

**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.

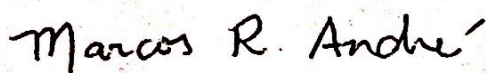
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

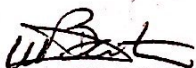
AUTORA: VICTÓRIA VALENTE CALIFRE DE MELLO

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

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



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



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



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 Califre 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 endemidade 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micoplasmas hemotrópicos

Hemoplasmas (micoplasmas hemotrópicos) são bactérias Gram-negativas do gênero *Mycoplasma* pertencentes à família Mycoplasmataceae, ordem Mycoplasmatales e classe Mollicutes, com ausência de parede celular e alta plasticidade na membrana externa (Edward e Freundt, 1967). Apresentam formato pleomórfico (cocoidal, anelar ou bastonete), e localizam-se na superfície dos eritrócitos e, eventualmente, podem ser encontradas livres no plasma. A parede celular e alguns mecanismos biossintéticos se perderam ao longo da evolução a partir de um ancestral composto por bactérias Gram-positivas (Woese, 1987). Para se adaptar ao modo de vida parasitário, os hemoplasmas apresentam genes que codificam adesinas e antígenos de superfície variáveis, possibilitando a evasão do sistema imune do hospedeiro (Razin et al., 1998).

Tais agentes parasitam os glóbulos vermelhos e, a partir deles, adquirem nutrientes necessários à sua sobrevivência, tais como ácidos graxos, aminoácidos e vitaminas. Até o momento, tais bactérias mostraram-se incultiváveis em laboratório (Biondo et al., 2009). O fracasso do cultivo pode estar relacionado à incapacidade de reproduzir, em meios de cultura, o complexo nutricional que as células do hospedeiro são capazes de oferecer (Berent e Messick, 2003). Por serem incultiváveis *in vitro*, as análises sistemáticas de sua fisiologia, patologia e imunogenicidade são escassos, sendo uma barreira para o estudo deste grupo de patógenos (Hoelzle, 2008; Finlay e Cossart, 1997; Zengler et al., 2002). Ao infectar os eritrócitos, os hemoplasmas podem causar deformações na superfície destas células hospedeiras (Neimark et al., 2001).

Embora os mecanismos de patogenicidade dos hemoplasmas ainda não tenham sido totalmente elucidados, sugere-se que a patogenia da hemoplasmose esteja relacionada com a secreções de enzimas que levam à ruptura de hemácias (Rottem et al., 1973; Bhandari e Asnani et al., 1989) e à captação de nutrientes ou precursores biossintéticos, ocasionando danos às células hospedeiras (Russel, 1966) e o desenvolvimento de auto-anticorpos, os quais, por sua vez, desencadeiam distúrbios imunológicos (Denman, 1991).

Para adesão à célula hospedeira, os micoplasmas não-hemotrópicos contam com uma estrutura em forma de “frasco” que apresenta uma organela em sua extremidade, mediando sua ligação com o hospedeiro (Kirchhoff et al., 1984). Os hemoplasmas, por sua vez, não possuem essa estrutura, mas são capazes de aderir à superfície dos eritrócitos por meio de proteínas relacionadas à citoaderência, as quais permitem a citoadesão e crescimento de tais agentes nos eritrócitos (Messick, 2004).

Infecções por hemoplasmas raramente são letais em hospedeiros saudáveis; mais comumente, a infecção torna-se crônica (Messick, 2004). Infecções crônicas por hemoplasmas já foram associadas a doenças imunossupressoras, como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), doenças reumáticas, como a artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Taylor-Robinson, 1996; Coronato, 1997), entre outras. Hemoplasmas atuam como cofatores na progressão de retroviroses e outras doenças debilitantes. Mesmo com o uso de antibióticos e resposta imune, os animais infectados provavelmente permanecem portadores do agente (Messick, 2004).

O potencial zoonótico desses agentes ainda é pouco conhecido. Até o presente momento, cinco espécies de hemoplasmas foram detectadas por métodos moleculares em seres humanos: *Mycoplasma haemofelis*-like (Dos Santos et al., 2008), *Mycoplasma suis*-like (Yuan et al., 2009), *Mycoplasma ovis* (Sykes, 2010; Maggi et al., 2013a), ‘*Candidatus Mycoplasma haemohominis*’ (Steer et al., 2011) e ‘*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*’ (Maggi et al., 2013 a, b).

Dentre as espécies de micoplasmas hemotrópicos descritas, *Mycoplasma wenyonii* (Mw) e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ (CMh) foram detectadas em bovinos. Anteriormente, a espécie *M. wenyonii* pertencia a outro gênero, sendo classificada como *Eperythrozoon wenyonii*, e posicionada dentro da família Anaplasmataceae, na ordem Rickettsiales. Entretanto, em 2001, análises filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA mostraram que a espécie estava mais relacionada ao gênero *Mycoplasma*, e portanto, a espécie *E. wenyonii* foi transferida para tal gênero, passando a ser denominada *Mycoplasma wenyonii* (Neimark et al., 2001). Desta forma, os parasitas de células sanguíneas conhecidos como *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* spp. foram reclassificados como micoplasmas

hemotrópicos, ou hemoplasmas, com base na forte evidência filogenética de sequências do gene 16S rRNA (Messick, 2004).

Em geral, os organismos pertencentes ao gênero *Mycoplasma* apresentam genoma de pequeno tamanho (0,58-1,4 Mbp) e baixo conteúdo de C + G (23%–40%), o que os torna, em grande parte, dependentes da célula hospedeira (Parker et al., 2018). Os membros do gênero *Mycoplasma* possuem apenas dois operons do gene 16S rRNA. A região nomeada ITS, ou intergênica, entre os genes 16S e 23S rRNA, apresenta grande variação, e devido a isso é um dos marcadores genéticos utilizados na diferenciação entre as espécies do gênero *Mycoplasma* spp. (Sasaoka et al., 2012). A primeira sequência completa do genoma de *M. wenyonii* foi anunciada por Dos Santos et al. (2012). A sequência de *M. wenyonii* (amostra Massachusetts) compreende um cromossomo circular único com cerca de 650.228 pb. O conteúdo de C+G é de 33,9%, corroborando com o esperado para as bactérias do gênero.

2.2. Transmissão e ciclo biológico

A localização dos hemoplasmas na superfície dos eritrócitos facilita a transmissão via vetores artrópodes hematófagos, tais como piolhos, moscas e mosquitos. Há evidência de que a reprodução dessas bactérias se dá por meio de fissão binária, entretanto seu ciclo biológico ainda não foi descrito (Messick, 2004).

A epidemiologia das hemoplasmoses ainda não foi completamente elucidada (Hornok et al., 2011). Embora nenhum vetor biológico tenha sido identificado na transmissão das hemoplasmoses, acredita-se que os vetores artrópodes estejam associados à transmissão mecânica em algumas espécies (Neimark et al., 2001; Messick, 2004). Há trabalhos descritos na literatura sugerindo transmissão vertical, pela via transplacentária (Fujihara et al., 2011; Hornok et al., 2011; Giroto-Soares et al., 2016). Ainda, qualquer processo que transfira hemácias infectadas entre os membros de um rebanho pode favorecer a disseminação dos agentes, tais como vacinação, descorna, castração e marcação auricular (Messick, 2004).

O período de incubação da hemoplasmoze varia em relação à susceptibilidade, estresse fisiológico do hospedeiro e ao nível de infecção (Hoelzle, 2008). Suínos saudáveis infectados experimentalmente via injeção intraperitoneal

mostraram corpúsculos de *Mycoplasma suis* detectáveis nas hemácias após período de três a sete dias (Korn e Mussgay, 1968). Por sua vez, quando inoculado em suínos esplenectomizados, o período de incubação foi menor, variando de 2 a 10 dias, segundo Splitter (1950), Kloster et al. (1987), Heinritzi (1990), conforme citado por Hoelzle (2008).

Carrapatos *Dermacentor* spp. coletados de bovinos infectados com *M. wenyonii* na Europa mostraram-se negativos para o agente. Ainda, foi sugerido que piolhos do gênero *Haematopinus* pudessem atuar como vetores de *M. wenyonii* (Hofmann-Lehmann et al., 2004). Entretanto, espécimes de *Haematopinus eurysternus* colhidos de um rebanho endêmico para *M. wenyonii* na Hungria mostraram-se negativos para o agente (Hornok et al., 2010). O vetor envolvido na transmissão de ‘C. M. haemobos’ permanece desconhecido.

Hornok e colaboradores (2011) avaliaram a ocorrência hemoplasmas em vetores artrópodes hematófagos (Diptera: Culicidae, Tabanidae, Muscidae) amostrados no norte da Hungria, por meio de cPCR baseado no gene 16S rRNA. Quatro espécies de dípteros analisados (*Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans*, *Tabanus bromius* e *T. bovinus*) mostraram-se potencialmente envolvidas na transmissão de hemoplasmas. *M. wenyonii* foi mais frequentemente encontrado nos vetores quando comparado a ‘C. M. haemobos’. Esta foi a primeira confirmação molecular do agente em vetores artrópodes.

Piolhos, moscas e mosquitos foram avaliados por Song e colaboradores (2013) a fim de verificar a presença de hemoplasmas e seu papel na transmissão dos agentes de hemoplasmosse bovina na China. Os insetos foram testados por PCR e LAMP, ambos baseados no gene 16S rRNA, para detecção de *M. wenyonii*. Dezoito piolhos (69,2% - 18/26), 20 moscas (66,6% - 20/30) e 21 mosquitos (80,8% - 21/26) mostraram-se positivos em ambas as técnicas de detecção. Os autores sugerem que tais artrópodes poderiam atuar como vetores mecânicos para *M. wenyonii*.

Reagan e colaboradores (2017) avaliaram a presença de DNA de hemoplasmas em mosquitos *Aedes vexans* coletados no Colorado, EUA. Os mosquitos foram capturados por armadilha de luz, coletados em rede para peixes, identificados e agrupados em “pools” contendo 50 mosquitos cada. Um total de

5,95% (5/84) amostras mostrou-se positiva na PCR baseada no gene 16S rRNA para hemoplasmas. O sequenciamento das amostras confirmou a positividade para *M. wenyonii* em 20% (1/5) das amostras. Os autores sugerem que embora mosquitos *A. vexans* não atuem como os principais transmissores de hemoplasmas, tais insetos poderiam atuar como vetores mecânicos.

Recentemente, '*Candidatus* Mycoplasma haemobos' foi identificado infectando carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na província de Henan, na China (Shi et al., 2018). Para tal, 132 amostras de carrapatos foram colhidas de caprinos, ovinos e da área de pastagem dos ruminantes, e posteriormente testadas quanto à presença de hemoplasmas por ensaios de PCR baseados no gene 16S rRNA. DNA de '*Ca. M. haemobos*' foi identificado em 53% (70/132) das amostras de carrapatos. Os autores concluíram que carrapatos da espécie *R. microplus* também podem atuar como vetores mecânicos.

Transmissão transplacentária de hemoplasmas bovinos foi sugerida inicialmente por Fujihara e colaboradores (2011), ao avaliar a presença de '*C. M. haemobos*' e *M. wenyonii* em amostras de bezerros, no Japão. Das quatro amostras de sangue de bezerros submetidas à PCR em tempo real (qPCR) baseada no gene 16S rRNA, 100% mostraram-se positivas para '*C. M. haemobos*'. A transmissão transplacentária foi sugerida visto que os bezerros avaliados haviam nascido no inverno, estação na qual há escassez de vetores artrópodes. Segundo os autores, a via mais provável de infecção seria a vertical, proveniente das matrizes que haviam sido expostas aos vetores durante a pastagem do verão.

Transmissão transplacentária de *M. wenyonii* foi a via de infecção mais provável, segundo os autores, em bovinos de corte em uma fazenda no Japão, por meio da PCR baseada no gene da ribonuclease P (RNase P). Amostras de sangue de bezerros neonatos, de suas respectivas mães, e de colostro foram colhidas imediatamente após o parto. As vacas foram previamente avaliadas quanto à infecção por *M. wenyonii* por meio de PCR em tempo real baseada no gene 16S rRNA, pela qual todas (100%) mostraram-se positivas para o referido agente. Enquanto nenhuma amostra de colostro mostrou-se positiva, quatro (23,5%) das 17 amostras de sangue de bezerros testados mostraram-se positivas para o agente por meio da PCR baseada no gene RNase P. Os autores sugeriram, além da

transmissão horizontal de *M. wenyonii* por vetores artrópodes, a transmissão vertical entre bovinos (Sasaoka et al., 2015).

No Brasil, Girotto-Soares et al. (2016) também avaliaram a ocorrência de transmissão transplacentária de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' em vacas e fetos bovinos abortados na cidade de Presidente Getúlio, estado de Santa Catarina. Para isso, amostras de sangue de 22 vacas e de tecidos de seus respectivos fetos abortados foram submetidas a ensaios de PCR para hemoplasmas baseados no gene 16S rRNA. Das 22 vacas e fetos analisados, 9 (40,9%) e 4/22 (18,2%) mostraram-se positivos, respectivamente. No entanto, dois dos fetos positivos eram oriundos de vacas negativas. Como a amostra analisada foi relativamente pequena e não houve significância estatística entre os resultados da PCR das vacas e de seus fetos, não se pôde concluir de fato a ocorrência de transmissão transplacentária de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' entre os animais amostrados.

