

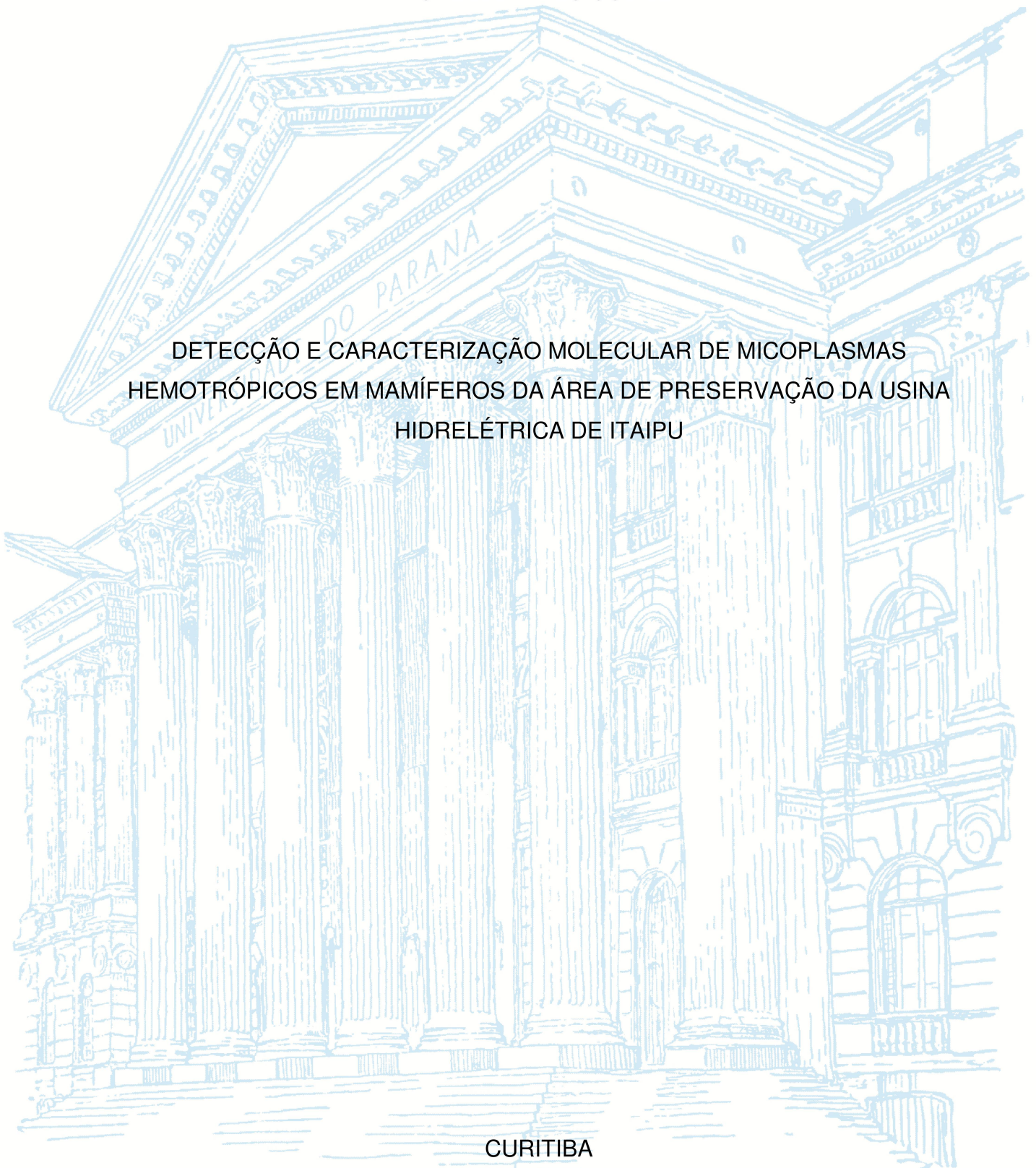
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE PIRES CUBILLA

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICOPLASMAS
HEMOTRÓPICOS EM MAMÍFEROS DA ÁREA DE PRESERVAÇÃO DA USINA
HIDRELÉTRICA DE ITAIPU

CURITIBA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE PIRES CUBILLA

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HEMOTROPIC
MYCOPLASMAS IN MAMMALS OF THE PRESERVATION AREA OF ITAIPU
HYDROELECTRIC POWER PLANT

CURITIBA

2016

MICHELLE PIRES CUBILLA

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICOPLASMAS
HEMOTRÓPICOS EM MAMÍFEROS DA ÁREA DE PRESERVAÇÃO DA USINA
HIDRELÉTRICA DE ITAIPU

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2016

MICHELLE PIRES CUBILLA

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HEMOTROPIC
MYCOPLASMAS IN MAMMALS OF THE PRESERVATION AREA OF ITAIPU
HYDROELECTRIC POWER PLANT

Thesis submitted to the Cell and Molecular Biology
Post-graduate Program, Biological Science Sector,
Universidade Federal do Paraná, in partial
satisfaction of the requirements for the degree of
Doctor in Cell and Molecular Biology.

Advisor: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940)

Cubilla, Michelle Pires

Detecção e caracterização molecular de micoplasmas hemotrópicos em mamíferos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu. / Michelle Pires Cubilla. – Curitiba, 2016.

59 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Alexander Welker Biondo.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Micoplasma. 2. Animais silvestres. 3. Mamíferos. I. Título. II. Biondo, Alexander Welker. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 619.9

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular


Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná



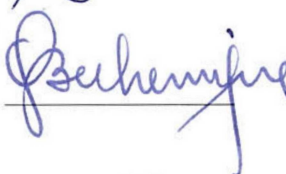
PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Alexander Welker Biondo
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Aprovado 


Prof. Dr. Gervasio Henrique Bechara
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -
PUCPR

Aprovado 

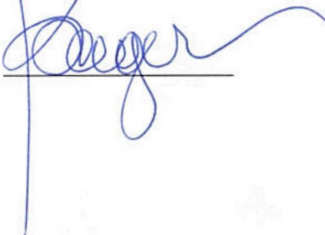
Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADO 

Prof. Dr. Walfrido Kuhl Svoboda
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana - UNILA

APROVADO 

Prof. Dr. Walter Antonio Pereira Boeger
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADO 

Suplentes:

Prof. Dr. Rafael Antunes Baggio
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Após arguir a candidata **Michelle Pires Cubilla** em relação ao seu trabalho intitulado: "Detecção e caracterização molecular de micoplasmas hemotrópicos em mamíferos da área de preservação da usina hidrelétrica de Itaipu", são de parecer favorável à Aprovação da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 07 de Dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, disposição e perseverança para realizar este trabalho.

Ao meu marido Diego Perez, pelo apoio em todos os momentos, me encorajando e incentivando nas adversidades e comemorando minhas alegrias.

A minha família, por todo suporte e carinho, mesmo à distância, em especial minha mãe.

Ao médico veterinário Dr. Wanderlei de Moraes, do Refúgio Biológico Bela Vista de Itaipu, por suas contribuições no projeto, inclusive durante as análises laboratoriais.

Ao médico veterinário Dr. Zalmir Silvino Cubas, do Refúgio Biológico Bela Vista de Itaipu, por suas contribuições e incentivo durante o projeto.

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, pela orientação.

Aos queridos mestres Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade e Prof^a Dr^a. Célia Regina C. Franco, por participarem ativamente de minha formação na pós-graduação e sempre estarem de portas abertas na Biocel.

A Marlene Bonifácio de Camargo, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por sua positividade e auxílio em momentos cruciais.

A Dr^a. Jane E. Sykes, da Universidade da Califórnia, pela orientação durante intercâmbio na UC Davis e suas importantes contribuições.

A Dr^a. Janet Foley, da Univeridade da Califórnia, pela oportunidade de participar dos projetos no Laboratório de Ecologia de Doenças Infecciosas.

Ao Prof. Dr. Maurilio José Soares, do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz pelo incentivo, disponibilidade e por encorajar nosso espirito criativo e investigativo.

Ao Dr. Christian M. Leutenegger e à IDEXX Laboratories - Sacramento, pelo apoio à realização do projeto.

Aos professores que participaram da banca, Dr. Gervasio Henrique Bechara (PUC-PR), Dr. Walfrido Kuhl Svoboda (UNILA), Dr. Walter Antonio Pereira Boeger (UFPR), Dr^a. Eliane Carneiro Gomes (UFPR) e Dr. Rafael Antunes Baggio (UFPR), pela disponibilidade e significativas contribuições.

A Itaipu Binacional, pelo apoio à realização do doutorado, e aos colegas que direta ou indiretamente colaboraram nessa etapa.

A Universidade Corporativa do Sistema Eletrobras - UNISE, pelo apoio aos

profissionais das empresas Eletrobras, através do Programa Ciência sem Fronteiras e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), durante período de intercâmbio no exterior.

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde - PDTIS - FIOCRUZ, pelo uso de suas instalações (Plataforma RPT07C - Confocal e Microscopia Eletrônica-PR), ao Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR, e ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal - UFPR.

Aos professores, colegas e técnicos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e do Departamento de Biologia Celular.

Aos amigos que me incentivaram e que acompanharam algumas etapas dessa jornada, Michelle Mariano, Polina Vishkautsan, Larissa Vuitika, Maíra Reis e Fernanda Groth.

A todos aqueles que de alguma forma me fortaleceram e contribuíram com minha evolução.

Muito obrigada!

