet. Med. Sci.* 74, 1315–1318. doi:10.1292/jvms.12-0096
- Yuan, C.L., Liang, A.B., Yao, C.B., Yang, Z.B., Zhu, J.G., Cui, L., Yu, F., Zhu, N.Y., Yang, X.W., Hua, X.G., 2009. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *Am. J. Vet. Res.* 70, 890–894. doi:10.2460/ajvr.70.7.890