Embora as condições climáticas de nosso país favoreçam o desenvolvimento de vetores artrópodes, não se sabe ao certo qual vetor é de fato competente na transmissão desses agentes entre bovinos (Biondo et al., 2009).

2.3. Hemoplasmas em bovinos no Brasil e no mundo

Em 1934, Adler e Ellenbogen relataram pela primeira vez o agente *Eperythrozoon wenyonii*, posteriormente denominado *Mycoplasma wenyonii*, em esfregaço sanguíneo de um bezerro de 9 meses de idade esplenectomizado, proveniente de Jerusalém, Israel. O animal apresentava bactérias de formato cocóide na superfície dos eritrócitos e anisocitose. O nome "wenyonii" do parasita descrito foi uma homenagem ao Dr. C. M. Wenyon, do Wellcome Bureau of Scientific Research.

Na Nova Zelândia, o primeiro relato de *M. wenyonii* ocorreu em 1977, acidentalmente, em uma análise de esfregaço sanguíneo de bovinos (Sutton et al., 1977). No entanto, não se pôde afirmar que o agente era de fato *M. wenyonii*, uma vez que técnicas moleculares não foram utilizadas para tal confirmação. Em 2016, McFadden e colaboradores buscaram avaliar a ocorrência de hemoplasmas em bovinos neste mesmo país. Para isso, amostras de sangue de 47 bovinos foram testadas. Destas, 19 (40%) mostraram-se positivas para micoplasmas hemotrópicos

por meio de PCR baseada no gene 16S rRNA, das quais 13/47 (28%) pertenciam à espécie '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' e 6/47 (13%) à *M. wenyonii*.

O primeiro relato de *M. wenyonii* na Suíça ocorreu em 2004, por Hofmann-Lehmann e colaboradores, após um surto de anemia que forçou os proprietários a realizarem eutanásia nas vacas de leite como medida de controle para evitar a disseminação da doença. Um total de 58 amostras de sangue foram testadas por PCR baseada no gene 16S rRNA para *M. wenyonii*; destas 37,93% (22/58) mostraram-se positivas para hemoplasmas. Os autores verificaram a presença de *Anaplasma marginale*, *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Theileria* spp. e *M. wenyonii* infectando 90% dos animais doentes testados pela PCR. Cinco agentes foram detectados concomitantemente em 5,40% (2/37) animais, quatro agentes em 21,6% (8/37), três agentes em 35,14% (13/37) e dois agentes em 37,8% (14/37) dos animais. Adicionalmente, 100% (5/5) das amostras de piolhos e moscas (4/4) colhidas dos animais mostraram-se positivas pela PCR. No entanto, os autores consideraram que *A. phagocytophilum* foi o principal agente causador de anemia, e que as coinfeções teriam agravado a progressão da enfermidade.

Hornok e colaboradores (2012) investigaram a presença de micoplasmas hemotrópicos em bovinos de corte na Hungria. Amostras de sangue de 75 bovinos de corte foram colhidas e posteriormente 24 delas foram submetidas a ensaios de qPCR baseado no gene 18S rRNA para detecção de hemoplasmas. Uma ocorrência de 91,7% (22/24) foi encontrada para *M. wenyonii* e 87,5% (21/22) co-infectados por '*Ca. M. haemobos*'. Em 31,8% (7/22) das amostras, o número de cópias de '*Ca. M. haemobos*' foi maior em relação ao número de cópias de *M. wenyonii*. A análise molecular para hemoplasmoses foi realizada adicionalmente à pesquisa de *Anaplasma* spp. devido a um surto de anaplasmoses, onde a infecção aguda foi relatada em cinco animais, dos quais dois vieram a óbito. O agente *Anaplasma* spp. foi identificado em 92% (69/75) dos bovinos e em 2,67% (2/75) das amostras também houve positividade para *Rickettsia* spp. O efeito patogênico da co-infecção por hemoplasmas só pôde ser avaliado nos três animais sobreviventes à infecção aguda de anaplasmoses. Destes, uma vaca severamente afetada demonstrou coinfeção com hemoplasmas, enquanto os outros dois, levemente sintomáticos, não estavam coinfectados.

Na Venezuela, Bretaña e colaboradores (2002) avaliaram amostras de sangue de bovinos esplenectomizados por meio de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As amostras de sangue avaliadas mostraram infecção por três tipos de microrganismos. A morfologia dos microrganismos encontrados era condizente com os hemoparasitas das espécies *Anaplasma marginale*, *M. wenyonii* e *Trypanosoma vivax*, demonstrando a existência de coinfeção.

O **Quadro 1** e a **Figura 1** elencam estudos adicionais de ocorrência de *Mw* e 'CMh' realizados em bovinos de diferentes países.

Quadro 1. Ocorrência molecular de *Mycoplasma wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ em bovinos em diferentes localidades no mundo.

Referência	País	Amostras de sangue de bovinos corte/leite	Técnica (cPCR/qPCR e gene alvo)	Resultados (% animais positivos)
McAuliffe et al., 2006	Inglaterra	3 amostras de sangue de vacas leiteiras da raça Friesian Holstein	cPCR – 16S rRNA	100% (3/3) - <i>Mw</i>
Tagawa et al., 2008	Japão	78 bovinos de leite	cPCR – 16S rRNA	38,46% (30/78) - hemoplasmas 56,6% (17/30) - <i>Mw</i> 43,3% (13/30) - ‘CMh’ 13,3% (4/30) – <i>Mw</i> e ‘CMh’
Su et al., 2010	China	25 búfalos 12 “yellow cattle” 42 vacas de leite	cPCR – 16S rRNA	32% (8/25) das amostras de búfalos - ‘CMh’ 41,7% (5/12) das amostras “yellow cattle” - ‘CMh’ 14,3% (6/42) vacas de leite – ‘CMh’

Tagawa et al., 2010	Japão	103 bovinos de leite	cPCR – 16S rRNA	22,3% (23/103) – hemoplasmas 60,9% (14/23) – <i>Mw</i> 30,4% (7/23) – ‘CMh’ 8,7% (2/23) – <i>Mw</i> e ‘CMh’
Nishizawa et al., 2010	Japão	109 bovinos de corte e de leite	qPCR – 16S rRNA	61,5% (67/109) – <i>Mw</i> 22,9% (25/109) – ‘CMh’ 12,8% (14/109) – <i>Mw</i> e ‘CMh’
Meli et al., 2010	Suíça	216 amostras de sangue – vacas de leite	qPCR – 16S rRNA	76,85% (166/216) – <i>Mw</i> 59,72% (129/216) – ‘CMh’ 52,77% (114/216) – <i>Mw</i> e ‘CMh’
Hornok et al., 2011	Hungria	38 vacas de corte e de seus respectivos bezerros	qPCR – 18S rRNA	100% (38/38) vacas – hemoplasmas 10,5% (4/38) neonatos: 25% (1/4) – <i>Mw</i> 50% (2/4) – ‘CMh’ 25% (1/4) – <i>Mw</i> e ‘CMh’
Fujihara et al., 2011	Japão	68 bovinos de leite	qPCR – 16S rRNA	80,9% (55/68) – hemoplasmas 52,7% (29/55) – ‘CMh’ 47,3% (26/55) – <i>Mw</i>

Tagawa et al., 2012	Japão	343 bovinos de leite	cPCR – 16S rRNA	64,7% (222/343) - <i>Mycoplasma</i> spp. 59,45% (132/222) – <i>Mw</i> 60,36% (134/222) – ‘CMh’ 19,81% (44/222) - <i>Mw</i> e ‘CMh’
Giroto et al., 2012	Brasil	433 bovinos de leite	cPCR – 16S rRNA	61% (264/433) - ‘CMh’
Tagawa et al., 2013	Japão	93 vacas de leite e de seus respectivos bezerros (com exceção de 13 natimortos)	cPCR – 16S rRNA	89,2% (83/93) – vacas hemoplasmas 35,5% (33/93) vacas – <i>Mw</i> 19,4% (18/93) vacas – ‘CMh’ 34,4% (32/93) – <i>Mw</i> e ‘CMh’ 14,1% (10/71) – bezerros hemoplasmas 70% (7/10) – <i>Mw</i> 20% (2/10) – ‘CMh’ 30% (3/10) – <i>Mw</i> e ‘CMh’
Witter et al. (2017)	Brasil	320 amostras – vacas leiteiras	cPCR – 16SrRNA	64,7% (207/320) - ‘CMh’

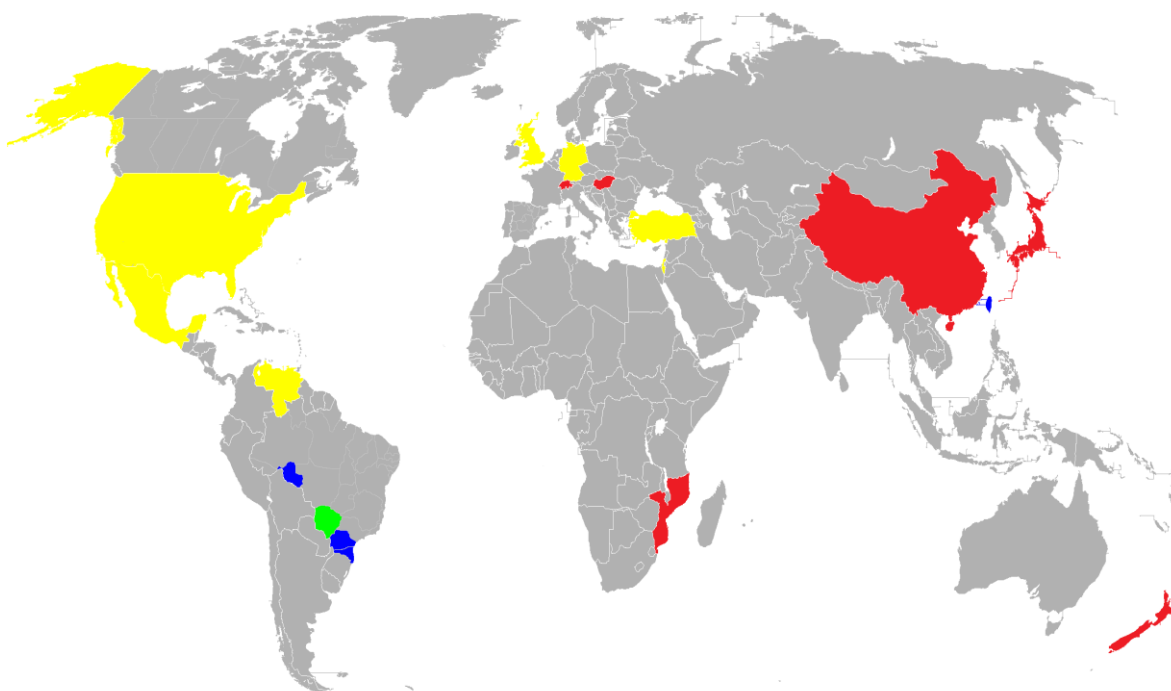


Figura 1. Ocorrência de *Mycoplasma wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ em bovinos de diferentes regiões do mundo. Em amarelo, está evidenciado a ocorrência de *Mw*, em azul de ‘*CMh*’, em vermelho a ocorrência de ambos e, por fim, em verde, a área do qual o presente estudo avaliou a ocorrência de ambos hemoplasmas. Fonte: Elaborada pela autora.

2.4. Hemoplasmas em outras espécies de ruminantes no Brasil

Grazziotin e colaboradores (2011) avaliaram a ocorrência de hemoplasmas em 103 cervídeos amostrados no Brasil. Amostras de anel leucocitário de 103 cervídeos foram fornecidas pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE – Jaboticabal/SP); destas, 64 amostras eram provenientes de cervos-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) coletadas na região da hidrelétrica de Porto Primavera (PP - no rio Paraná), 18 amostras eram de veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) capturados no Pantanal e 21 amostras eram provenientes de *O. bezoarticus* capturados no Parque Nacional das Emas (PNE). Um total de 58% (60/103) dos animais mostraram-se positivos em ensaios de cPCR baseados nos genes 16S e 23S rRNA; destes, 76,6% (46/60) das amostras positivas eram de *B.*

dichotomus provenientes da hidrelétrica de Porto Primavera, 16,6% (10/60) de *O. bezoarticus* do Pantanal e 6,6% (4/60) de *O. bezoarticus* do Parque Nacional das Emas (PNE). O sequenciamento das amostras e a análise filogenética revelou que as sequências encontradas se relacionavam a *M. ovis*, '*Candidatus Mycoplasma erythrocervae*' e com um hemoplasma não nomeado descrito em um cervo de cativeiro no Brasil (Grazziotin et al., 2011).

Santos e colaboradores (2017) avaliaram a presença de hemoplasmas em amostras de sangue de búfalos d'água no estado do Maranhão. Das 290 amostras testadas, 34,8% (101/290) mostraram-se positivas na PCR para hemoplasmas baseada no gene 16S rRNA. Destas, 15,84% (15/101) mostraram-se positivas apenas para *M. wenyonii*, 5,94% (6/101) para '*C. M. haemobos*' e 69,22% (79/101) para ambos os agentes.