“O que destrói a humanidade: a política sem princípios, o prazer sem compromisso, a riqueza sem trabalho, a sabedoria sem caráter, os negócios sem moralidade, a ciência sem humanidade, a oração sem caridade.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos, ou hemoplasmas, são bactérias que se associam a hemácias de várias espécies de mamíferos, incluindo seres humanos. Estes microrganismos podem causar anemia hemolítica, mas infecções subclínicas são frequentemente relatadas e pouco se sabe a respeito das consequências e evolução de infecções crônicas por esses agentes. O presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em mamíferos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu e realizar a identificação molecular da bactéria. Amostras de primatas não humanos e de quatis foram analisadas por técnicas de microscopia e métodos moleculares e foi avaliada se a infecção por hemoplasma estava associada a alterações clínicas e/ou laboratoriais, origem e sexo do animal. As amostras também foram testadas para outros microrganismos para verificar possíveis coinfeções, incluindo *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii* e *Bartonella* spp. Um total de 42 amostras foram analisadas, 14 de bugio-preto (*Alouatta caraya*), 24 de macaco-prego (*Sapajus nigritus*), 2 de sagui (*Callithrix jacchus*) e 2 de quati (*Nasua nasua*). Dentre os primatas não humanos, 10/40 (25,0%) tiveram resultado positivo para hemoplasma. Animais nascidos em vida livre e bugios-pretos machos foram mais suscetíveis a apresentarem infecção. Apesar de alguns macacos apresentarem anemia, não houve associação significativa desta com a infecção por hemoplasma. As médias dos valores de proteína plasmática total e volume corpuscular médio estavam significativamente elevados em bugios-pretos positivos para hemoplasma. As sequências de *Mycoplasma* sp. encontradas nos bugios apresentaram maior identidade com a espécie '*Ca. M. kahanei*', porém na análise filogenética ficaram posicionadas em clados separados, dentro do grupo classificado como haemosuis. Também foi detectada, pela primeira vez, a ocorrência de hemoplasmas em quatis, evidenciados por microscopia de luz, sistema confocal e microscopia eletrônica de varredura. Os animais não apresentaram sinais clínicos, apesar de um deles estar infectado com *Mycoplasma haemofelis*, espécie considerada patogênica para gatos e já encontrada em ser humano. Em um dos quatis foi detectado *Mycoplasma* sp. semelhante a hemoplasmas encontrados em capivaras, mas na análise filogenética essas sequências foram colocadas em diferentes clados, dentro do grupo haemofelis. Nenhum animal apresentou resultado positivo para os outros microrganismos testados. Três espécies de hemoplasmas foram detectadas nos mamíferos da área de preservação da Itaipu. Os impactos relacionados à cronicidade da infecção devem ser investigados em refúgios biológicos, reservas ecológicas e criadouros de animais silvestres, especialmente para aquelas espécies consideradas vulneráveis ou em risco de extinção. Além disso, deve-se considerar o potencial risco de transmissão para seres humanos, animais domésticos e outros animais silvestres.

Palavras-chave: *Mycoplasma* hemotrópico. Hemoplasma. Animais silvestres. Doenças transmitidas por vetores.

ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas, or hemoplasmas, are erythrocyte-associated bacteria hosted by several mammalian species, including human beings. These agents can cause hemolytic anemia, but subclinical infections are frequently reported and little is known about consequences and evolution of chronic cases. The aim of the present study was to verify the occurrence of hemotropic mycoplasmas in mammals from the preservation area of the Itaipu Hydroelectric Power Plant and to perform the molecular identification of the bacteria. Nonhuman primates and coatis samples were analyzed by microscopy and molecular methods and the association between hemoplasma infection and clinical and/or laboratory abnormalities, origin or sex of the animal was evaluated. In order to investigate the presence of coinfections, samples were tested to other microorganisms, including *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*', *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella* spp. A total of 42 samples were analyzed, including 14 from black howler monkeys (*Alouatta caraya*), 24 from black-horned capuchins (*Sapajus nigritus*), 2 from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) and 2 from coatis (*Nasua nasua*). Among nonhuman primates, 10/40 (25.0%) tested positive for hemoplasma. Wild-born animals were more likely to test positive, as well as male black howler monkeys. Although some monkeys had anemia, no significant association was found between hemoplasma infection and anemia. The mean total plasma protein and mean corpuscular volume were significantly higher in black howler monkeys testing positive for hemoplasmas. The *Mycoplasma* sp. sequences found in the black howler monkeys were most closely related to 'Ca. M. kahanei', but in the phylogenetic analysis, they were positioned in separate clades, within the group classified as haemosuis. It was also detected, for the first time, the occurrence of hemoplasmas in coatis, evidenced by light microscopy, confocal and scanning electron microscopy. Both animals showed no clinical signs, although one of them was infected with *Mycoplasma haemofelis*, species considered pathogenic to cats and already found in human. A *Mycoplasma* sp. detected in one of the coatis appeared to be similar to hemoplasmas found in capybaras, but in the phylogenetic analysis they were positioned in different clades, within the haemofelis group. Samples tested negative for all the remaining microorganisms analyzed. Three hemoplasma species were detected in the mammals of the preservation area of Itaipu. Impacts related to the chronicity of hemoplasma infection should be investigated in wildlife sanctuaries, ecological reserves and breeding colonies of wild animals, especially for vulnerable species. In addition, the potential risk of transmission to human beings, domestic animals and other wild animals should be considered.

Keywords: Hemotropic mycoplasma. Hemoplasma. Wild animal. Vector-borne disease.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSENSO, 138 SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DE <i>Mycoplasma</i> , MÉTODO INFERÊNCIA BAYESIANA.....	31
FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSENSO, 67 SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DE HEMOPLASMAS DO GRUPO HAEMOSUIS, MÉTODO INFERÊNCIA BAYESIANA	33
FIGURA 3 - EXTENSÕES SANGUÍNEAS DE QUATIS (<i>Nasua nasua</i>).....	34
FIGURA 4 - IMAGEM CONFOCAL DA EXTENSÃO SANGUÍNEA DO QUATI FÊMEA.....	35
FIGURA 5 - HEMOPLASMAS ADERIDOS A HEMÁCIAS DE QUATI EM IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL	36
FIGURA 6 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE AMOSTRA DE SANGUE DO QUATI FÊMEA.....	36
FIGURA 7 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSENSO, 44 SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DE HEMOPLASMAS, MÉTODO INFERÊNCIA BAYESIANA.....	38

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - CARACTERISTICAS DOS 40 PRIMATAS NÃO HUMANOS COM RESULTADOS NEGATIVOS E POSITIVOS PARA HEMOPLASMAS28
- TABELA 2 - DADOS HEMATOLÓGICOS REFERENTES AOS PRIMATAS NÃO HUMANOS COM ANEMIA E POSITIVOS PARA HEMOPLASMA29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apo	- <i>Apochromatic aberration correction</i>
BI	- Inferência Bayesiana
bp	- <i>Base pair</i>
Ca	- <i>Candidatus</i>
CFI	- <i>Chrome-Free Infinity-Corrected</i>
CHCM	- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CME-UFPR	- Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná
CMt	- ' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> '
Ct	- <i>Threshold cycle</i>
DIC	- <i>Differential Interference Contrast</i>
dL	- Decilitro
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	- <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EDTA	- <i>Ethylene Diamine Triacetic Acid</i>
fL	- Fentolitro
g	- Grama
<i>g</i>	- Força gravitacional
GTR	- <i>General Time-Reversible model</i>
Hb	- Hemoglobina
HCM	- Hemoglobina Corpuscular Média
Hem	- Hemácias por milímetro cúbico de sangue
HIV	- <i>Human Immunodeficient Virus</i>
Ht	- Hematócrito
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC	- Intervalo de Confiança
IUCN	- <i>International Union for Conservation of Nature</i>
kg	- Quilograma
Leu	- Leucócitos por milímetro cúbico de sangue
M	- Molar
MCMCMC	- <i>Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo</i>
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura

Mhf	- <i>Mycoplasma haemofelis</i>
ML	- Máxima Verossimilhança
mm	- Milímetro
mm ³	- Milímetro cúbico
mM	- Milimol
nm	- Nanômetro
OR	- <i>Odds Ratio</i>
<i>p</i>	- <i>p</i> -valor
pb	- Pares de base
PBS	- <i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PCRc	- <i>Conventional Polimerase Chain Reaction</i>
PCRq	- <i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
pH	- <i>Potential of hydrogen</i>
Plan	- <i>Flat Field optical correction</i>
PNH	- Primatas Não Humanos
PPT	- Proteína Plasmática Total
PR	- Paraná
RBV	- Refúgio Biológico Bela Vista
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	- <i>Ribosomal RNA</i>
S	- <i>South</i>
U	- Unidade
UV	- Ultra Violeta
VCM	- Volume Corpuscular Médio
W	- <i>West</i>
WD	- <i>Working Distance</i>
μL	- Microlitro
μm	- Micrômetro
μM	- Micromol
°C	- Graus Celsius
%	- Por cento
3'	- Extremidade três linha
5'	- Extremidade cinco linha

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo Geral	19
1.1.2	Objetivos Específicos	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1	AMOSTRAS	21
2.2	ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	21
2.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	22
2.3.1	Microscopia de luz	22
2.3.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	22
2.4	ANÁLISE MOLECULAR	23
2.4.1	Extração do DNA	23
2.4.2	Deteção de hemoparasitas por PCRq	23
2.4.3	Deteção de hemoplasmas por PCRc	24
2.4.4	Sequenciamento	24
2.4.5	Análise filogenética	25
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
3	RESULTADOS	27
3.1	PRIMATAS NÃO HUMANOS	27
3.2	QUATIS	34
4	DISCUSSÃO	39
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA	57
	ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO	58
	ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO	59

1 INTRODUÇÃO

Micoplasmas hemotrópicos são bactérias que se associam a eritrócitos de várias espécies de mamíferos (MESSICK, 2004), incluindo seres humanos (DOS SANTOS et al., 2008; YUAN et al., 2009; SYKES et al., 2010; STEER et al., 2011; MAGGI et al., 2013a, 2013b). Estes agentes podem causar anemia hemolítica, inapetência, perda de peso, desidratação, letargia e até mesmo a morte de alguns animais (WILLI et al., 2007a). Também podem permanecer latentes por longos períodos, mesmo após o tratamento com antimicrobianos (ISHAK et al., 2008; TASKER, 2010; NOVACCO et al., 2011). São microrganismos incultiváveis, muito pequenos, desprovidos de parede celular e limitados apenas por membrana plasmática. Medem de 0,3 a 0,8 μm de diâmetro e seu genoma é um dos menores dentre os procariotos (HOLT et al., 1994).

Quanto a sua classificação, estas bactérias, também denominadas genericamente como hemoplasmas, pertenciam aos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. Porém, análises do gene 16S rRNA mostraram maior proximidade filogenética ao gênero *Mycoplasma*, família Mycoplasmataceae, ordem Mycoplasmatales, classe Mollicutes (NEIMARK; KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001; NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004), sendo assim reclassificadas.

Muitas espécies de hemoplasma utilizam a designação provisória *Candidatus* (NEIMARK et al., 2002b), recomendada para procariotos incultiváveis que ainda não possuem completa descrição, que inclui suas características estruturais, metabólicas e reprodutivas, comprovação do seu habitat, além de sua informação genômica (MURRAY; STACKEBRANDT, 1995).