Machado e colaboradores (2017) amostraram 402 caprinos provenientes de cinco fazendas de leite e três de corte no estado de Paraíba. Um total de 39,3% (158/400) das amostras mostrou-se positivas para *Mycoplasma* spp. pela cPCR baseada no gene 16S rRNA. O sequenciamento das amostras positivas revelou 99% de identidade com sequências de *M. ovis*.

2.5. Sinais clínicos, diagnóstico e tratamento da hemoplasmose bovina

'*Candidatus Mycoplasma haemobos*' e *M. wenyonii* podem causar anemia hemolítica em ruminantes (Fujihara et al., 2011). Os hemoplasmas se aderem à superfície dos eritrócitos e induzem alterações estruturais em sua membrana. A anemia hemolítica resultante está associada à produção de anticorpos secundários anti-eritrócitários (Tagawa et al., 2010). Os fatores de risco associados à infecção aguda incluem idade, doenças intercorrentes, imunossupressão e esplenectomia (Messick, 2004).

A infecção por hemoplasmas em bovinos pode ainda causar febre transitória, linfadenopatia, infertilidade, redução de peso, anorexia e redução na produção de leite (Hoelzle et al., 2010). Abortamento e estro tardio também foram relatados durante a fase aguda da infecção (Smith et al., 1990; Messick, 2004; Tagawa et al., 2013). Edema escrotal foi relatado em um touro Charolês de 16 meses de idade infectado cronicamente por *M. wenyonii* (Montes et al., 1994). Em vacas leiteiras

cronicamente infectadas foram relatados inchaço nos tetos e nas porções distais dos membros posteriores, linfadenopatia, febre transitória, pelagem alterada, redução na produção de leite, perda de peso e ineficiência reprodutiva (Smith et al., 1990).

A infecção crônica normalmente está relacionada à ausência de sinais clínicos, e ocorrem em animais não-esplenectomizados, aparentemente saudáveis e imunocompetentes; entretanto, animais cronicamente infectados podem se tornar anêmicos após eventos de imunossupressão (Biondo et al., 2009; Messick, 2004; Tagawa et al., 2013). A presença ou ausência do baço nos hospedeiros, a espécie de hemoplasma, a patogenicidade da amostra, a via de infecção e a parasitemia podem influenciar a gravidade da infecção (Messick, 2004). O potencial patogênico dos hemoplasmas ainda é incerto, e coinfeções podem contribuir sinergicamente, principalmente quando a infecção resulta em imunossupressão (Meli et al., 2010; McFadden et al., 2016).

Inicialmente, o diagnóstico das infecções por hemoplasmas baseava-se na avaliação de esfregaços sanguíneos corados pelo método de Romanowsky, onde era possível observar o patógeno na superfície dos eritrócitos e, eventualmente, livre no plasma sanguíneo. Esfregaços sanguíneos corados com laranja de acridina também podem ser utilizados para detecção do agente (Biondo et al., 2009). Entretanto, devido a parasitemia e à infecção crônica, a técnica de esfregaço sanguíneo não se mostra como a melhor ferramenta para diagnóstico, uma vez que exibe baixa sensibilidade e baixa especificidade.

Deteção sorológica de anticorpos para *M. wenyonii* por meio de Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) também é utilizada como método de diagnóstico. No entanto, tal método apresenta baixa acurácia e sensibilidade. Visto isso, recentemente, Zhao e colaboradores (2017) analisaram os antígenos mais imunorreativos de *M. wenyonii* por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-page) e Western-blot. As proteínas foram extraídas do gel e purificadas, para desenvolver um ensaio imunocromatográfico de ouro coloidal (sp. – GICA – teste de fita) utilizando as proteínas de membrana, a fim de detectar anticorpos anti-*M. wenyonii*. Os resultados obtidos no teste sp. – GICA foram comparados com aqueles obtidos no ELISA; o primeiro teste apresentou 95,48% e 92,86% de especificidade e sensibilidade em comparação ao ELISA, e

também demonstrou repetibilidade. O teste de fita e o ELISA mostraram uma concordância de 94,92%. O desenvolvimento desse teste foi possível devido à pureza do antígeno. No entanto, pesquisas adicionais devem ser realizadas a fim de verificar se há ou não diferença entre os antígenos de diferentes amostras e regiões geográficas.

O desenvolvimento de técnicas moleculares, como por exemplo a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), forneceu ferramentas de diagnóstico extremamente sensíveis, mais precisas e específicas, por meio da amplificação de fragmentos particulares de DNA. O gene 16S rRNA dos hemoplasmas é um dos mais utilizados (Messick, 2004); no entanto, quando a análise é inconclusiva devido ao alto grau de similaridade entre as sequências do referido gene, a análise da subunidade de RNA do gene ribonuclease P (RNase P) pode levar a uma melhor diferenciação (Sasaoka et al., 2015).

Outra forma de diagnóstico molecular para hemoplasmoses é a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP). Tal técnica utiliza dois pares de *primers* que reconhecem seis regiões distintas no gene-alvo. A reação é isotérmica, variando de 60° a 65°C, e utiliza a enzima BST DNA Polimerase. Song e colaboradores (2013) compararam a eficiência do diagnóstico dos hemoplasmas bovinos pela LAMP e PCR convencional, ambas baseadas no gene 16S rRNA. De um total de 330 amostras de sangue de bovinos testadas, 21,5% (71/330) mostraram-se positivas para *M. wenyonii* pela LAMP, enquanto 18,8% (62/330) foram positivas pela PCR. A diferença no número de amostras positivas pode ter ocorrido devido às diferentes regiões-alvo no gene 16S rRNA nas quais os *primers* se ligam. Os autores mostraram que a LAMP é uma ferramenta precisa e rápida que também pode ser utilizada na detecção de hemoplasmas.

O tratamento das infecções por hemoplasmas é realizado geralmente com tetraciclina (Genova et al., 2011). Ainda, Yan e colaboradores (2008) investigaram a eficácia do tratamento das hemoplasmoses com imidocarb em 16 vacas apresentando anorexia e pirexia. As vacas foram encaminhadas ao Hospital Universitário Veterinário do Colégio de Ciência Animal e Medicina Veterinária, na China, onde foram relatados febre, taquicardia e taquipneia. Testes laboratoriais demonstraram acidose, hipoglicemia e anemia leve. Ainda, parasitas nas superfícies

dos eritrócitos e livres no plasma semelhantes a *M. wenyonii*, em cerca de 90% dos eritrócitos, foram observados nos esfregaços sanguíneos. Todas as vacas mostraram-se positivas na PCR para *M. wenyonii* baseada no gene 16S rRNA. Destas, 13 vacas foram tratadas durante 15 dias com dipropionato de imidocarb (1 mg/kg), e após o tratamento, mostraram-se clinicamente curadas e com seus eritrócitos livres de parasitas nos novos esfregaços sanguíneos realizados.

2.6. *Trypanosoma vivax* e imunossupressão

Tripanossomíase é uma doença causada por hemoprotozoários do gênero *Trypanosoma*, que pode afetar humanos, animais domésticos, silvestres e de produção. *Trypanosoma vivax* é um hemoprotozoário encontrado na África, na América do Sul e América Central. A tripanossomíase bovina por *T. vivax* é uma enzootia com origem no continente africano, transmitida de forma cíclica e biológica por moscas tsé-tsé (*Glossina* spp.) (Paiva et al., 2000).

Segundo Wells (1984), o estabelecimento de *T. vivax* no continente americano se deu em 1830, por meio de importações de animais domésticos pelos colonizadores portugueses e espanhóis de gado do Senegal para a Guiana Francesa e ilhas de Martinica e Guadalupe. Entretanto, a mosca tsé-tsé, vetor biológico responsável pela transmissão do agente no continente africano encontra-se ausente nos demais continentes (Américas Central e do Sul). Nessas regiões, ocorre apenas transmissão mecânica por insetos nativos do grupo dos tabanídeos (Subordem Brachycera, família Tabanidae) e por *Stomoxys calcitrans*, na ausência dos vetores biológicos *Glossina morsitans*, *G. pallidipes* e *G. swynnertoni* (Paiva et al., 2000),

Para as espécies que infectam mamíferos, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em duas seções: Salivaria e Stercoraria. *Trypanosoma vivax* é um hemoprotozoário pertencente à família Trypanosomatidae, seção Salivaria, gênero *Trypanosoma* e subgênero *Dutonella* (Hoare, 1972). As principais características dos tripanosomas pertencentes ao subgênero *Dutonella* são os grandes cinetoplastos terminais situados na extremidade posterior, membrana ondulante e flagelo livre (Osório et al., 2008). O grande cinetoplasto das formas tripomastigotas de *T. vivax*, por si só, já é uma grande característica diagnóstica, facilitando a identificação em esfregaços

sanguíneos (Hoare, 1972). Como o próprio nome indica, os protozoários pertencentes à seção Salivaria são aqueles que localizam-se nas glândulas salivares de seus vetores mecânicos e biológicos, sendo inoculados no hospedeiro por meio da saliva. Essa seção pode ser dividida em quatro subgêneros: *Dutonella*, *Nannomonas*, *Pycnomonas* e *Trypanozoon*. Por sua vez, os parasitos pertencentes à seção Stercoraria desenvolvem-se no sistema gastrointestinal dos vetores e a transmissão ocorre a partir das fezes (Hoare, 1972).

No Brasil, o primeiro relato de *T. vivax* parasitando bovinos ocorreu em 1946, no estado do Pará (Boulhosa, 1946). Mais tarde, na década de 1970, foi relatado em búfalos do mesmo estado (Shaw e Lainson, 1972). No ano de 1995, Silva e colaboradores identificaram *T. vivax* na região de Poconé, Pantanal, Mato Grosso (MT), em bovinos apresentando febre, lacrimejamento, anemia profunda e perda de peso, que resultaram em morte. Posteriormente, novos casos foram relatados no mesmo estado, com manifestações clínicas adicionais ainda mais sérias como abortamento e nascimento de bezerros enfraquecidos, sucedido por morte (Osório et al., 2008). Um levantamento sorológico realizado no mesmo estado, entre os anos de 1975 a 1976, visando detectar anticorpos anti-*T. vivax* por meio de Imunofluorescência Indireta indicou a presença de anticorpos em 54% (360/666) dos bovinos amostrados (Wells et al., 1977).

Em 2004, Madruga e colabores avaliaram a ocorrência de *T. vivax* no estado do Pará e na região do Pantanal Sul-Matogrossense. Amostras de soro de bovinos foram colhidas das seguintes cidades pantaneiras: Corumbá, Miranda, Aquidauana, Rio Negro, Rio Verde e Porto Murtinho. As prevalências de *T. vivax* foram de 71,9% (394/548), 59,3% (127/214), 69,6% (359/516), 28,1% (141/501), 51,5% (298/579) e 57,3% (86/150), respectivamente, com um total de 56% (1405/2508) de positividade. As amostras foram analisadas por meio de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), com antígeno bruto do hemoprotozoário para detecção de anticorpos anti-*T. vivax*. A ocorrência de *T. vivax* no Pantanal foi maior do que a encontrada em Belém (30,7% (324/1056)). Segundo os autores, esse fato pode estar ligado à presença de uma maior área alagadiça no Pantanal, que resulta no aumento da população de insetos hematófagos e faz com que haja uma redução da área de pastagem durante a cheia, aumentando a quantidade de animais por área,

resultando em problemas nutricionais e facilitando a transmissão da tripanossomíase via tabanídeos.

Os sinais clínicos da tripanossomíase incluem pirexia, esplenomegalia, perda de peso, abortamento, imunossupressão e redução na produção de leite (Giordani et al., 2016). Lesões degenerativas e inflamatórias foram relatadas, podendo prejudicar vários órgãos, como coração, sistema nervoso central, ovários, testículos, olhos e glândula pituitária. A imunossupressão causada pelos tripanossomas pode afetar a saúde do hospedeiro, interferindo na vacinação contra outras doenças (Singla et al., 2010) e podendo aumentar a susceptibilidade a outras infecções. A fase aguda da infecção pode levar o animal a óbito dentro de poucas semanas; caso contrário, o animal pode desenvolver infecção crônica, com parasitemia sub-patente ou intermitente que gera fadiga e infertilidade, podendo perdurar até a morte do animal (Taylor e Authié, 2004). A anemia é o principal sinal clínico da tripanossomíase bovina (Sannusi, 1979 *apud* Gardiner, 1989).

Métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares de diagnóstico são amplamente utilizados ao redor do mundo. Os períodos de baixa parasitemia ou aparasitêmicos, associados aos sinais clínicos inespecíficos dificultam o diagnóstico da doença (Batista et al., 2007; Fidelis Junior et al., 2016). Na América Latina e África, utilizam-se muito comumente os métodos parasitológicos para diagnóstico da tripanossomíase, os quais apresentam baixa sensibilidade para detecção de *T. vivax* durante a fase crônica da infecção, onde verifica-se baixa parasitemia (Osório et al., 2008; Dagnachew E Bezie, 2015). Os métodos sorológicos, como por exemplo o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), são ferramentas importantes na investigação do agente, mas não possibilitam diferenciar infecção ativa daquelas já finalizadas (Nantulya, 1990), tampouco o início das infecções (Fidelis Junior et al., 2016; Sampaio, 2017), uma vez que está envolvida na detecção de anticorpos e não do agente em si. Os métodos moleculares, em especial a Amplificação Circular Isotérmica do DNA (LAMP), apresenta alta sensibilidade e especificidade para detecção de *T. vivax* (Njiru et al., 2011; Cadioli et al., 2015).

A diversidade genética de *T. vivax* é bem maior nas amostras africanas do que nos isolados da América Latina (Desquesnes, 2004), devido à baixa recombinação gênica em decorrência da ausência das moscas tsé-tsé nas Américas

(Gibson, 1995). Provavelmente, esses fatos ajudam a explicar a capacidade do gado das Américas controlarem a infecção temporariamente, enquanto o mesmo não ocorre com o gado africano.

Dessa forma, o atual estudo propôs identificar e caracterizar molecularmente a ocorrência de hemoplasmas em bovinos de corte do Pantanal Sul-Matogrossense brasileiro, contribuindo para o esclarecimento da epidemiologia das hemoplasmoses, numa região endêmica para tripanossomose bovina. Uma vez que *T. vivax* está associado à imunossupressão e predispõe os animais a infecções secundárias, a hipótese do presente trabalho é que seria encontrada uma elevada ocorrência de *Mycoplasma* spp. nos animais amostrados no Pantanal brasileiro.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo investigar, por meio de métodos moleculares, a ocorrência e diversidade genética de hemoplasmas em bovinos de corte amostrados no Pantanal Sul-Matogrossense, além de confirmar, por meio de métodos sorológicos, o endemismo para tripanossomose bovina na região sob estudo.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar, por meio de métodos sorológicos, o endemismo de *Trypanosoma vivax* na área sob estudo;
- Investigar, por meio de técnicas moleculares, a presença de DNA de *Mycoplasma wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ em amostras de sangue de bovinos de corte amostrados no Pantanal Sul-Matogrossense;
- Verificar a relação entre os animais soropositivos para *T. vivax* e positivos na PCR para *Mycoplasma* spp.
- Traçar inferências filogenéticas das sequências de hemoplasmas obtidas por meio da construção de filogramas;
- Investigar a diversidade de genótipos de hemoplasmas detectados nos animais sob estudo;
- Realizar análises de distância a fim de visualizar eventos mutacionais que ocorreram entre as sequências nucleotídicas de hemoplasmas ao longo da evolução.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécies amostradas e área de estudo

As colheitas de sangue foram realizadas em rebanhos de bovinos de corte (*Bos taurus indicus*) mantidos em regime extensivo, provenientes de cinco propriedades selecionadas por conveniência, concentradas na região central do Pantanal Sul Matogrossense, na subregião da Nhecolândia (18° 59' 15" S; 56° 37' 03") (**Figura 2**). Uma vez que não existe determinação da prevalência de hemoplasmas em bovinos nesse estado, foi pressuposta uma prevalência esperada de 50%, conforme Stevenson (2005).

O tamanho da amostra foi determinado através do método de amostragem aleatória sistemática, onde o número mínimo de animais tinha precisão absoluta de 5% e intervalo de confiança de 95%, como indicado pela fórmula abaixo:

$$n = z^2 (1 - P_y) \times P_y / d^2$$

Onde:

z = coeficiente de confiança ($z = 1,96$);

n = tamanho da amostra;

P_y = prevalência esperada (50%);

d = precisão absoluta desejada (5%);

(STEVENSON, 2005).

Dessa forma, foram colhidas amostras de sangue de 400 animais, das categorias: vaca (≥ 6 anos) e bezerros (7-12 meses).

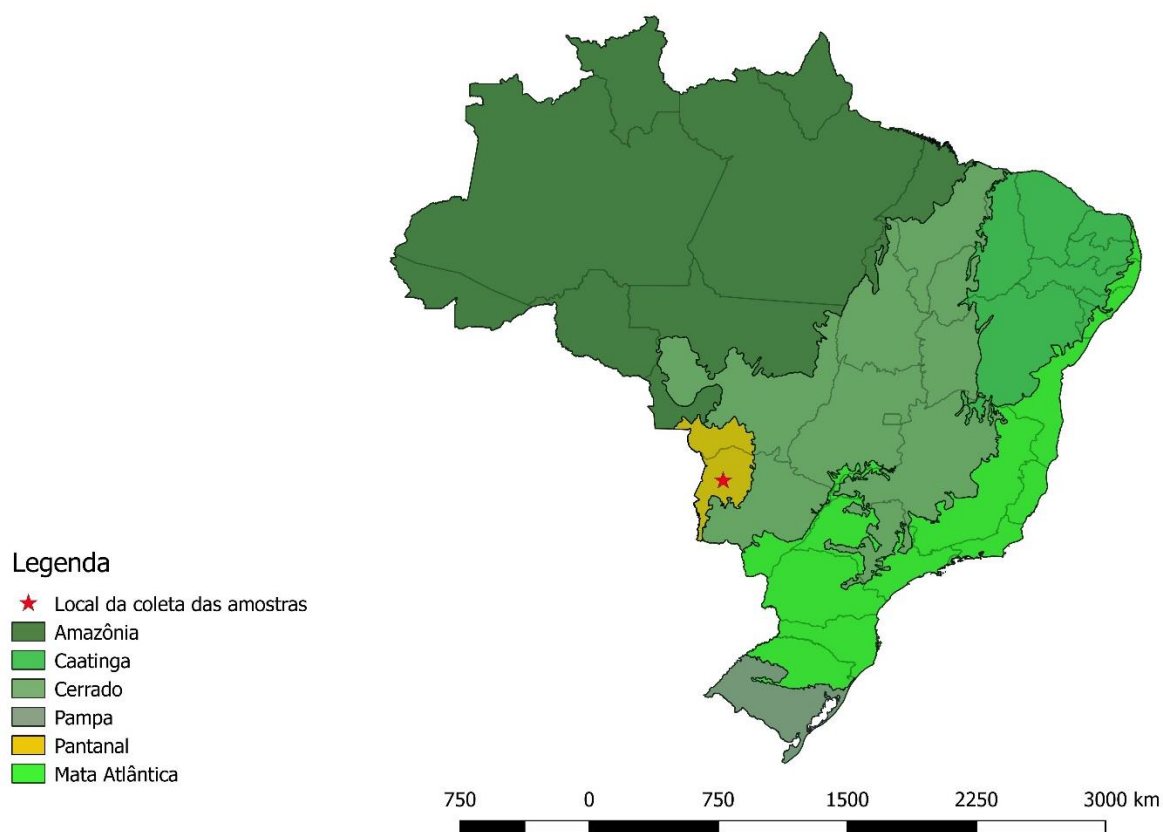


Figura 2. Mapa do Brasil evidenciando o Pantanal com enfoque para a sub-região da Nhecolândia, localidade onde amostras de sangue de bovinos de corte foram colhidas.

4.2. Colheita das amostras

Amostras de sangue de 400 bovinos foram colhidas diretamente da veia jugular ou caudal. As amostras foram colhidas em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para extração de DNA, que posteriormente foi utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) para hemoplasmas. Amostras de soro sanguíneo também foram obtidas em tubos sem anticoagulante para a realização do Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA) para detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma vivax*. Os animais escolhidos para a amostragem foram aqueles nascidos e criados na região do Pantanal Sul-Matogrossense, totalizando 200 vacas e 200 bezerros (400 animais). O projeto foi desenvolvido de acordo com as normas do Conselho Nacional de

Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo nº 12375/15.

4.3. Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax*

A fim de avaliar a presença de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* na área estudada, empregou-se a técnica de ELISA indireto (iELISA), segundo protocolo estabelecido por Aquino et al. (1999), com modificações. O antígeno total de *T. vivax* utilizado foi produzido no Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV – Jaboticabal) segundo protocolo padronizado por González et al. (2005) em uma concentração ótima de 0,1 µg/mL, diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,5M e pH 9,6. Após incubação “overnight” a 4° C para sensibilização da placa com antígeno, realizou-se bloqueio com PBS Tween 20 (pH 7,2), adicionado 10% de soro normal de coelho. As placas (Maxisorp®; Nunc, Thermo Scientific, Brasil) foram incubadas por 4 horas à 37°C, em câmara úmida. Após três lavagens com tampão PBS-Tween 20, soros de referência positivos, negativos (Sampaio et al., 2015) e os soros-testes, diluídos na proporção 1:100 em solução de PBS-Tween 20 foram inseridos na placa de ELISA. As placas foram incubadas à 37°C por 60 minutos, seguido por uma lavagem com tampão PBS-Tween 20. Após isso, adicionou-se à placa de ELISA o conjugado anti-IgG de bovino (Sigma®, St. Louis, EUA), ligado à fosfatase alcalina na diluição de 1:30000 em PBS-Tween 20 com posterior incubação por 1h e lavagem. Por fim, adicionou-se o substrato da enzima fosfatase alcalina, p-nitrofenil fosfato (Sigma®, St. Louis, MO, EUA), diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8 (Sigma®, St. Louis, EUA). As placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada utilizando um filtro 405nm no leitor de ELISA (BioRad iMark™ Microplate Reader; Califórnia, EUA). O ponto de corte foi calculado como a absorbância média dos controles negativos vezes dois e meio (2,5) (Machado et al., 1997).

4.4. Extração de DNA das amostras de sangue de bovinos

DNA das amostras de sangue de bovinos foi extraído utilizando protocolo de extração de DNA previamente descrito por Kuramae-Izioka (1997). Para isso, foram adicionados 250 µL de cada amostra de sangue em microtubos DNase e RNase “free” (Kasvi®, Abraão Calixto, Curitiba, Brasil). Em seguida, foram acrescentados 1,6 µL de β-mercaptoetanol (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) e 800 µL de tampão de lise, previamente aquecido em banho-maria a 65°C por 15 minutos, constituído de 160 mM de Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl) (Synth®, Vila Mary, São Paulo, Brasil) pH 8,0, 60mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Synth®, Vila Mary, São Paulo, Brasil), 20 mM de cloreto de sódio (NaCl) (Synth®, Vila Mary, São Paulo, Brasil), dodecil sulfato de sódio (DSS) (Merck®, Darmstadt, Germany) a 0,5%, polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) a 1% e β-mercaptoetanol a 0,2% (Sigma®, St. Louis, MO, EUA), procedendo-se à incubação em banho-seco a 65°C por 40 minutos. Os microtubos foram homogeneizados por 15 segundos a cada 20 minutos. Em sequência, adicionaram-se 300 µL de acetato de potássio a 5M (Synth®, Vila Mary, São Paulo, Brasil). Após esse procedimento, as amostras foram colocadas no gelo por 20 minutos, e depois centrifugadas por 10 minutos, em rotação de 12000 g, a uma temperatura de 10°C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em novos microtubos. Após isso, 600 µL de clorofórmio (Merck®, Darmstadt, Germany); álcool isoamílico (Acros Organics®, New Jersey, USA) 24:1 foram acrescentados e as amostras foram novamente homogeneizadas por 20 segundos, seguido por uma centrifugação a 12000 g a 10°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, e novamente centrifugado por 10 minutos, a 10000 rpm e 10°C e em seguida foi recolhido em novo microtubo, sendo acrescentados 1000 µL de álcool absoluto (Merck®, Darmstadt, Germany) e armazenado a -20°C durante 12 horas. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, nas mesmas condições já mencionadas. Desta vez, o sobrenadante foi descartado e 800 µL de álcool 70% (Merck®, Darmstadt, Germany) foram adicionados. As amostras foram novamente centrifugadas, sob as condições já descritas. O sobrenadante foi então descartado e o “pellet” formado foi colocado para secar em estufa a 37°C. Por fim, para eluição do DNA, adicionaram-se 50µL de TE (Tris-HCl 10Mm, pH 8,2; EDTA 1Mm). As amostras de DNA foram então devidamente identificadas, e suas

relações 260/280 e 260/230 (qualidade da extração, pureza do DNA) e concentração foram mensuradas em aparelho espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Scientific), e armazenadas a -20°C para posteriores ensaios de PCR.

4.5. Controle endógeno da PCR

A fim de evitar falsos resultados negativos devido a presença de inibidores, as amostras de DNA foram submetidas a uma Reação em Cadeia da Polimerase do tipo convencional (cPCR) objetivando a amplificação do gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*), seguindo protocolo descrito por Birkenheuer et al. (2003). Na PCR utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores *gapdh*-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e *gapdh*-R (5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'). A reação de amplificação contou com um volume final total de 25µL, contendo 0,2 µM de cada desoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR 10x, água ultra-pura esterilizada q.s.p. (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), e 5 µL da amostra de DNA, com a concentração variando entre 2,80 e 612,50 ng/µL. As condições da PCR para amplificação do gene *gapdh* foram de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos (Birkenheuer et al., 2003).