No que se refere ao ciclo epidemiológico dos hemoplasmas, este ainda não está definido. Alguns trabalhos sugerem que a transmissão dessas bactérias possa ocorrer através de vetores hematófagos (WILLI et al., 2007a), tais como piolhos (*Polyplax spinulosa*), pulgas (*Ctenocephalides felis* e *Xenosylla cheopis*) e carrapatos (*Ixodes ricinus*, *Ixodes ovatus* e *Rhipicephalus* sp.) (MESSICK, 2004; WILLI et al., 2007a; HOELZLE, 2008; SYKES, 2010; TASKER, 2010). Algumas espécies de mosquito também podem estar envolvidas na transmissão (SYKES et al., 2007), como o *Aedes aegypti* (REAGAN et al., 2016). Porém, apesar do DNA de hemoplasma ter sido isolado de alguns mosquitos, o seu ciclo através desse vetor

não foi comprovado (REAGAN et al., 2016). Alguns fatos corroboram com a hipótese da transmissão via artrópodes, como a maior prevalência de infecções por hemoplasma em localidades onde a infestação por artrópodes é maior (SYKES et al., 2007), ou onde as temperaturas médias anuais são mais elevadas e com maior número de espécies de artrópodes hematófagos (WILLI et al., 2007a). Outras vias de transmissão sugeridas são a transmissão direta, mediante contato agressivo entre animais (WILLI et al., 2007a), e a transmissão parenteral e oral através de sangue contaminado (WILLI et al., 2007a; HOELZLE, 2008; TASKER, 2010; BARKER; TASKER, 2013). Há ainda relatos que descrevem casos de contágio através de transfusão sanguínea (WILLI et al., 2006b, 2007a) e transmissão vertical, durante a gestação, parto ou por meio da lactação (WILLI et al., 2007a; HOELZLE, 2008; HU et al., 2009; TASKER, 2010).

Apesar da doença clínica raramente ser reportada, a utilização de métodos de detecção mais sensíveis tem demonstrado que a infecção por micoplasmas hemotrópicos é muito comum (HULME-MOIR et al., 2010). No Brasil, algumas espécies de hemoplasmas já foram detectadas em animais domésticos e de produção, além de animais silvestres (BIONDO et al., 2009). Alguns relatos também sugerem a possibilidade da hemoplasmosose ser uma infecção zoonótica (HU et al., 2009; TASKER et al., 2010), podendo ser assintomática ou provocar alterações como febre aguda e anemia em seres humanos (HU et al., 2009; CONGBIN et al., 2010; STEER et al., 2011).

A hemoplasmosose é bem descrita em animais domésticos, como gatos, contudo pouco se sabe sobre a doença em animais silvestres (WILLI et al., 2007b). O estudo da fisiologia e da patologia de animais silvestres é restrito devido a fatores como, habitat de difícil acesso, baixa densidade populacional, hábitos de viverem mais ocultos e ainda devido ao comportamento “tímido” de várias espécies (DE THOISY et al., 2000). Contudo, infecções por hemoparasitas podem representar um risco para a sobrevivência de alguns animais e o conhecimento a respeito desses agentes, sua identificação e epidemiologia, podem auxiliar no direcionamento de estratégias de conservação de animais em risco (ANDRÉ et al., 2010). Esta é uma das atividades desenvolvidas no Refúgio Biológico Bela Vista (RBV), área de proteção ambiental da Usina Hidrelétrica de Itaipu, em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, onde também está localizado o Zoológico Roberto Ribas Lange e o Hospital Veterinário. No RBV, 420 animais de 70 espécies, algumas delas ameaçadas de

extinção, fazem parte de projetos de manejo e conservação (ITAIPU BINACIONAL, 2016). Além disso, também são realizados atendimentos a animais silvestres encontrados feridos na região de abrangência da usina, que ao serem reabilitados retornam ao seu ambiente natural (ITAIPU BINACIONAL, 2011a, 2011b, 2011c).

A identificação de hemoplasmas em algumas espécies de animais silvestres da área do RBV, como gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) (GUIMARÃES, 2008), capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (VIEIRA *et al.*, 2009), cervídeos (*Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana* e *Mazama americana*) (GRAZZIOTIN *et al.*, 2011) e bugio-preto (*Alouatta caraya*) (SANTOS *et al.*, 2013), associada à necessidade de maiores estudos sobre a epidemiologia e caracterização desses agentes, motivou a pesquisa de hemoplasmas em outros mamíferos atendidos pela Itaipu.

Anualmente, amostras de sangue dos mamíferos mantidos pela Itaipu são coletadas para análises laboratoriais de controle da sanidade animal. Neste estudo, foram utilizadas amostras de primatas não humanos atendidos no Hospital Veterinário do RBV para verificar a prevalência de hemoplasmas e possíveis alterações clínicas e laboratoriais associadas à infecção. Além disso, outros microrganismos transmitidos por vetores também foram testados para avaliar a ocorrência de coinfeções. Adicionalmente, foi realizada a pesquisa de hemoplasmas por técnicas moleculares e de microscopia em quatis, espécie que circula livremente nas áreas no RBV.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em mamíferos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu e realizar a identificação molecular da bactéria.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar a presença de micoplasmas hemotrópicos em mamíferos mediante técnicas de microscopia e ensaios moleculares;

- b) Verificar a ocorrência de infecções concomitantes causadas por outros patógenos causadores de anemia infecciosa ou transmitidas por vetores;
- c) Avaliar se há alterações clínicas e/ou laboratoriais associadas com a infecção por hemoplasma;
- d) Verificar se há relação entre infecção por hemoplasma e origem, local de nascimento e/ou sexo do animal;
- e) Verificar a relação filogenética entre as espécies de *Mycoplasma* detectadas, comparando-as com as espécies previamente identificadas mediante análise de sequências do gene 16S rRNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

As amostras e os dados clínicos utilizados no presente trabalho foram provenientes de exames de controle da manutenção da sanidade animal, realizados por recomendação do IBAMA nos animais do Criadouro de Animais Silvestres (registro no IBAMA nº 1286483) e Zoológico Roberto Ribas Lange (registro no IBAMA nº 598835), localizados no Refúgio Biológico Bela Vista da Usina Hidrelétrica de Itaipu em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil (25° 26' 57" S 54° 33' 18" W). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (protocolo nº 047/2014) (ANEXO 1). Após a realização dos exames laboratoriais de rotina, os resíduos de sangue foram utilizados para as análises microscópicas e moleculares, conforme descrito a seguir.

Um total de 42 amostras foram analisadas, 14 de bugio-preto (*Alouatta caraya*), 24 de macaco-prego (*Sapajus nigritus*), 2 de sagui (*Callithrix jacchus*) e 2 de quati (*Nasua nasua*). Quanto a origem dos animais, 4 bugios-pretos eram de vida livre e 10 de cativeiro (4 nascidos em cativeiro e 6 em vida livre), 5 macacos-prego eram de vida livre e 19 de cativeiro (18 nascidos em cativeiro e 1 em vida livre) e os saguis e quatis eram nascidos e criados em cativeiro.

As amostras de sangue dos primatas não humanos (PNH) foram coletadas utilizando-se tubos estéreis contendo EDTA. As amostras de quatis foram coletadas utilizando-se tubos com EDTA e tubos com heparina sódica. Lâminas de extensão sanguínea foram realizadas imediatamente após a coleta de sangue. Posteriormente à realização dos exames laboratoriais de rotina, os resíduos de sangue foram armazenados à temperatura de -80°C, para subsequente análise molecular.

2.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

O número de hemácias por milímetro cúbico de sangue (Hem), hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina (Hb), número de leucócitos por milímetro cúbico de sangue (Leu) e concentração de proteína plasmática total (PPT), foram verificados utilizando-se métodos tradicionais (ALMOSNY; DOS SANTOS, 2001). Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular

média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de Hem, Ht e Hb (ALMOSNY; DOS SANTOS, 2001). Os animais foram classificados como anêmicos caso os valores de Hem, Ht ou Hb estivessem abaixo do intervalo de referência estabelecido para cada espécie (FLAIBAN et al., 2008; SANTOS, 2011).

2.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

2.3.1 Microscopia de luz

As extensões sanguíneas foram coradas com corante de May-Grünwald-Giemsa e examinadas utilizando-se microscopia de luz (BX51, Olympus, Tokyo, Japan), com uma ampliação de 1000X. As amostras dos quatis também foram analisadas em um sistema de imagem confocal (A1RSiMP, Nikon, Tóquio, Japão), utilizando-se objetiva CFI Plan Apo Lambda 100X/1.45 Oil .13mm WD, laser 476 nm para excitação e filtro de intervalo de 482/35 nm (azul) ou laser de excitação 488 nm e filtro de intervalo de 525/50 nm (verde). Para imagens de contraste de interferência diferencial (DIC), as células foram excitadas utilizando-se laser 488 nm e filtro de intervalo de 525/50 nm para emissão. As imagens confocal e DIC foram obtidas utilizando-se sistemas sequenciais de cada canal (azul, verde ou DIC). Para a visualização das imagens, utilizou-se um software de imagem comercial (Nis Elements 4.20, Nikon, Tokyo, Japão). As imagens finais foram editadas através do software GIMP v.2.8.16 (disponível em <http://www.gimp.org/>).

2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Uma alíquota de 500 µL de sangue dos quatis, coletada com heparina sódica, foi lavada três vezes com solução tampão de fosfato (PBS), mediante centrifugação a 600 g, durante 5 minutos. O sedimento resultante foi lavado com solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 e fixado à temperatura ambiente por 1 hora com o fixador de Karnovsky modificado (KARNOVSKY, 1965) (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4% e CaCl₂ 1 mM em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4). Após lavar duas vezes com solução tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,4, as células foram pós-fixadas e contrastadas com tetróxido

de ósmio (OsO_4 1% em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4) à temperatura ambiente, por 1 hora no escuro e depois lavadas três vezes com a mesma solução tampão. As células ressuspensas foram espalhadas em lamínulas, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, secas pelo método de ponto crítico de CO_2 (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), metalizadas com ouro (SCD 030, Balzers Union, Balzers, Liechtenstein) e examinadas em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEGA3 LMU, Tescan Orsay Holding, Brno, República Tcheca) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME-UFPR, Curitiba, PR).

2.4 ANÁLISE MOLECULAR

2.4.1 Extração do DNA

O DNA de 100 μL das amostras de sangue com EDTA, mantidas a -80°C , foi extraído utilizando-se o kit comercial Quick-gDNATM MiniPrep (Zymo Research Corp., Orange, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. Como controle negativo, foi utilizada água ultra-pura (Applied Biosystems, Austin, TX, USA).