4.6. Detecção e caracterização molecular de hemoplasmas

4.6.1. PCR convencional para hemoplasmas dirigida ao gene 16S rRNA

As amostras positivas na PCR para o gene endógeno foram posteriormente submetidas a ensaios de PCR convencionais para detecção de hemoplasmas. Para tal, uma PCR baseado no gene 16S rRNA, utilizando o protocolo estabelecido por Maggi et al. (2013) foi realizada. As reações contaram com um volume final total de 25 µL, contendo 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated DNA Technologies® – IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos), 1,5 mM de Cloreto de

Magnésio (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR 10X (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA), e água ultra-pura esterilizada q.s.p. (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos). O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados, bem como o tamanho do produto (pb) amplificado estão descritos na **Tabela 1**. As condições de temperatura foram de: 95°C por 2 minutos, seguidos por 55 ciclos de 94°C por 15 segundos, 68°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 1 minuto. Água ultra-pura esterilizada (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos) foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios de PCR. DNA de *M. wenyonii* e '*Candidatus* Mycoplasma haemobos', gentilmente cedidos pela Dra. Aline Giroto, foram utilizados como controles positivos em todas as reações de amplificação.

4.6.2. PCR convencional para hemoplasmas dirigida ao gene RNase P

Após a detecção para hemoplasmas baseada no gene 16S rRNA, as amostras positivas para o referido gene foram então submetidas a uma cPCR baseada no gene RNase P, utilizando protocolo também estabelecido por Maggi et al. (2013). A reação teve um volume final total de 25 µL, contendo 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated DNA Technologies® – IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA), tampão da PCR 10X (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA), e água ultra-pura esterilizada q.s.p. (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos). As sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados bem como o tamanho do produto (pb) estão descritos na **Tabela 1**. As condições de temperatura utilizadas foram de desnaturação inicial 95°C por 2 minutos, seguidos por 55 ciclos de 94°C por 15 segundos, 59°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 30 segundos.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanho dos amplicons formados nos ensaios de cPCR para hemoplasmas.

Agente etiológico	Gene Alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>Mycoplasma</i> spp.	16S rRNA	HemMyco16S-41s	5'- GYATGCMTAAYACATGC AAGTCGARCG-3'	800	Maggi et al. 2013
		HemMyco16S-938as	5'- CTCCACCACTTGTTTCAG GTCCCCGTC-3'		
	RNase P	HemoMyco RNaseP200s	5'- GATKGTGYGAGYATATAA AAAATAAAR CTCRAC-3'	170	Maggi et al. 2013
		HemoMyco RNaseP200as	5'- GMGGRGTTTACCGCGTT TCAC-3'		

4.7. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos dos ensaios de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) para visibilização dos resultados. A eletroforese foi realizada a 90 V/150mA durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta, acoplado a um programa computacional de análise de dados (ChemiDoc MP Imaging System, BIO RAD®).

4.8. Purificação dos produtos amplificados

Os produtos de PCR oriundos dos protocolos de Maggi et al. (2013) baseados nos genes 16S rRNA e RNase P obtidos foram purificados utilizando-se o kit “Sílica Bead DNA Gel Extraction” Kit (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante. O material amplificado purificado foi quantificado, e suas relações 260/230 e 260/280 também foram verificadas, a fim de analisar sua pureza, por meio da leitura da absorbância de cada amostra, pelo espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos).

4.9. Sequenciamento

O sequenciamento dos produtos amplificados nos ensaios de PCR para hemoplasmas foi realizado por meio de técnica automatizada baseada no método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977). Para isso, os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados nos ensaios de PCR escritos por Maggi et al. (2013) foram utilizados. O protocolo da reação de sequenciamento foi realizado com algumas modificações a partir daquele descrito pelo fabricante do Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). Para tal reação, utilizaram-se 3,5 µL de tampão 2,5x (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM MgCl₂), 0,5 µL de Big Dye, 5 pmoles de cada oligonucleotídeo, 2,5 µL de água ultra pura e 1,5 µL de DNA. As condições de temperatura utilizadas foram de 96°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 45 segundos, anelamento por 30 segundos (a temperatura de anelamento variou conforme a temperatura exigida no protocolo dos genes 16S rRNA e RNaseP) e extensão a 60°C por 4 minutos.

Posteriormente, as amostras passaram por um processo de lavagem para serem colocadas no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), onde o sequenciamento das amostras foi realizado. O sequenciamento dos amplicómeros foi conduzido no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Jaboticabal.

4.10. Análise das sequências e construção da árvore filogenética

A análise da qualidade dos eletroferogramas gerados nos sequenciamentos foi realizada por meio do software PhredPhrap (Ewing et al., 1998) considerando apenas as bases que apresentaram qualidade “Phred” acima de 20. As sequências obtidas salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências do mesmo gene retiradas do banco de dados “GenBank”(Benson et al., 2002), utilizando o software MAFFT (Kato et al., 2002). Os alinhamentos salvos em modo “FASTA” foram transformados em Nexus pelo site Alignment Transformation Environment, para realizar a análise Bayesiana utilizando o software MrBayes 3.2.2 no XSEDE (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) via portal CIPRES (Miller et al., 2010). A análise Bayesiana foi realizada com 10^8 gerações e números de classes de substituição variando conforme o modelo evolutivo encontrado para cada conjunto de dados. O modelo evolutivo foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (Darriba et al., 2012) baseado no Akaike Information Criterion (AIC). A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (Stover & Muller, 2010).

4.11. Análise de genótipos de *Mycoplasma* spp. baseada no gene 16S rRNA pelo software DnaSP

As sequências de *Mycoplasma* spp. obtidas foram analisadas no software DnaSP version 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009), a fim de designar o número de genótipos presentes.

4.12. Análise de distância pelo software SplitsTree

O software SplitsTree4 fornece uma estrutura para computação de redes filogenéticas por meio de conceitos matemáticos, para modelos mais complexos de evolução que eventualmente não são avaliados por outros métodos de inferência filogenética, como o método de parcimônia e o “Neighbor-Joining”, por exemplo. Nestas abordagens, a evolução de um gene é modelada através de eventos como especiação e mutações. O SplitsTree permite inferir, baseado em análise de distância, os eventos mais complexos que ocorreram ao longo da evolução, como

perda e duplicação de genes, transferência horizontal, entre outros (Huson & Bryant, 2006).

As sequências obtidas no presente estudo referentes ao gene 16S rRNA (flanqueado pelos oligonucleotídeos HemMyco16S-41s e HemMyco16S-938as) foram submetidas à análise pelo SplitsTree4 para avaliar as relações de distância utilizando os parâmetros “Neighbor-Net” e “Uncorrected p-distance”.

4.13. Rede de genótipos pelo software PopART

As sequências referentes ao gene 16S rRNA flanqueado pelos oligonucleotídeos HemMyco16S-41s e HemMyco16S-938as e aquelas de *M. wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ existentes no GenBank foram ainda submetidas à análise pelo PopART (“Population Analysis with Reticulate Trees”) (Leigh & Bryant, 2015). O software oferece um pacote para análise da genética de populações utilizando redes de genótipos, por meio de ferramentas como o “Median-Joining” que combina o algoritmo de Kruskal e o método heurístico de máxima parcimônia, permitindo a visualização de relações genéticas entre sequências. As sequências foram agrupadas de acordo com sua localidade no software DnaSP version 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009) e salvas em formato NEXUS. Após isso, o arquivo NEXUS foi aberto no PopART, pelo método de inferência de redes de genótipos “Median-Joining” descrito por (Bandelt et al., 1999).

5. RESULTADOS

5.1. Soropositividade para *Trypanosoma vivax* pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

O teste sorológico ELISA revelou a presença de anticorpos IgG anti-*T. vivax* em 98,5% (197/200) e 81% (162/200) das vacas e bezerros, respectivamente. Tais resultados demonstram que a região estudada apresenta alto endemismo para o agente etiológico em questão.

5.2. Qualidade das amostras de DNA extraídas a partir de amostras de sangue de bovinos e PCR convencional para o gene *gapdh*

A concentração média, e as relações de absorvância (260/280 nm) e (260/230 nm) das amostras de DNA foram de 31,8 ng/μL (DP ± 10,2), 1,4 nm e 0,47 nm (DP ± 0,1 e ± 0,5), respectivamente. Dentre as 400 amostras de DNA analisadas, todas (100%) mostraram-se positivas na cPCR para o gene *gapdh* (controle endógeno). Na **Figura 3** pode-se observar a eletroforese em gel agarose de produtos amplificados na cPCR baseada no gene *gapdh* (fragmento de aproximadamente 450pb).

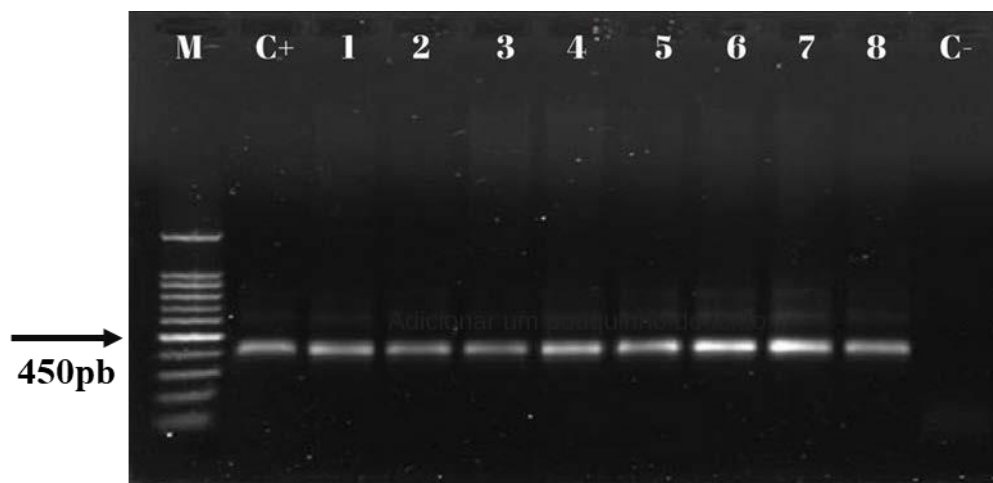


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo referente à amplificação do gene endógeno *gapdh*. M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); 1-8 amostras de DNA de bovinos positivas; C+: Controle positivo (DNA extraído de bovino); C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).

5.3. Detecção de *Mycoplasma* spp. por meio de ensaios de cPCR baseados no gene 16S rRNA

Dentre as 400 amostras de sangue de bovinos testadas, 2,25% (9/400) mostraram-se positivas na cPCR para hemoplasmas baseadas no gene 16S rRNA (utilizando os primers HemMycop16S-41s e HemMyco16S- 938as) (**Figura 4**). As amostras positivas obtidas nesse ensaio foram provenientes de bezerros. Nenhuma amostra de sangue de vaca mostrou-se positiva para *Mycoplasma* spp. nos ensaios de PCR em questão.

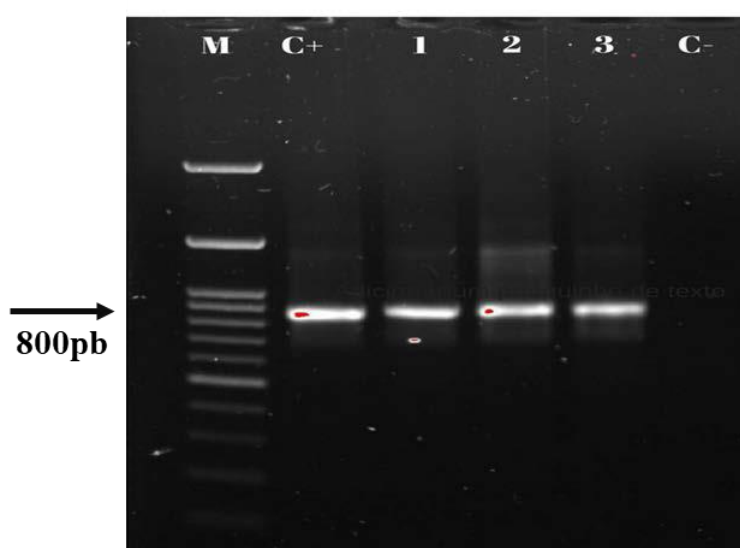


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo referente à amplificação do gene 16S rRNA de hemoplasmas (fragmento de aproximadamente 800pb). M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); 1-3 amostras positivas (DNA extraído de bovinos); C+: Controle positivo - DNA de *Mycoplasma wenyonii*; C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada).

5.4. Detecção de *Mycoplasma* spp. por meio da cPCR baseada no gene RNase P

As amostras positivas na cPCR para *Mycoplasma* spp. baseadas no gene 16S rRNA foram posteriormente submetidas à uma nova PCR, desta vez dirigida ao gene RNase P. Das 9 amostras testadas, 66,67% (6/9) mostraram-se positivas na referida reação (**Figura 5**).