2.4.2 Detecção de hemoparasitas por PCRq

As amostras foram submetidas a uma triagem para múltiplos patógenos mediante um painel de PCR quantitativo em tempo real (PCRq) para detecção de infecções e coinfeções por agentes causadores de anemia infecciosa ou doenças transmitidas por vetores, segundo protocolo comercial específico. O painel utilizado possibilitava a detecção de DNA dos seguintes microrganismos: *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum', '*Candidatus* Mycoplasma turicensis', *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii* e *Bartonella* spp. (IDEXX Laboratories Inc., Sacramento, CA, USA). O gene 18S rRNA do hospedeiro foi utilizado para avaliar a quantidade e a qualidade do DNA, além dos controles positivo (DNA sintético, Ultramer, IDT Technologies, Coralville, Iowa, USA) e negativo (RNase-free water, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4.3 Detecção de hemoplasmas por PCRC

As amostras foram avaliadas por técnica de PCR convencional (PCRC) utilizando-se iniciadores de amplo espectro para detecção de hemoplasmas. Os iniciadores, complementares às sequências do gene 16S rRNA, foram: senso 5'-ACG AAA GTC TGA TGG AGC AAT A-3' e antisenso 5'-ACG CCC AAT AAA TCC G(A/G)AT AAT-3', que amplificam um fragmento de 159 bp (JENSEN et al., 2001). Conforme protocolo de amplificação (SYKES et al., 2010), cada 50 µL da reação continha: 1X tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), 1 µM de cada iniciador, 2,5 U de AmpliTaq Gold polimerase (Applied Biosystems, Austin, TX) e 5 µL do DNA molde. O protocolo de termociclagem (Dyad Peltier thermocycler, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) consistiu de 5 minutos de desnaturação a 95°C, seguidos por 45 ciclos de amplificação (1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 60°C e 30 segundos de extensão a 72°C) e 5 minutos de extensão final a 72°C. Como controle positivo, utilizou-se DNA genômico extraído de amostra de sangue de um gato contendo '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e como controle negativo, água ultrapura (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Os produtos da PCR foram posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com GelStar (Lonza, Rockland, ME, USA) e visualizados em transiluminador UV.

2.4.4 Sequenciamento

No sequenciamento das amostras positivas para hemoplasma, um fragmento do gene 16S rRNA de aproximadamente 1000 bp foi amplificado utilizando os iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (PITULLE et al., 1999). Cada reação (50 µL) continha 1X tampão de reação, 1,25 U AmpliTaq Gold polimerase (Applied Biosystems, Austin, TX, USA), 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP e 10 µL do DNA molde. O protocolo de termociclagem (Dyad Peltier thermocycler, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) consistiu de 10 minutos de desnaturação a 95°C, seguidos por 35 ciclos de amplificação (1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de anelamento a 48°C e 2 minutos de extensão a 72°C) e 5 minutos de extensão final a 72°C (SYKES et al., 2005). Os controles

positivo e negativo foram os mesmos utilizados na primeira reação de PCR. As amostras foram analisadas em gel de agarose a 2,5%, contendo corante GelStar (Lonza, Rockland, ME, USA) e visualizadas em transiluminador UV.

Os produtos de PCR foram então purificados a partir do gel de agarose (GenElute™ Gel Extraction Kit; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) e sequenciados através do método de Sanger (ABI Prism 3730 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (College of Biological Sciences UC^{DNA} Davis Sequencing Facility, University of California, Davis, CA, USA), utilizando os mesmos inicializadores usados na reação de amplificação.

Os cromatogramas foram examinados, editados quando necessário, e as sequências consenso foram geradas utilizando-se o programa MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). Os dados foram investigados quanto à presença de sequências químéricas, utilizando-se o programa USEARCH 8.1.1756 (EDGAR, 2010). O percentual de identidade com outras sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foi obtido utilizando-se o BLASTN (ZHANG et al., 2000).

2.4.5 Análise filogenética

Para as análises filogenéticas, as sequências amplificadas, juntamente com sequências de hemoplasmas selecionadas do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram submetidas a alinhamento múltiplo de sequências, utilizando-se o MAFFT 7.306b (KATO; STANDLEY, 2013). Quando necessário, o alinhamento foi editado manualmente através do programa MEGA 6.06. As árvores filogenéticas foram construídas por Inferência Bayesiana (BI), no MrBayes 3.2.6 (RONQUIST et al., 2012), e pelo Método de Máxima Verossimilhança (ML), no GARLI 2.1 (BAZINET; ZWICKL; CUMMINGS, 2014). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi determinado no jModeltest 2.1 (DARRIBA et al., 2012). Para BI, a análise de MCMCMC (*Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo*) foi aplicada para estimar a probabilidade posterior de distribuição das sequências. Em cada análise, duas corridas independentes foram realizadas e a amostragem foi feita a cada 100ª geração, com temperatura ajustada para 0,5. As corridas foram concluídas quando o desvio padrão das frequências de bifurcação foi <0,01. As análises de ML foram executadas incluindo 1.000 réplicas de *bootstrap*. As

árvores consenso resultantes foram visualizadas com o programa FigTree 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) e editadas com o Inkscape 0.91 (www.inkscape.org).

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise dos dados dos PNH, o software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007) e um software estatístico *online* (<http://vassarstats.net/>) foram utilizados para avaliar as associações entre infecção por hemoplasma e espécie de hospedeiro, origem do animal (vida livre ou de cativeiro), local de nascimento dos animais em cativeiro (proveniente de vida livre ou nascido em cativeiro), sexo, anemia, valores de Hem, Ht, Hb, PPT e índices hematimétricos. Para a análise das variáveis nominais foi utilizado o teste exato de Fisher. O teste t foi usado para comparar os dados quantitativos (Hem, Ht, Hb e PPT) entre animais infectados com hemoplasma e não infectados. Além disso, os resultados do hemograma e de PPT foram analisados como variáveis nominais pelo teste exato de Fisher, após serem categorizados como diminuídos ou aumentados, de acordo com o intervalo de referência estabelecido para cada espécie. O nível de significância estatística foi estabelecido em 0,05.

3 RESULTADOS

3.1 PRIMATAS NÃO HUMANOS

Estruturas compatíveis com hemoplasmas foram detectadas por microscopia de luz em oito de quarenta extensões sanguíneas (8/40) (20,0%, IC 95% = 10,5-34,8), sendo elas 7 de bugios-pretos e 1 de macaco-prego. As estruturas eram basófilas (coradas em roxo), contrastando com os eritrócitos acidófilos (corados em rosa), em sua maioria esféricas e individualizadas, medindo 0,6-0,7 μm de diâmetro. Estruturas em forma de bastonete e em cadeias também foram observadas.

Por PCRc, dez de quarenta primatas não humanos (10/40) (25,0%, IC 95% = 14,2-40,2) tiveram resultados positivos para *Mycoplasma* sp., dentre estas as oito amostras que apresentaram estruturas compatíveis na extensão sanguínea. Das 10 amostras positivas, 9 foram de bugios-pretos (9/14, 64,3%, IC 95% = 38,8-83,7) (4 de vida livre e 5 em cativeiro; sendo 4 dos 5 indivíduos em cativeiro procedentes de vida livre) e 1 de macaco-prego (1/24, 4,2%, IC 95% = 0,7-20,2) (animal em cativeiro, nascido em cativeiro). Não foram detectados hemoplasmas nos saguis.

Os bugios-pretos foram 45 vezes mais propensos a serem positivos para hemoplasma do que as outras espécies de PNH avaliadas (OR = 45,0, IC 95% = 4,6-439,3, $p = 0,00006$). Animais provenientes de vida livre foram mais propensos a apresentar resultado positivo do que os animais nascidos em cativeiro (OR = 14,7, IC 95% = 1,8-117,7, $p = 0,01$). Em relação ao local de nascimento dos PNH em cativeiro, 4/7 (57,1%) animais nascidos em vida livre e 2/24 (8,3%) animais nascidos em cativeiro apresentaram resultados positivos para hemoplasma.

Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre infecção por hemoplasma e anemia ($p = 0,22$) ou entre infecção e o sexo do PNH ($p = 0,26$), mas considerando apenas os bugios-pretos, os machos apresentaram maior predisposição a serem positivos do que as fêmeas ($p = 0,02$).

As características dos 40 PNH avaliados estão apresentadas na TABELA 1.

TABELA 1 - CARACTERISTICAS DOS 40 PRIMATAS NÃO HUMANOS COM RESULTADOS NEGATIVOS E POSITIVOS PARA HEMOPLASMAS

Espécie de PNH (n)	PCRc para hemoplasma (n)	Origem n'/n (%)		Nascimento dos PNH em cativeiro n'/n (%)		Sexo n'/n (%)		Anemia n'/n (%)	
		Vida livre	Cativeiro	Vida livre	Cativeiro	Macho	Fêmea	Anêmico	Não anêmico
<i>Alouatta caraya</i> (14)	Positivo (9)	4 /4 (100)	5/10 (50)	4/6 (66,7)	1/4 (25,0)	7/7 (100)	2/7 (28,6)	4/6 (66,7)	5/8 (62,5)
	Negativo (5)	0/4	5/10 (50)	2/6 (33,3)	3/4 (75,0)	0/7	5/7 (71,4)	2/6 (33,3)	3/8 (37,5)
<i>Sapajus nigritus</i> (24)	Positivo (1)	0/5	1/19 (5,3)	0/1	1/18 (5,6)	1/16 (6,3)	0/8	1/5 (20,0)	0/17
	Negativo (23)	5/5 (100)	18/19 (94,7)	1/1 (100)	17/18 (94,4)	15/16 (93,7)	8/8 (100)	4/5 (80,0)	17/17 (100)
<i>Callithrix jacchus</i> (2)	Positivo (0)	0/0	0/2	0/0	0/2	0/1	0/1	-	-
	Negativo (2)	0/0	2/2 (100)	0/0	2/2 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	-	-

FONTE: O autor (2016).

NOTAS: A tabela apresenta a espécie de primata não humano, resultado do PCRc para hemoplasma, origem do animal, local de nascimento dos animais em cativeiro, sexo e frequência de anemia.

LEGENDA: PNH = Primata não humano; n' = número de animais positivos ou negativos para hemoplasma no PCR convencional; n = total de animais com a respectiva característica.

A média dos valores de PPT foi significativamente maior em bugios-pretos com resultado positivo para hemoplasma (8,6 g/dL, IC 95% = 8,3-8,9, $p = 0,04$), quando comparados a bugios-pretos não infectados (7,6 g/dL, IC 95% = 6,3-8,9). A média do VCM também foi significativamente maior em bugios-pretos infectados com hemoplasma (121,8 fL, IC 95% = 103,0-140,6, $p = 0,04$), quando comparados a bugios-pretos não infectados (89,8 fL, IC 95% = 57,9 -121,7).

Quatro bugios-pretos positivos para hemoplasma apresentaram número de hemácias abaixo da faixa de referência, mas a média dos valores não foi estatisticamente diferente entre animais com resultados positivos ($3,64 \times 10^6$ células/mm³, IC 95% = $3,05 \times 10^6$ - $4,22 \times 10^6$, $p = 0,61$) e negativos ($3,84 \times 10^6$ células/mm³, IC 95% = $3,17 \times 10^6$ - $4,51 \times 10^6$) para hemoplasmas. Além disso, estes quatro animais apresentaram Ht e Hb normais ou elevados e VCM e HCM elevados, como apresentado na TABELA 2. O macaco-prego infectado com hemoplasma também estava com o número de hemácias reduzido e PPT elevada, mas Ht e Hb normais e VCM e HCM elevadas (TABELA 2).