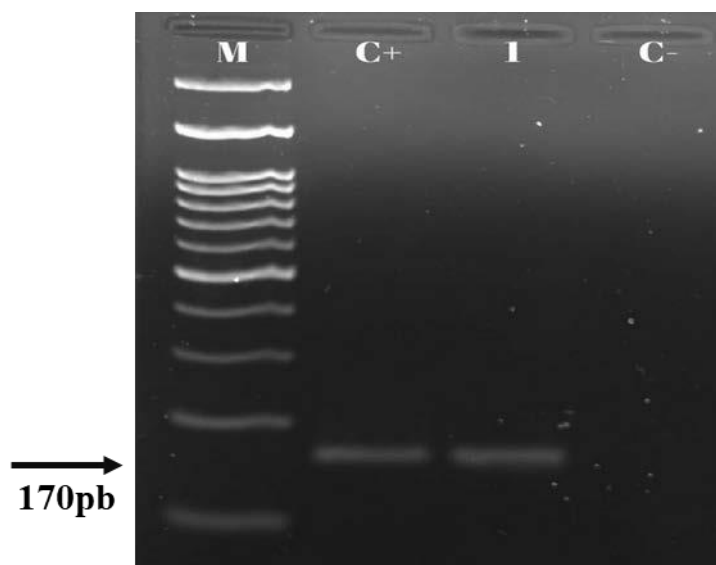


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo referente à amplificação do gene RNase P. M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); 1: amostra (DNA extraído de bovino) positiva; C+: Controle positivo - DNA de *Mycoplasma wenyonii*; C-: Controle negativo (água ultra-pura esterilizada).

5.5. Análise da identidade das sequências obtidas pelo BLASTn

5.5.1. Análise das sequências de *Mycoplasma* spp. para o gene 16S rRNA

Dentre as nove amostras positivas sequenciadas, foi possível obter nove sequências com qualidade referentes ao gene 16S rRNA, por meio da análise de qualidade obtida pelo programa PhredPhrap. A análise das sequências obtidas quando submetidas ao BLASTn revelou porcentagens de identidade variando entre 99 a 100% com sequências de '*Candidatus* *Mycoplasma*

haemobos' e *Mycoplasma wenyonii* previamente depositadas no GenBank (Tabela 2). A cobertura das sequências analisadas ("Query coverage") e o E-value foram de 100% e 0, respectivamente. Devido à fraca intensidade da banda formada, não foi possível obter um sequenciamento de qualidade referente ao gene *RNAse P*, impossibilitando a realização de inferências filogenéticas baseadas neste gene.

Tabela 2. Porcentagem de identidade (BLASTn) das sequências 16S rRNA de hemoplasmas obtidas de amostras de sangue de bovinos de corte no Pantanal Sul - matogrossense com sequências previamente depositadas no GenBank.

Sequência/ Bezerro	Espécie de <i>Mycoplasma</i> spp.	Identidade (%)	País	Número de acesso (GenBank)
S1/B165	' <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma</i> <i>haemobos</i> '	100	Suíça	EF616468
S2/B184	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	99	China	AY769937
S3/B186	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	99	México	KX171205
S4/B187	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	100	México	KX171205
S5/B120	' <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemobos</i> '	100	Suíça	EF616468
S6/B145	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	99	China	EF221880
S7/B146	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	99	China	EF221880
S8/B152	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	99	China	EF221880
S9/B155	<i>Mycoplasma wenyonii</i>	99	China	EF221880

5.5.2. Análise filogenética pelo método de Inferência Bayesiana

O cladograma gerado pelo método de Inferência Bayesiana (BI) e modelo evolutivo GTR+G formou 12 clados, suportados por valores de probabilidade posterior que variaram de 51 a 100%. As sequências obtidas posicionaram-se em três clados (#1, #6 e #7), dois deles dentro do grupo *Mycoplasma suis*, e o

terceiro no grupo *Mycoplasma haemofelis* (**Figura 6**).

As sequências S1 e S5, referente às amostras B165 e B120, respectivamente, posicionaram-se no primeiro clado, formando politomias, juntamente com sequências de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' provenientes de bovinos oriundas da Suíça (EF616468), Taiwan (KJ883514; KJ883515) e China (EF460765). Dentre as politomias geradas no clado #1, houve também a formação de um ramo englobando as sequências de 'CMh' e *Mycoplasma* sp., provenientes de búfalos de Moçambique (MF992084) e da China (EF424082), respectivamente. Ainda, houve a formação de um ramo contendo as sequências de 'CMh' provenientes de bovinos do Japão (EU367965) e de búfalos do Brasil (KY328834), posicionada filogeneticamente próxima a uma sequência de *Mycoplasma* sp. proveniente de cavalos da Suíça (FN421445). As sequências obtidas a partir das amostras B145, B146, B152, B155 e B184, por sua vez, agruparam-se no clado #6, onde mostraram-se filogeneticamente próximas a duas sequências de *M. wenyonii* detectadas em bovinos na Alemanha (FN392885; FN392886), na China (AY769937) e no Japão (EU367934), suportadas por uma sequência ancestral de *Mw* detectada em bovinos na China (EF221880).

As sequências referentes às amostras B186 e B187 posicionaram-se num ramo politômico dentro do clado #7, juntamente com a sequência de *M. wenyonii* detectada em bovinos no México (KX171205). Dentre as politomias geradas, houve a formação de um ramo englobando as sequências de *Mw* detectadas em bovinos no Japão (EU367963) e na Áustria (KY412804), e em búfalos de Moçambique (MF981947).

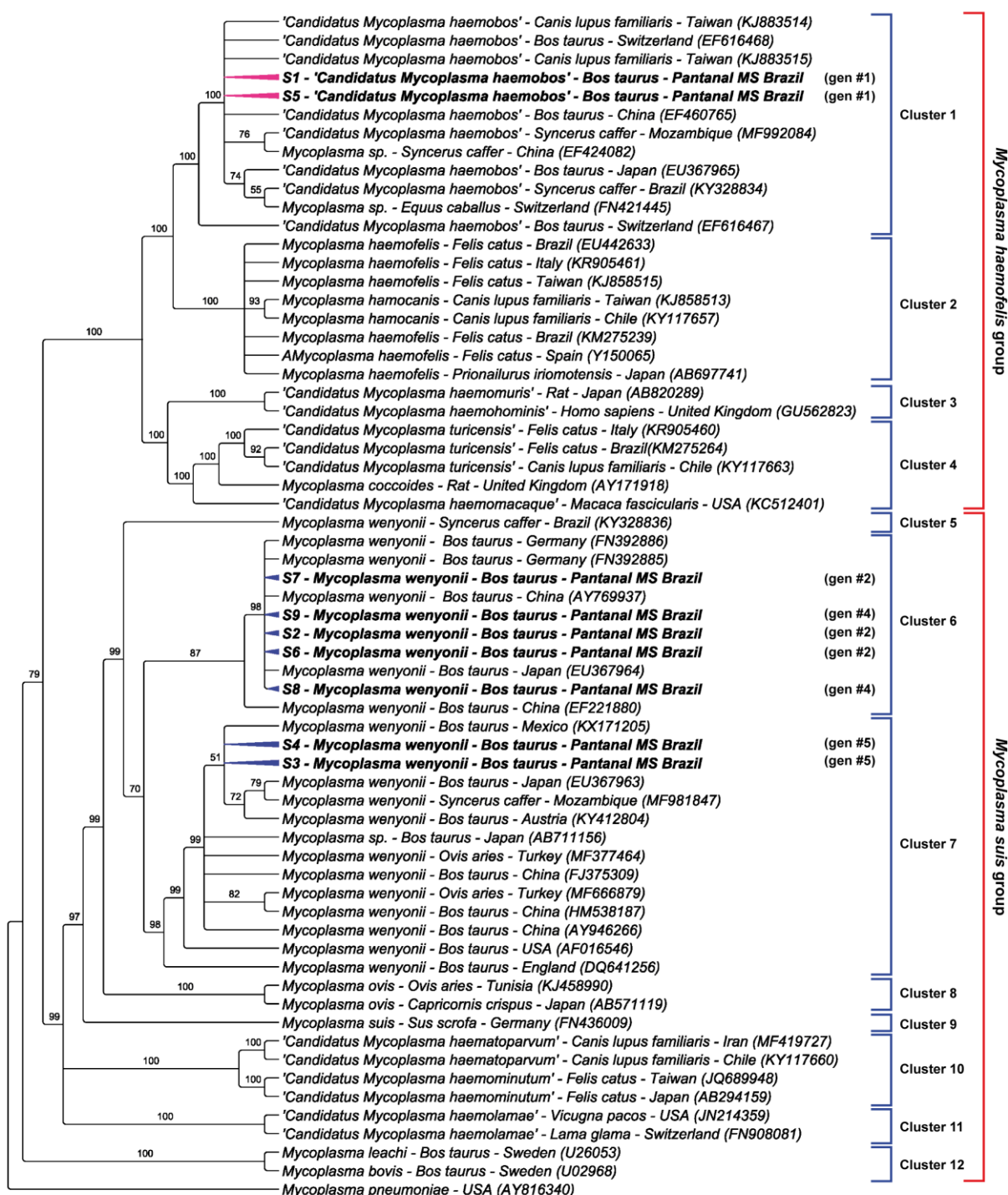


Figura 6. Relação filogenética dentro do gênero *Mycoplasma* baseada em um fragmento de aproximadamente 800 pb referente ao gene 16S rRNA. A árvore filogenética foi inferida usando o método Bayesiano e o modelo evolutivo GTR + G. Entre parênteses estão evidenciados os genótipos de cada sequência obtidos pelo software PopArt. Os números em cada ramo são correspondentes aos valores de probabilidade posterior, maiores que 51% acessados com número de gerações igual a 1.000.000. *Mycoplasma pneumoniae* foi usado como grupo externo.

5.6. Análise de genótipos de *Mycoplasma* spp. baseada no gene 16S rRNA pelo software DnaSP

Dentre as nove sequências analisadas, foram identificados 6 genótipos, apresentando $\pi = 0,0889$, $Dh = 0,917$ e $K = 51,55556$. (Tabela 4). O genótipo #1 englobou as S1 e S5, referentes à 'CMh', enquanto os demais genótipos (#2, #3, #4, #5 e #6) englobaram as sequências de Mw.

Tabela 4. Polimorfismos de sequências 16S rRNA de *Mycoplasma* sp. detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal sul-matogrossense.

	~ (pb)	N	S	GC%	h	Dh (média $\pm$	π (média $\pm$ DP)	K
Gene 16S rRNA	800	9	131	0,452	6	$0,917 \pm 0,073$	$0,08889 \pm 0,032$	51,55556

N - número de sequências analisadas; S - número de sítios variáveis; GC - conteúdo G + C; h - número de genótipos; Dh - diversidade de genótipos; DP - desvio padrão; π - diversidade de nucleotídeos (por local); K - número de diferença de nucleotídeos

5.7. Análise de distância pelo SplitsTree

As sequências de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*', S1 e S5, referente às amostras B165 e B120, respectivamente, posicionaram-se próximas uma da outra. A sequência S5 posicionou-se no mesmo ponto que as sequências do referido agente detectadas em bovinos no Japão (EU367965), e em cães de Taiwan (KJ883514). Por sua vez, a sequência S1 posicionou-se no mesmo ponto que a sequência de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' previamente detectada em cães de Taiwan (KJ883515), e ambas ficaram estritamente próximas à sequência detectada em búfalos de Moçambique (MF992084). Adicionalmente, a sequência S5 demonstrou uma certa proximidade com a sequência obtida de búfalos no Maranhão, nordeste do Brasil (KY328834) (Figura 7).