TABELA 2 - DADOS HEMATOLÓGICOS REFERENTES AOS PRIMATAS NÃO HUMANOS COM ANEMIA E POSITIVOS PARA HEMOPLASMA

Variável	Bugio-preto macho 1	Bugio-preto macho 2	Bugio-preto macho 3	Bugio-preto fêmea	Macaco-prego macho
HEM ($\times 10^6$ cel/mm ³)	3,59	3,66	2,40	2,42	4,26
Valor de referência* ($\times 10^6$ cel/mm ³)	3,72-4,90			3,47-4,57	4,34-5,98
HT (%)	44	49	40	35	43
Valor de referência (%)*	30-44			32-41	39-47
Hemoglobina (g/dL)	11,57	15,58	13,40	11,86	15,19
Valor de referência (g/dL)*	10,04-13,96			9,05-12,41	12,24-16,78
VCM (fL)	123	134	167	145	101
Valor de referência (fL)*	72-102			81-98	73-97
HCM (pg)	32	43	56	49	36
Valor de referência (pg)*	25-31			23-29	23-32
CHCM (g/dL)	26	32	33	34	35
Valor de referência (g/dL)*	27-36			27-32	30-36
LEU ($\times 10^3$ cel/mm ³)	12,6	11,9	5,6	8,0	8,0
Valor de referência ($\times 10^3$ cel/mm ³)*	7,2-14,7			4,5-10,8	

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: HEM = hemácias; HT = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; LEU = leucócitos.

NOTAS: * Valores de referência segundo Flaiban et al. (2008) e Santos (2011).

Quando os parâmetros sanguíneos foram categorizados como diminuídos ou aumentados, os PNH com resultado positivo para hemoplasma foram 6,7 vezes mais propensos a terem níveis de PPT acima do intervalo de referência do que os PNH com resultado negativo (OR = 6,7, IC 95% = 1,3-35,0, $p = 0,04$). Não houve relação entre infecção por hemoplasma e alteração nos demais parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

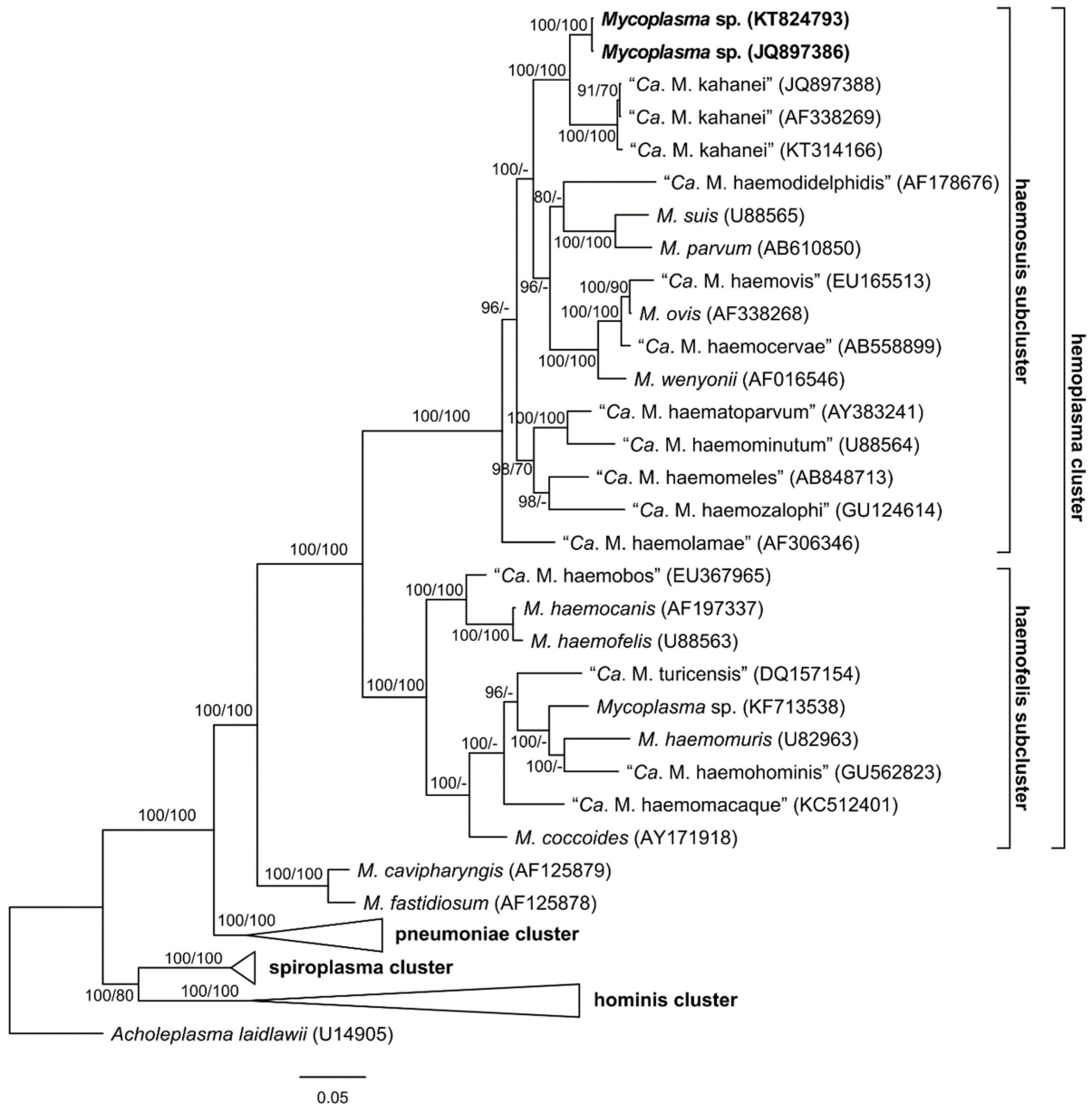
Quanto às análises moleculares, as duas sequências do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* sp. detectadas em bugios-pretos (GenBank JQ897386 e KT824793) apresentaram, respectivamente, 93,6% e 94,2% de identidade com '*Ca. M. kahanei*' detectado em um macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) da Guiana Francesa (GenBank AF338269) (NEIMARK et al., 2002a) e 93,6% e 94,8% de identidade, respectivamente, com '*Ca. M. kahanei*' detectado em um macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) do norte do Brasil (GenBank KT314166) (BONATO et al., 2015). Infelizmente, apesar de repetidas tentativas, não foi obtido um bom resultado no sequenciamento da amostra do macaco-prego.

Na análise filogenética, duas árvores foram propostas, uma referente ao gênero *Mycoplasma* e outra que incluiu apenas sequências referentes ao grupo haemosuis. Para BI, quatro cadeias de Markov foram executadas durante 1.000.000 ciclos para a árvore do gênero *Mycoplasma* e 500.000 ciclos para a árvore do grupo haemosuis. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado em ambas as análises, BI e ML, foi o GTR (*General Time-Reversible model*) (TAVARÉ, 1986) com variação gama, quatro categorias de taxa de substituição e uma proporção de sítios invariáveis.

O alinhamento do gênero *Mycoplasma* compreendeu 139 sequências de 1154 caracteres, incluindo o grupo externo *Acholeplasma laidlawii*. As análises por BI e ML resultaram em árvores com topologia similar, formadas por cinco clados principais: hominis, spiroplasma, pneumoniae, fastidiosum e hemoplasma. Este último foi dividido em dois clados irmãos, denominados grupos haemosuis e haemofelis. Na árvore consenso (FIGURA 1), os clados pneumoniae, spiroplasma e hominis foram colapsados na árvore editada e estão compostos por 12, 8 e 90 sequências, respectivamente, correspondendo à linhagem-tipo de cada espécie que

compõe o respectivo grupo. Os valores de probabilidade posterior para BI e de *bootstrap* para ML foram apresentados em cada nó. Os hemoplasmas detectados em bugios-pretos e ‘*Ca. M. kahanei*’ foram divididos em dois clados irmãos, com bom suporte filogenético (BI = 100%, ML = 100%), dentro do grupo haemosuis.

FIGURA 1 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSENSO, 138 SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DE *Mycoplasma*, MÉTODO INFERÊNCIA BAYESIANA.

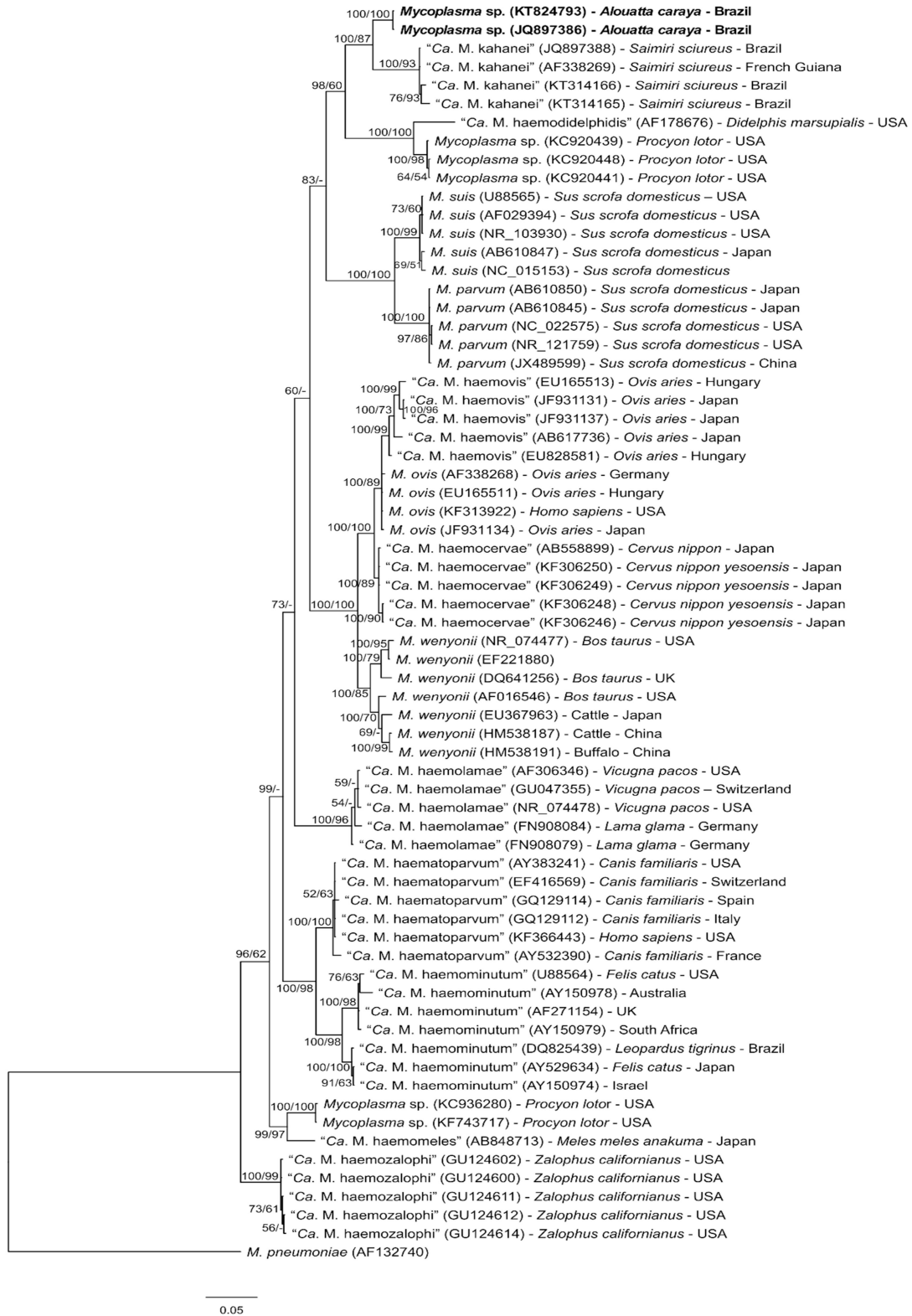


FONTE: O autor (2016).

NOTAS: Valores de suporte, probabilidade posterior BI/bootstrap ML, estão indicados próximos aos nós. Os triângulos representam clados que compreendem 12, 8 e 90 linhagens-tipo pertencentes aos grupos pneumoniae, spiroplasma e hominis, respectivamente. Os nomes das espécies e seus respectivos números de acesso no GenBank estão apresentados e as sequências detectadas nos bugios-pretos estão em negrito. Grupo externo: *Acholeplasma laidlawii* (GenBank U14905).

Para a construção da árvore referente ao grupo haemosuis, sequências adicionais deste grupo foram selecionadas e utilizadas em um alinhamento de 68 sequências de 1110 caracteres, incluindo o grupo externo *Mycoplasma pneumoniae*. As árvores consenso das análises por BI e ML revelaram a mesma topologia. Assim como na representação anterior, as sequências de hemoplasmas dos bugios-pretos mostraram a mesma relação com 'Ca. M. kahanei' (BI = 100%, ML = 87%), como observado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSENSO, 67 SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DE HEMOPLASMAS DO GRUPO HAEMOSUIS, MÉTODO INFERÊNCIA BAYESIANA



FONTE: O autor (2016).

NOTAS: Valores de suporte, probabilidade posterior BI/bootstrap ML, estão indicados próximos aos nós. O nome das espécies, seu respectivo número de acesso no GenBank, hospedeiro e país de origem estão apresentados e as sequências detectadas nos bugios-pretos estão em negrito. Grupo externo: *Mycoplasma pneumoniae* (GenBank AF132740).

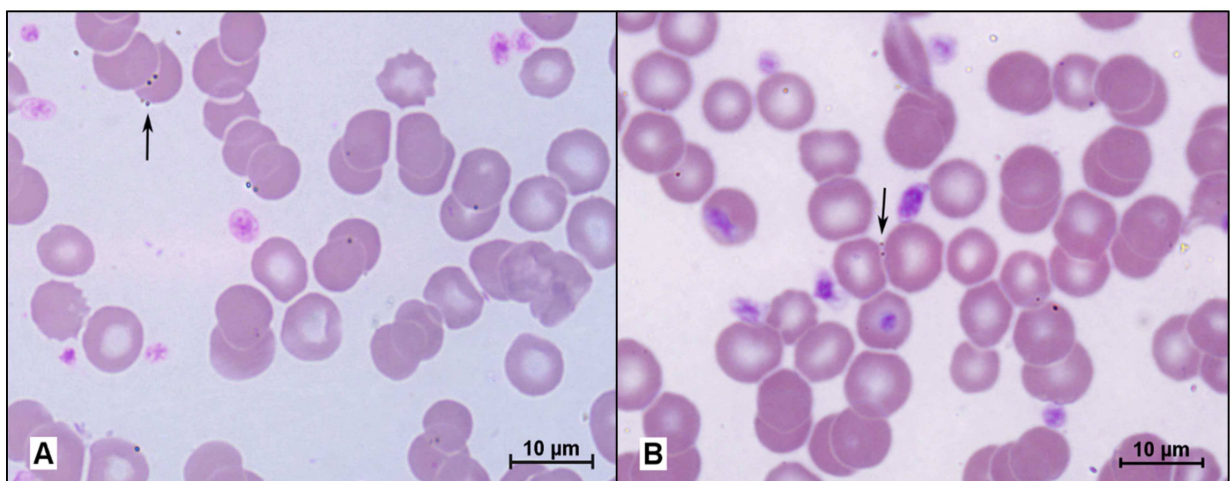
Ao ser aplicado o painel de PCRq, 9/14 (64,3%) amostras de bugios-pretos (4 de vida livre e 5 de cativo) tiveram resultado positivo para '*Ca. M. haemominutum*'. A amostra de macaco-prego positiva no PCRc apresentou resultado negativo para as três espécies de micoplasma testadas no painel de PCRq. Todas as 40 amostras de PNH foram negativas para *M. haemofelis*, '*Ca. M. turicensis*', *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *N. risticii* e *R. rickettsii* no PCRq.

3.2 QUATIS

Ambos os quatis foram considerados saudáveis ao exame físico. O quati fêmea pesava 8,02 kg e o macho pesava 4,88 kg. Não foram encontrados ectoparasitas. O valor de Ht do macho foi de 37% e da fêmea 32%, ambos dentro da faixa de referência para a espécie (29,8-38,2%) (LABATE; NUNES; GOMES, 2001).

Através da microscopia de luz foram observadas pequenas estruturas epieritrocíticas basófilas (coradas em roxo) em contraste aos eritrócitos acidófilos (corados em rosa). Essas estruturas apresentavam forma cocoide e estavam individualmente aderidas aos eritrócitos ou livres no esfregaço. Algumas hemácias apresentavam mais de uma estrutura por célula (FIGURA 3).

FIGURA 3 - EXTENSÕES SANGUÍNEAS DE QUATIS (*Nasua nasua*)

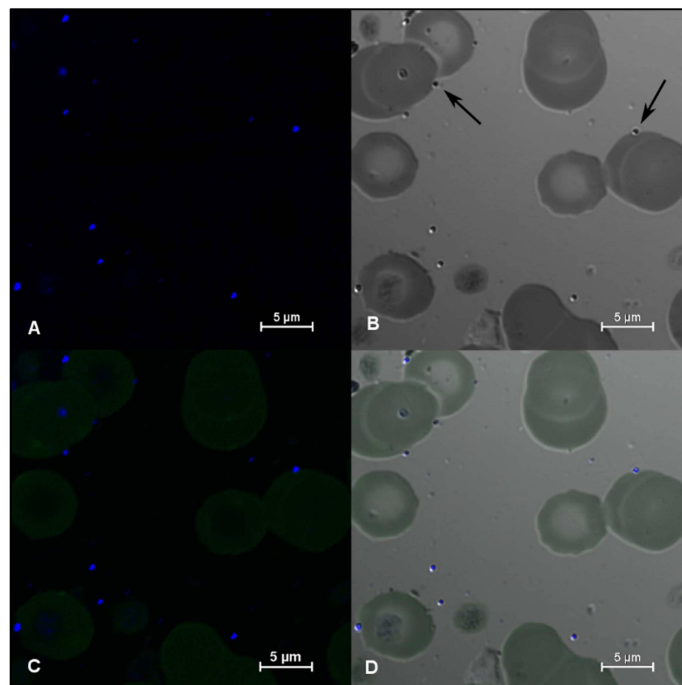


FONTE: O autor (2016).

NOTAS: Pequenas estruturas basofílicas são observadas ligadas aos eritrócitos (setas). A: Amostra do quati fêmea. B: Amostra do quati macho. Coloração de May-Grünwald-Giemsa. Microscopia de luz (1,000X). Barra = 10 µm.

Na observação das extensões sanguíneas em sistema de imagem confocal (FIGURA 4), foi possível visualizar a autofluorescência do corante May-Grünwald-Giemsa em diferentes excitações e emissões de luz. Os eritrócitos foram revelados em verde (FIGURA 4C) e pequenas estruturas com ácido nucleico em azul (FIGURAS 4A e 4C). A imagem de DIC mostrou estruturas cocoides, medindo aproximadamente $0,4 \mu\text{m}$ de diâmetro (FIGURA 4B, setas), que correspondiam às imagens de ácido nucleico, como observado na sobreposição de imagens fluorescentes e DIC (FIGURA 4D e 5).

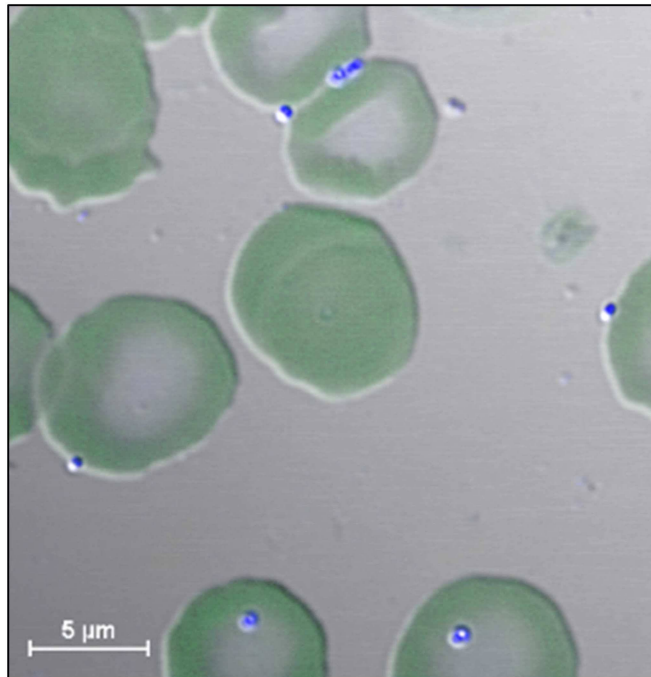
FIGURA 4 - IMAGEM CONFOCAL DA EXTENSÃO SANGUÍNEA DO QUATI FÊMEA



FONTE: O autor (2016).

NOTAS: Autofluorescência do corante May-Grünwald-Giemsa. A: Hemoplasmas observados mediante a autofluorescência do corante em azul. B: Imagem de contraste de interferência diferencial (DIC) mostrando estruturas cocoides de aproximadamente $0,4 \mu\text{m}$ de diâmetro (setas) ligadas aos eritrócitos. C: Imagem composta dos eritrócitos, detectados pela autofluorescência do corante em verde, e hemoplasmas, detectados em azul. D: Imagem composta das capturas fluorescentes e DIC. Barra = $5 \mu\text{m}$.