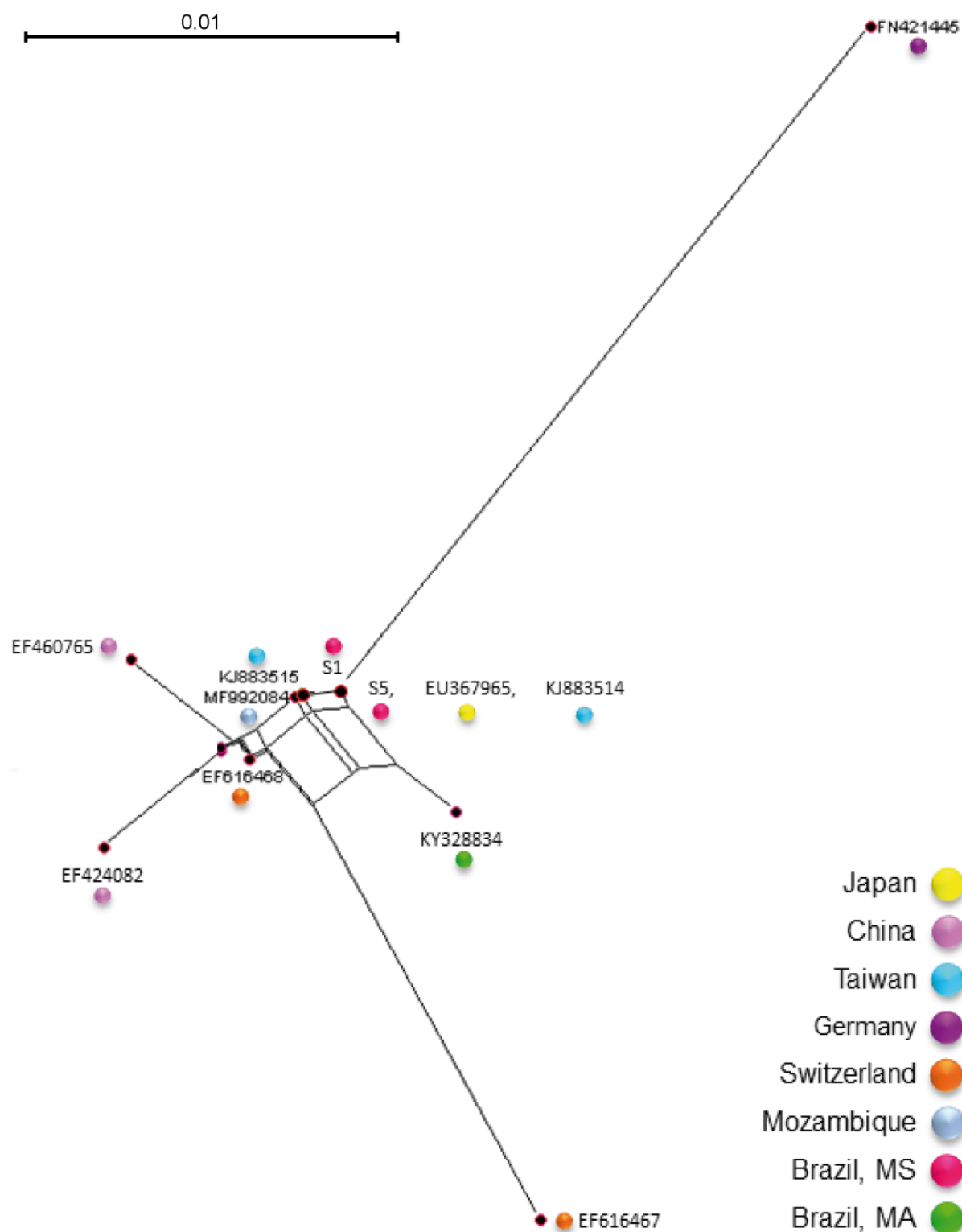


Figura 7. Análise de distância pelo software SplitsTree4 com os parâmetros “Neighbor-Net” e “Uncorrected p-distance” para o gene 16S rRNA de sequências de ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’, mostrando proximidade e correlação com sequências previamente detectadas no Japão, Taiwan e Moçambique.

A análise de distância para as sequências de *Mycoplasma wenyonii* posicionou as sequências obtidas no presente estudo em dois clados. No primeiro clado, as sequências S3 e S4, referentes às amostras B186 e B187, respectivamente, agruparam-se com sequências previamente detectadas em bovinos no Japão (HM538187; AB711156), em ovelhas na Turquia (MF666879; MF377464) e em bovinos na China (AY946266; FJ375309) e no México (KX171205). Por sua vez, as sequências S2, S6, S7, S8 e S9, correspondentes às amostras B184, B145, B146, B152 e B155, respectivamente, agruparam-se no segundo clado, onde mostraram maior proximidade com sequências detectadas em bovinos na China (AY769937), Japão (EU367964) e Alemanha (FN392886) (**Figura 8**). Não houve proximidade significativa de nenhuma sequência do estado do Mato Grosso do Sul, com a sequência de *Mycoplasma wenyonii* previamente detectada em búfalos no estado do Maranhão, Nordeste do Brasil (KY328836).

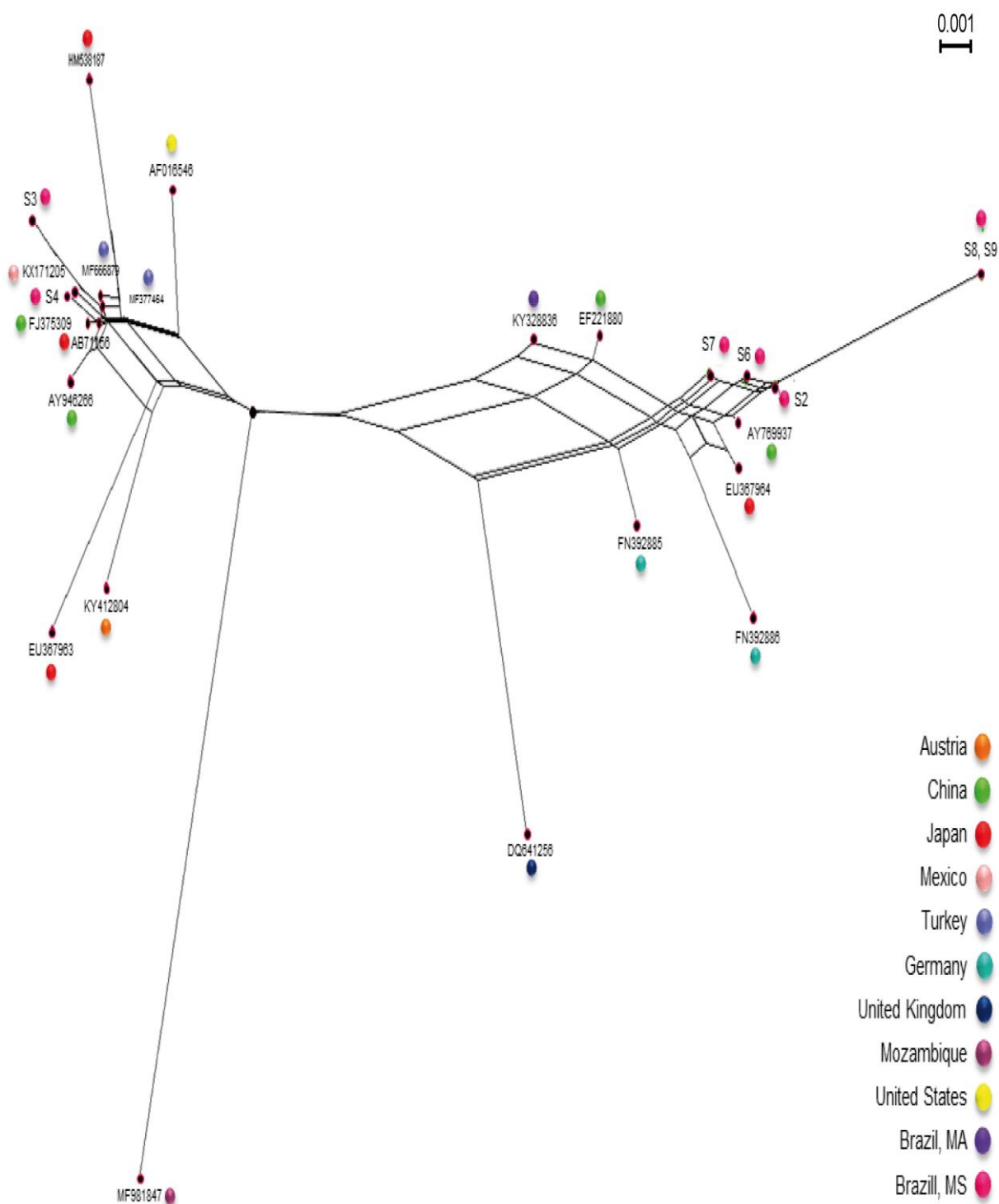


Figura 8. Análise de distância pelo software SplitsTree4 com os parâmetros “Neighbor-Net” e “Uncorrected p-distance” para o gene 16S rRNA de sequências de *Mycoplasma wenyonii*.

5.8. Análise filogeográfica pelo software PopART

As sequências referentes ao gene 16S rRNA foram ainda submetidas ao software PopART “Population Analysis with Reticulate Trees” para inferências filogeográficas com aquelas previamente depositadas no GenBank. A rede de genótipos das sequências de *M. wenyonii* revelou a presença de sete genótipos. O genótipo #5 englobou o maior número de sequências, as quais eram oriundas da China, Áustria, Alemanha, Turquia, Moçambique, México, Estados Unidos, Japão, e do Brasil, pertencentes aos estados do Maranhão, e do Pantanal-MS (S3 e S4) obtidas no presente estudo. Infere-se que, o genótipo #5 seja precursor dos demais genótipos, visto que a partir dele ocorreram eventos mutacionais (simbolizados por riscos na linha) que geraram os genótipos #2 e #6. O genótipo #3, pertencente ao Japão, pode ter sido oriundo do genótipo #2 ou #6. O genótipo #2, por sua vez, englobou sequências do Pantanal-MS (S2, S6 e S7), da Alemanha e Inglaterra. Infere-se que o genótipo #4, que engloba sequências exclusivamente do Pantanal-MS (S8 e S9), tenha surgido a partir do genótipo #2, visto que entre eles ocorreu um número maior de eventos mutacionais. Os genótipos #1 e #7, assim como o #4, podem ter derivado do genótipo #2 (**Figura 9**). Os genótipos apresentados e seus respectivos locais estão representados na **Figura 10**.

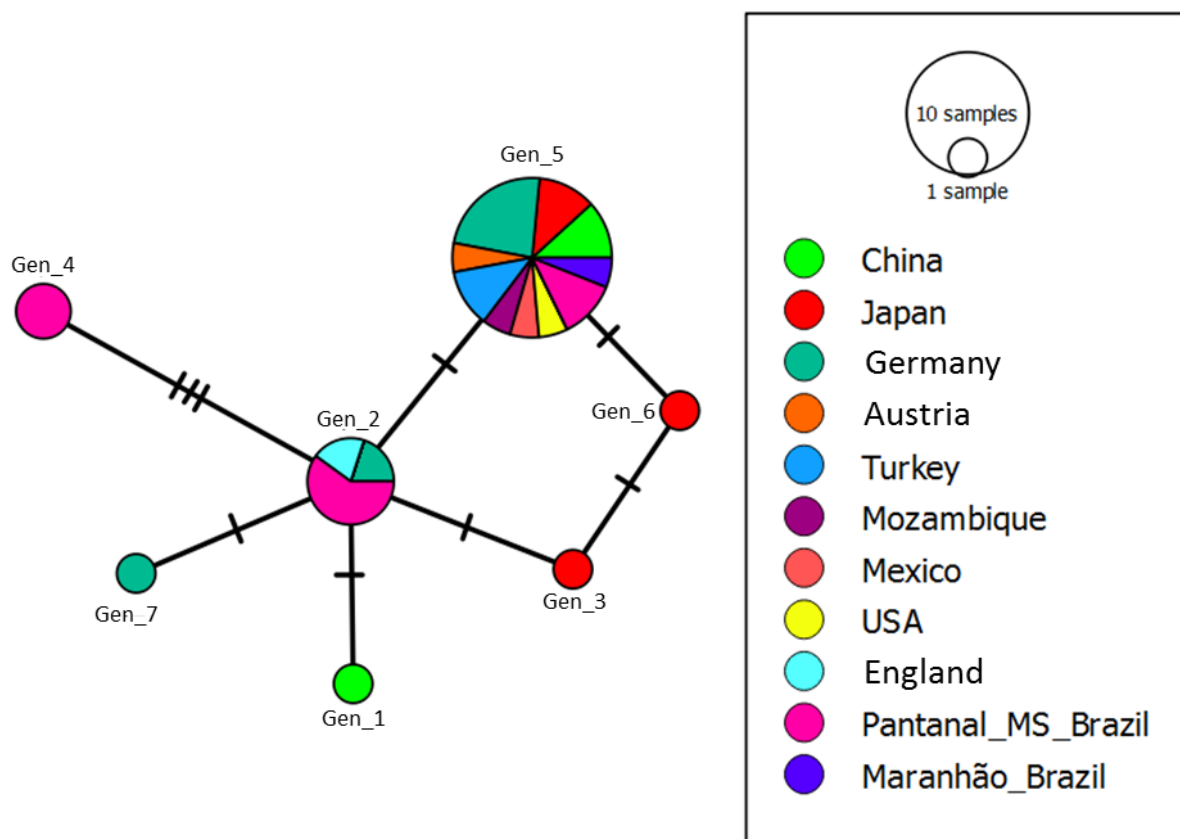


Figura 9. Rede de genótipos formada entre as sequências de *Mycoplasma wenyonii*



Figura 10. Filogeografia dos genótipos de *Mycoplasma wenyonii* obtidos na análise pelo software PopART.

Por sua vez, a análise de distância das sequências de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' revelou a presença de dois genótipos. O genótipo #1 englobou o maior número de sequências, as quais foram oriundas da Suíça, Japão, China, Moçambique, Taiwan, e do Brasil, dos estados do Maranhão, Paraná e do Pantanal (S1 e S5) obtidas no presente estudo. Infere-se que o genótipo #2 pertencente à Suíça tenha surgido a partir do #1 (**Figura 11**). Os genótipos apresentados e seus respectivos locais estão expostos na **Figura 12**.