FIGURA 5 - HEMOPLASMAS ADERIDOS A HEMÁCIAS DE QUATI EM IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL

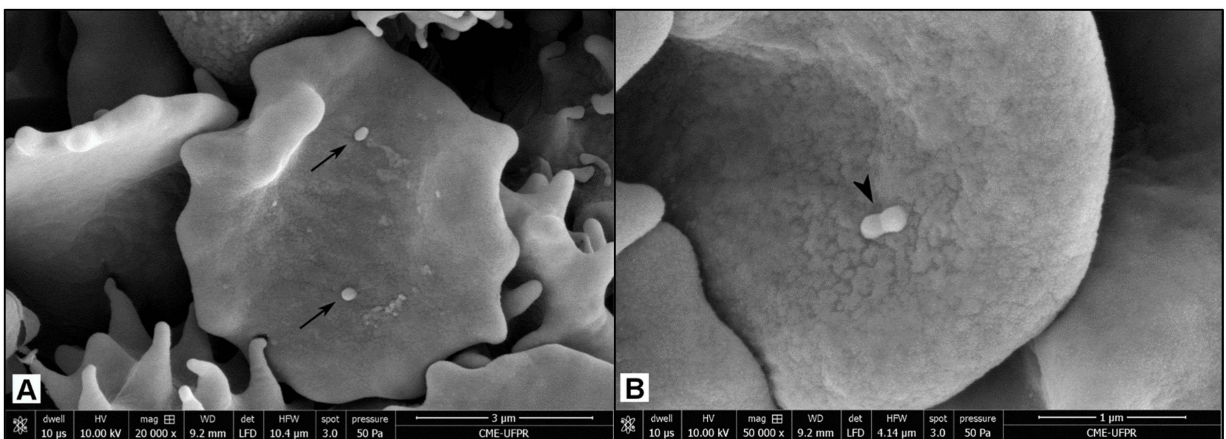


FONTE: O autor (2016).

NOTAS: Imagem da extensão sanguínea do quati fêmea, composta da autofluorescência do corante May-Grünwald-Giemsa e contraste de interferência diferencial (DIC). Hemoplasmas observados em azul, hemácias em verde. Barra = 5 μm .

As estruturas epicelulares também foram observadas na amostra de quati fêmea utilizando MEV. As estruturas possuíam diâmetro de 0,2-0,4 μm (FIGURA 6) e um organismo foi observado em provável fissão binária (FIGURA 6B).

FIGURA 6 - IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE AMOSTRA DE SANGUE DO QUATI FÊMEA.



FONTE: O autor (2016).

NOTAS: A: Estruturas de aproximadamente 0,3 μm de diâmetro ligadas à hemácia (setas). Barra = 3 μm . B: Um organismo possivelmente em fissão binária (ponta de seta). Barra = 1 μm .

Utilizando PCRq, ambos quatis apresentaram resultados positivos para *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) e 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' (CMT), com valores de Ct (*threshold cycle*) de 35,32 (Mhf) e 33,73 (CMT) para o quati fêmea e 30,52 (Mhf) e 39,56 (CMT) para o quati macho. As amostras foram negativas para todos os outros patógenos testados.

Os resultados também foram positivos para hemoplasma usando PCRc. O produto amplificado da amostra do quati fêmea foi sequenciado em ambas as direções, senso e antisenso, obtendo-se uma sequência consenso de 1.329 pb (GenBank KU554425). O produto amplificado da amostra do quati macho foi sequenciado com sucesso apenas na direção antisenso e gerou um fragmento de 488 pb (GenBank KU554426).

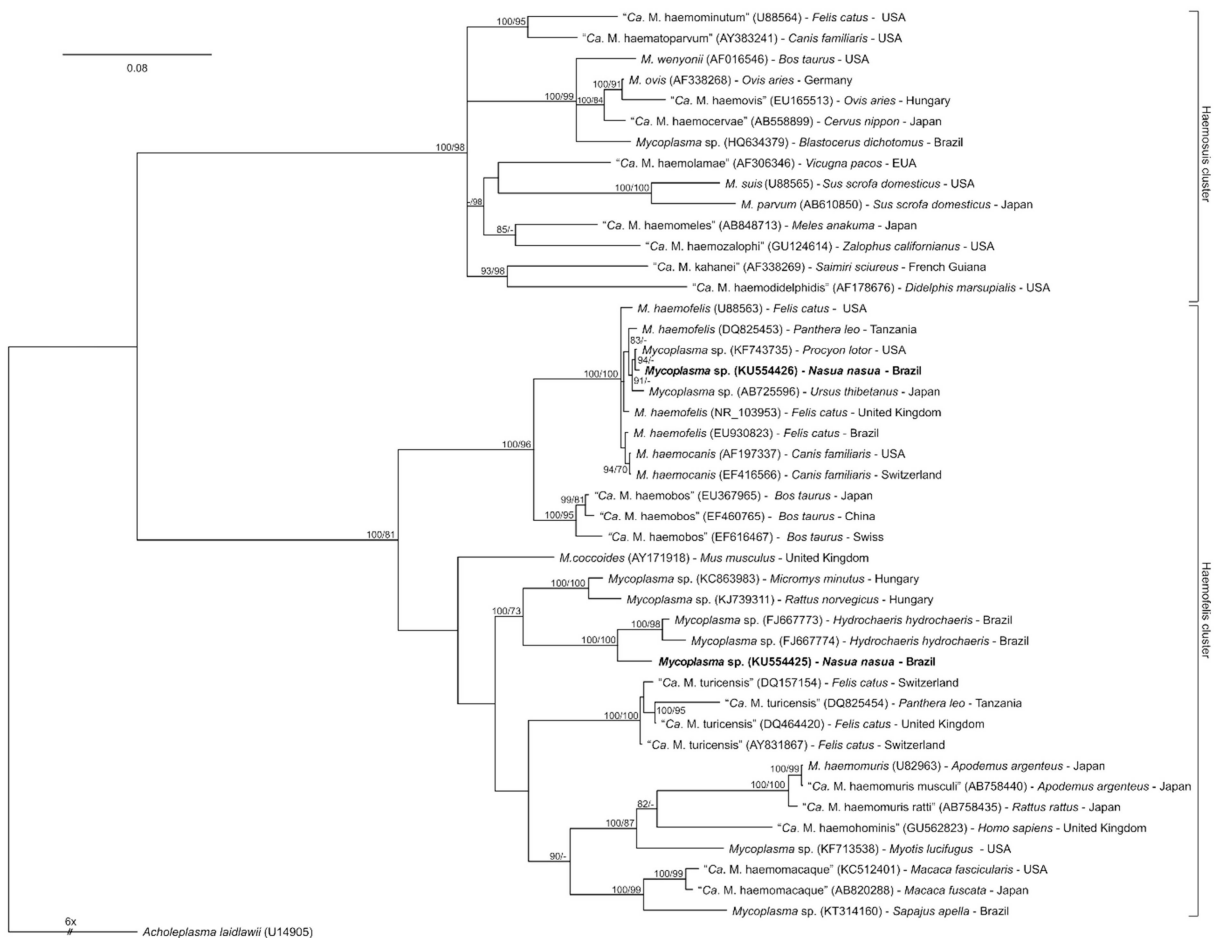
A sequência encontrada no sangue do quati fêmea (KU554425) apresentou 96,8% e 95,9% de identidade com sequências do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. encontradas no sangue de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (GenBank FJ667773 e FJ667774, respectivamente); 93,0% (GenBank KC863983) e 92,8% (GenBank KJ739311) de identidade com sequências do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. obtidos em sangue de roedores da Hungria (*Micromys minutus* e *Rattus norvegicus*, respectivamente); e 91,3% de identidade com sequência do gene 16S rRNA de CMT de um gato da Suíça (GenBank AY831867).

A sequência de 488 pb detectada no sangue do quati macho (KU554426) mostrou 100% de identidade com uma sequência do gene 16S rRNA de *Mycoplasma* sp. encontrada no sangue de guaxinins (*Procyon lotor*) dos Estados Unidos (GenBank KF743735) e 99,6% de identidade com uma sequência do gene 16S rRNA de Mhf detectada em um leão (*Panthera leo*) da Tanzânia (GenBank DQ825451). Um alto percentual de identidade (99%) também foi observado com muitas sequências do gene 16S rRNA de *M. haemofelis* amplificadas de gatos domésticos e outros felinos.

As relações filogenéticas entre as sequências detectadas nas amostras de sangue dos quatis e outros hemoplasmas previamente identificados são apresentadas na FIGURA 7. As árvores consenso obtidas utilizando os métodos BI e ML revelaram as mesmas relações filogenéticas entre os clados, com bom suporte. Ambas as sequências foram posicionadas no grupo haemofelis. A sequência KU554425 do quati fêmea formou um clado basal, bem suportado (BI = 100% e ML = 100%), às sequências de *Mycoplasma* spp. detectadas em capivaras do Brasil

(FJ667773 e FJ667774). A sequência KU554426 do quati macho foi inserido no clado *M. haemofelis* / *M. haemocanis*, espécies que tem o gene 16S rRNA muito semelhante (identidade >99%) (BIRKENHEUER et al., 2002), com valores de suporte BI e ML igual 100%.

FIGURA 7 - ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSENSO, 44 SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DE HEMOPLASMAS, MÉTODO INFERÊNCIA BAYESIANA



FONTE: O autor (2016).

NOTAS. Valores de suporte de probabilidade posterior BI/bootstrap ML $\geq 70\%$ estão indicados próximos aos nós. O nome das espécies, seu respectivo número de acesso no GenBank, hospedeiro e país de origem estão apresentados e as sequências detectadas nos quatis estão em negrito. Grupo externo: *Acholeplasma laidlawii* (GenBank U14905).

4 DISCUSSÃO

Hemoplasmas já foram detectados por métodos moleculares em várias espécies de primatas não humanos, incluindo ‘*Candidatus Mycoplasma kahanei*’ em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (NEIMARK et al., 2002a; BONATO et al., 2015); ‘*Candidatus Mycoplasma aoti*’ em macacos-da-noite (*Aotus trivirgatus*) (BARKER et al., 2011); ‘*Candidatus Mycoplasma haemomacaque*’ em macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (MAGGI et al., 2013c) e macacos japoneses (*Macaca fuscata*) (SASHIDA et al., 2014); e *Mycoplasma* sp. em macacos-prego (*Sapajus apella*) e saguis-una (*Saguinus midas niger*) (BONATO et al., 2015). No Brasil, *Mycoplasma* spp. foi detectado em bugio-preto (*Alouatta caraya*) (SANTOS et al., 2013), macacos-prego (*Sapajus* sp.) e em saguis-una (*Saguinus midas niger*) (BONATO et al., 2015). ‘*Ca. M. kahanei*’ também foi encontrado em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) do Brasil (BONATO et al., 2015).