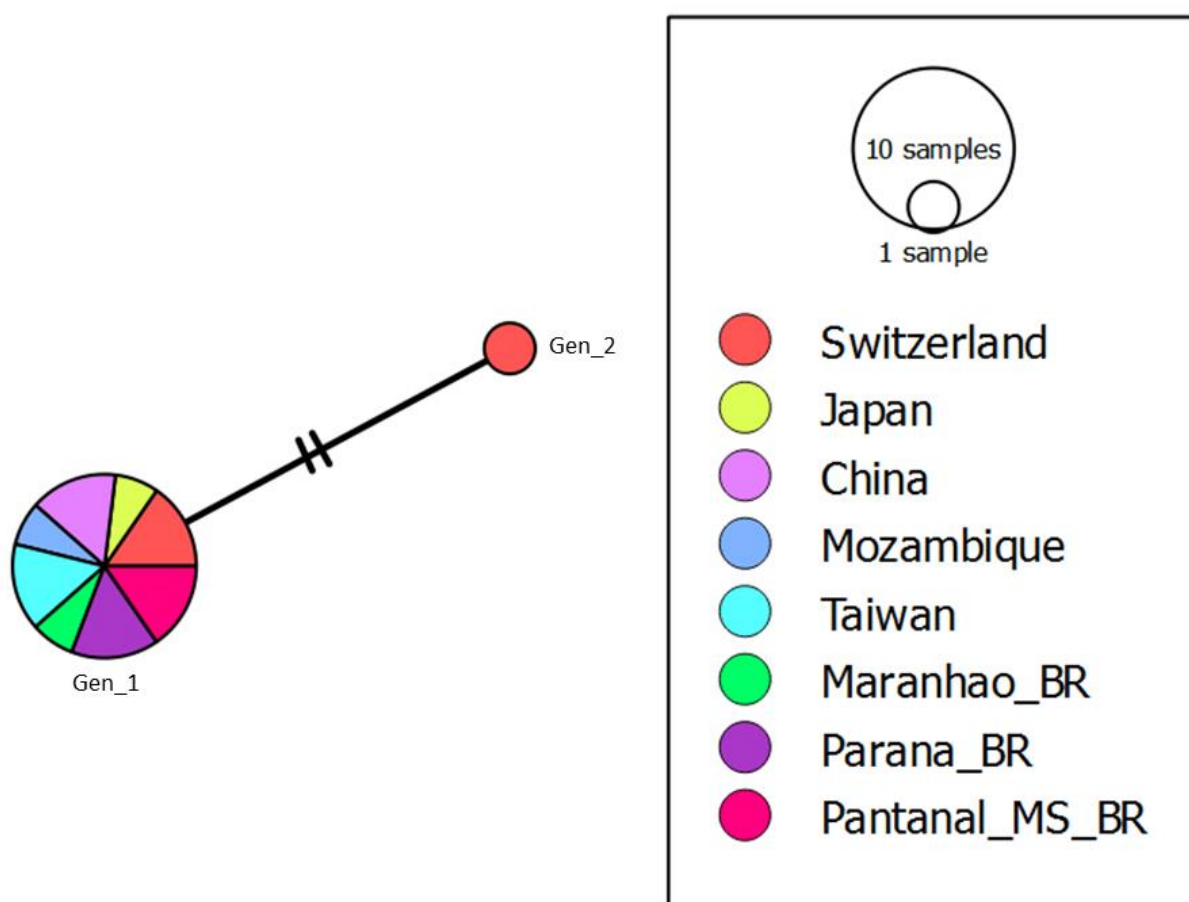


Figura 13. Rede de genótipos formada entre as sequências de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*'.



Figura 14. Filogeografia dos genótipos de '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' obtidos na análise pelo software PopART.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou, pela primeira vez, a ocorrência e a caracterização molecular de *M. wenyonii* e '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' em uma população de bovinos de corte no Brasil. Embora diversos estudos sugeriram que *Mycoplasma* spp. tem coevoluído com diversas espécies de animais, incluindo os seres humanos (Maggi et al., 2013), pouco se sabe a respeito da origem, evolução, transmissão e dispersão dos hemoplasmas. De fato, a epidemiologia dos micoplasmas hemotrópicos que parasitam animais domésticos, selvagens e seres humanos no Brasil ainda é pouco conhecida.

A sorologia confirmou a endemicidade para *T. vivax* na região amostrada, fato este outrora observado por outros pesquisadores (Paiva et al., 2000; Madruga et al., 2006). Imunossupressão vem sendo associada a infecções por *T. vivax*, predispondo o hospedeiro à coinfeções e até mesmo falhas vacinais contra outros patógenos (Yaro et al., 2016; Giordani et al., 2016). Das 9 amostras de bezerros positivas na PCR para hemoplasmas, 88,89% (8/9) mostraram-se soropositivas para *T. vivax*. Relato de coinfeção entre hemoplasmas e *T. vivax* já foi descrito na literatura (Bretaña et al., 2002). A patogenia da tripanossomíase é variável e os sinais clínicos são inespecíficos, representados por febre, anemia, fraqueza, abortamento, entre outros, semelhantemente aqueles encontrados na hemoplasmosse. Embora a hemoplasmosse dificilmente leve os animais a óbito, tais agentes podem intensificar a virulência de coinfeções (Hornok et al., 2012).

A ocorrência de hemoplasmas detectada neste estudo em bovinos de corte (2,25% [9/400]; 77,7% [7/9] para *M. wenyonii* e 22,22% [2/9] para '*Candidatus Mycoplasma haemobos*') foi menor que aquelas encontradas em bovinos de leite nos estados brasileiros de Rondônia (64,7% [207/320]) (Witter et al., 2017); Paraná (61% [264/433]) (Giroto et al., 2012) e Santa Catarina (40,9% [9/22]) (Giroto-Soares et al., 2016). A porcentagem de animais positivos no presente estudo foi inferior àquelas reportadas para bovinos de leite nos demais países estudados, como Japão (Tagawa et al., 2013), Suíça (Meli et al., 2010), China (Su et al., 2010), Inglaterra (McAuliffe et al., 2006).

Tendo em vista que os mecanismos de transmissão dos hemoplasmas ainda não foram completamente elucidados, haja vista que nenhum vetor biológico foi

identificado até o momento, tais vetores artrópodes possivelmente possuem papel apenas na transmissão mecânica destes agentes (Neimark et al., 2001; Messick, 2004). Ademais, a impossibilidade de cultivo *in vitro* dos hemoplasmas dificulta a realização de estudos de competência vetorial (de la Fuente et al., 2017; Beerntsen et al., 2000).

Recentemente, carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) foram incriminados como vetores mecânicos de hemoplasmas (Shi et al., 2018). Desta forma, a baixa ocorrência de hemoplasmas nos bovinos de corte amostrados no presente estudo pode ser reflexo da resistência à ectoparasitas que bovinos zebuínos (*Bos indicus*) apresentam em relação aos taurinos (*Bos taurus*). Diversos estudos têm demonstrado que bovinos da raça Nelore apresentam alta resistência genética contra alguns patógenos e ectoparasitas, principalmente a carrapatos (Oliveira et al., 2013). Tal resistência pode estar associada a alguns fatores como o comportamento auto-limpante do bovino, às características do pêlo (Ibelli et al., 2012), aos genes que expressam lipocalinas e queratina (Kongsuwan et al., 2010), entre outros. De fato, a maior parte dos estudos realizados ao redor do mundo avaliaram a ocorrência de hemoplasmas em bovinos de leite (taurinos) (Inglaterra - McAuliffe et al., 2006; Japão - Tagawa et al., 2008; China Su et al., 2010; Suíça - Meli et al., 2010, entre outros).

Para a detecção de 'CMh' e *Mw* utilizaram-se ensaios de PCR baseados no gene 16S rRNA, responsável por codificar a subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rRNA). Presente em todas as bactérias, a função deste gene permaneceu a mesma ao longo da evolução, tratando-se de um gene conservado que apresenta tamanho grande o suficiente (~1500 pb e com aproximadamente 50 domínios funcionais) que possibilite análises de tipagem molecular (Patel, 2001). Tal gene se apresenta em múltiplas cópias no genoma bacteriano, diferentemente de outros genes que apresentam somente uma cópia. A presença de várias cópias pode estar associada aos elevados níveis de transcrição do gene, necessários para suprir a demanda de moléculas de RNA para montagem de ribossomos (Zaha, Ferreira & Passaglia, 2014). Mesmo com a multiplicidade de cópias que o gene apresenta, a detecção de hemoplasmas pela cPCR mostrou-se baixa no presente estudo.

As sequências de 'CMh' e *Mw* posicionaram-se em dois subgrupos distintos na análise Bayesiana: enquanto as sequências de 'CMh' foram alocadas no grupo de *M. haemofelis*, aquelas de *Mw* foram posicionadas no grupo *M. suis*. A topologia de análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene 16S rRNA comumente dividem os hemoplasmas nesses dois subgrupos (Maggi et al., 2013). O mesmo padrão filogenético pôde ser observado em estudos realizados com hemoplasmas em bovinos de leite no Brasil (Witter et al., 2017), búfalos selvagens (*Syncerus caffer*) em Moçambique, na África (Gonçalves et al., 2018), pequenos ruminantes na Turquia (Aktas & Ozubek, 2017), bovinos na Alemanha, Suíça e Japão (Hoelzle et al., 2010; Meli et al., 2010; Tagawa et al., 2008) e em renas (*Rangifer tarandus*) nos Estados Unidos (Stoffregen et al., 2006).

Análises de distância baseadas no gene 16S rRNA foram realizadas para as sequências referentes ao gene sob estudo. Tais análises possibilitam visibilizar relações entre as sequências que não são vistas por outros métodos de inferência filogenética, observando eventos complexos que ocorreram ao longo da evolução, como duplicação e perda de genes, transferência horizontal, entre outros (Huson & Bryant, 2006). Desta forma, as análises pelo software SplitsTree agruparam as sequências de *Mw* (S3 e S4) em um clado com proximidade a sequências do México (KX171205), China (FJ375309; AY946266), Japão (HM538187; AB711156) e Turquia (MF666879; MF377484), enquanto as demais (S2, S6, S7, S8 e S9) agruparam-se em outro grupo, proximamente relacionadas com sequências da China (AY769937), Japão (EU357964) e Alemanha (FN392885). O posicionamento das sequências S3 e S4, e da sequência do México (KX171205), na análise de distância corroborou com a análise realizada pelo método BI, assim como a análise das demais sequências (S2 e S6-S9), que posicionaram-se próximas às sequências da China (AY769937), Japão (EU367964) e Alemanha (FN392886).

Na análise de distância das sequências de 'CMh' (S1 e S5) foi possível observar maior proximidade com sequências de Taiwan (KJ883515; KJ883514), do Japão (EU367965) e de Moçambique (MF992084), assim como observado pela análise BI, na qual posicionaram-se no mesmo clado. A sequência proveniente da Suíça (EF616468), com a qual também compartilharam um ancestral comum nas análises filogenéticas, mostrou-se um pouco mais distante das sequências S1 e S5

de 'CMh' oriundas do Pantanal brasileiro pela análise de distância, demonstrando que entre elas houve um maior número de eventos mutacionais ao longo da evolução, resultando nesse pequeno distanciamento.

Os resultados do PopART, por sua vez, exploram dados genéticos populacionais por meio de rede de genótipos, permitindo visualizar a biogeografia, as relações genealógicas e a história das populações (Leigh & Bryant, 2015). A rede de genótipos formada com as sequências de 'CMh' (S1 e S5) obtidas no presente estudo e retiradas do GenBank revelou a presença de dois genótipos. O genótipo #1, o qual compreendeu maior número de sequências, englobou aquelas provenientes do Pantanal brasileiro (S1 e S5), Suíça e de Taiwan, as quais mostraram-se próximas nas análises BI e de distância, indicando que as mesmas representam o mesmo genótipo.

Por outro lado, a rede de genótipos de *Mw* revelou a presença de 7 genótipos. As sequências oriundas do Pantanal brasileiro posicionaram-se em três deles (Gen #2, Gen #4 e Gen #5). Já pela análise de distância, as sequências S8 e S9 posicionaram-se isoladas, mais distante das demais. Tal posicionamento corrobora com as análises do PopART, por meio das quais tais sequências corresponderam ao genótipo #4, o qual foi composto apenas por estas duas sequências. Tais achados indicam que ambas pertencem ao mesmo genótipo e divergem dos demais, embora tenham compartilhado o mesmo ancestral das sequências S2, S6 e S7, que foram classificadas como genótipo #2, o qual também englobou sequências provenientes da Alemanha e da Inglaterra. Apesar de compartilharem o mesmo genótipo, as sequências S2, S6 e S7 posicionaram-se distantes da sequência detectada na Inglaterra pelas análises de distância e BI, por meio das quais mostraram maior proximidade filogenética (BI) com aquelas provenientes da China, Japão e Alemanha.

As sequências S3 e S4 de *Mw* compreenderam o genótipo #5, juntamente com sequências provenientes da China, Japão, Alemanha, Austria, Turquia, Moçambique, Estados Unidos, México e Brasil. A sequência do México compartilhou o mesmo ancestral comum que as sequências S3 e S4 nas análises filogenéticas, sendo que as mesmas posicionaram-se próximas na análise de distância, corroborando entre si. Outrossim, é importante ressaltar que enquanto sequências

de 'CMh', *Mw* e de outras espécies de *Mycoplasma* spp. foram utilizadas na análise bayesiana, apenas sequências de 'CMh', *Mw* e *Mycoplasma* sp. foram utilizadas nas análises de distância e rede genotípica. Apesar da divergência entre algumas sequências, as análises realizadas corroboraram entre si.

Por fim, verificou-se uma baixa ocorrência de hemoplasmas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro, mesmo com o endemismo de *T. vivax*, o qual pode causar imunossupressão nos animais infectados..

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 infección 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) Hemotrophic 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.