No presente estudo, mais da metade dos bugios-pretos de cativeiro e de vida livre estavam infectados com *Mycoplasma* sp., relatado anteriormente em um único bugio-preto (SANTOS et al., 2013). O fato de haver muitas regiões homologas entre a sequência do novo *Mycoplasma* sp. e ‘*Ca. M. haemominutum*’ explica o resultado positivo para ‘*Ca. M. haemominutum*’ em bugios-pretos por PCRq, que provavelmente amplificou uma dessas regiões semelhantes. A espécie ‘*Ca. M. haemominutum*’ não foi detectada por PCRC. Todas as amostras classificadas como positivas por microscopia (8/40) foram positivas para hemoplasma na PCR, entretanto, como esperado, a PCR foi mais sensível (10/40).

Todos os bugios-pretos machos foram positivos para hemoplasma, independentemente de serem de vida livre ou de cativeiro. Estudos anteriores com gatos também mostraram que a infecção por hemoplasma estava associada ao sexo masculino, possivelmente devido à transmissão por interações agressivas entre os animais (TASKER et al., 2004; WILLI et al., 2006a; ROURA et al., 2010).

Todos os bugios-pretos de vida livre também tiveram resultado positivo para hemoplasma, contudo a predisposição à infecção não foi estatisticamente diferente entre bugios-pretos de vida livre e de cativeiro. Porém, ao agruparem-se as espécies e os indivíduos serem classificados conforme o seu local de nascimento, os PNH provenientes de vida livre foram mais susceptíveis a serem infectados por hemoplasma do que os PNH nascidos em cativeiro. A associação entre infecção por

hemoplasma e a procedência de vida livre foi relatada em um estudo com felídeos selvagens de três continentes (WILLI et al., 2007b) e com capivaras do Brasil (VIEIRA et al., 2009). Segundo Willi et al. (2007b), interações agressivas com outros animais e a maior exposição a vetores artrópodes podem explicar a causa pela qual animais de vida livre tem maior risco a infecção por hemoplasma quando comparados com animais em cativeiro. Já em outro estudo, realizado em um centro de pesquisa de primatas, ficou demonstrado que macacas nemestrinas (*Macaca nemestrina*) oriundas de vida livre eram mais afetadas por fatores de estresse que aquelas nascidas em cativeiro (CROCKETT; SHIMOJI; BOWDEN, 2000; HA; ROBINETTE; DAVIS, 2000). Para Cohen et al. (1992), o estresse crônico pode ter um papel importante na redução da resposta imune, o que pode explicar o aumento da susceptibilidade a infecções observado no presente estudo.

Referente aos parâmetros sanguíneos, PNH infectados apresentaram aumento da concentração de PPT. Além disso, a concentração média de PPT foi significativamente maior em bugios-pretos infectados do que em não infectados. De forma semelhante, a concentração de proteína sérica total estava aumentada em gatos da África do Sul infectados com '*Ca. M. turicensis*' (WILLI et al., 2006a). Segundo Harvey (2012), a elevação da concentração de PPT pode estar relacionada com um quadro crônico de infecção. A média dos valores de VCM, também estava significativamente mais elevada em bugios-pretos infectados quando comparados com bugios-pretos não infectados. Este fato também foi observado em gatos com teste positivo para '*Ca. M. haemominutum*' ou *M. haemofelis* e pode ser sugestivo de um processo regenerativo medular eritrocitário em resposta à hemólise promovida pelo hemoplasma (SYKES et al., 2008).

Outros parâmetros testados como Hem, Ht, Hb, Leu, HCM e CHCM, não apresentaram valores estatisticamente diferentes entre animais com resultados positivos e negativos para hemoplasma. Também não houve associação entre anemia e infecção. Entretanto, quatro bugios-pretos infectados com hemoplasma apresentaram número de hemácias reduzido, com Ht e Hb normais ou elevados, devido a uma possível macrocitose. Gatos infectados com '*Ca. M. turicensis*' apresentaram valores de Ht significativamente diminuídos somente quando coinfectados com '*Ca. M. haemominutum*' ou *M. haemofelis*, conforme estudo do Reino Unido, Austrália e África do Sul (WILLI et al., 2006a). Em pesquisa sobre hemoplasmose em macacos-de-cheiro infectados com '*Ca. M. kahanei*', alguns

animais desenvolveram anemia leve apenas ao serem submetidos à esplenectomia. Apesar da bacteremia significativa, esses macacos apresentaram apenas monocitose e eritrofagocitose, não manifestando outros sinais clínicos de doença. Alguns animais do grupo não desenvolveram anemia nem mesmo após esplenectomia (CONTAMIN; MICHEL, 1999; NEIMARK et al., 2002a). Em outro estudo, com macacos *Cynomolgus* de um centro de pesquisa infectados por ‘*Ca. M. haemomacaque*’, não foram observadas alterações hematológicas e bioquímicas nos animais (MAGGI et al., 2013c). A mesma espécie de hemoplasma foi encontrada em macacos japoneses selvagens aparentemente saudáveis, porém nesse trabalho não foram apresentados dados hematológicos ou bioquímicos (SASHIDA et al., 2014). Na presente pesquisa, observou-se uma diminuição da contagem de eritrócitos do macaco-prego infectado, não sendo possível, porém, relacioná-la com a infecção por hemoplasma. Em seres humanos, já foram identificadas as espécies *M. suis* (YUAN et al., 2009), *M. ovis* (SYKES et al., 2010; MAGGI et al., 2013b), ‘*Ca. M. haemohominis*’ (STEER et al., 2011) e ‘*Ca. M. haematoparvum*’ (MAGGI et al., 2013a, 2013b). A anemia hemolítica ocorreu apenas no caso de infecção por ‘*Ca. M. haemohominis*’, cujo paciente também apresentou pirexia e neutropenia (STEER et al., 2011). Dessa forma, em relação à anemia, algumas espécies de hemoplasma parecem não causá-la (WILLI et al., 2006a; WENGI et al., 2008; ROURA et al., 2010), provocando apenas uma infecção crônica subclínica, sendo aquela somente desencadeada na presença de coinfeções ou por um estado de imunossupressão (WILLI et al., 2006a, 2007a; BARKER; SYKES, 2010; TASKER, 2010; TASKER, 2013).

Relativo a infecções crônicas por hemoplasma, há relatos de que estas podem diminuir a eficiência reprodutiva de animais de produção, como suínos e bovinos (MESSICK, 2004). Nesse sentido, estudos devem ser realizados para investigar o impacto desses microrganismos na reprodução de animais silvestres, especialmente em relação a espécies ameaçadas. O estado de conservação mundial das espécies *Alouatta caraya* e *Sapajus nigritus*, segundo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), é descrito como pouco preocupante e quase ameaçada de extinção, respectivamente, e ambas as populações estão em declínio (FERNANDEZ-DUQUE; WALLACE; RYLANDS, 2008; KIERULFF; MENDES; RYLANDS, 2015). No Brasil, algumas espécies do gênero *Sapajus* e *Alouatta* são consideradas ameaçadas de extinção,

estando a espécie *Alouatta guariba guariba* em perigo crítico (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2014).

No presente estudo, nenhum dos saguis estava infectado com hemoplasma. Resultados negativos também foram observados na avaliação de amostras de nove saguis de um Centro de Triagem de Animais Selvagens do nordeste do Brasil (BONATO et al., 2015).

A dificuldade em se obter um bom resultado no sequenciamento da amostra do macaco-prego pode ter ocorrido devido a uma baixa carga bacteriana, uma vez que a intensidade da banda obtida com o PCRc era fraca. Macacos do mesmo gênero, *Sapajus apella*, capturados no nordeste do Brasil, estavam infectados com *Mycoplasma* sp., cujas sequências mostraram 95-97% de identidade com 'Ca. M. haemomacaque' (BONATO et al., 2015). Dados clínicos e laboratoriais desses animais não foram relatados pelos autores.

As estruturas das árvores geradas nas análises filogenéticas foram semelhantes à de outros trabalhos, no que se refere às relações entre as sequências 16S rRNA de hemoplasmas e de outros grupos de *Mycoplasma* já publicadas (JOHANSSON et al., 1999; NEIMARK et al., 2001; PETERS et al., 2008).

No caso do hemoplasma identificado em bugio-preto, ambas as árvores, seja a referente ao gênero *Mycoplasma* ou ao grupo haemosuis, exibiram uma separação evidente entre a sequência em estudo e 'Ca. M. kahanei', de macaco-de-cheiro. Além da visível distinção entre essas sequências na análise filogenética e de terem sido identificadas em diferentes hospedeiros, estes eram, inclusive, de diferentes localidades. A espécie 'Ca. M. kahanei' foi descrita em hospedeiro proveniente da região amazônica (JQ897388, AF338269, KT314166, KT314165) (NEIMARK et al., 2002a; BONATO et al., 2015), enquanto que o hemoplasma aqui relatado é originário de bugio-preto da região de mata atlântica do sul do Brasil.

Ainda referente à relação filogenética, no que concerne a hemoplasmas encontrados em PNH, as sequências de *Mycoplasma* sp. identificadas em bugio-preto e 'Ca. M. kahanei' estão localizadas no grupo haemosuis, enquanto que 'Ca. M. haemomacaque', detectada em *Macaca fuscata* (SASHIDA et al., 2014) e em *Macaca fascicularis* (MAGGI et al., 2013c); e *Mycoplasma* sp. detectado em *Sapajus apella* (BONATO et al., 2015), são membros do grupo haemofelis. Duas sequências de 'Ca. M. aoti' oriundas de macacos-da-noite (BARKER et al., 2011) disponíveis no GenBank não foram incluídas na análise filogenética devido ao seu comprimento

curto (100 pb e 70 pb) e a sequência 16S rRNA de hemoplasma detectado em *Saguinus midas niger* (BONATO et al., 2015) não estava disponível no GenBank para inclusão no estudo. O hemoplasma detectado em ser humano, 'Ca. M. haemohominis', (STEER et al., 2011) está localizado no grupo haemofelis.

O presente estudo também descreve por primeira vez evidências de infecção por hemoplasma em quatis da espécie *Nasua nasua* (Carnivora, Procyonidae). Em um estudo prévio, *Mycoplasma* sp. foi detectado em amostras de sangue de vinte quatis-de-nariz-branco (*Nasua narica*) da Costa Rica, cujo maior percentual de identidade (82,8%) se deu com *Mycoplasma haemolamae*, conforme relatado pelos autores (MEHRKENS et al., 2013). Infelizmente, a sequência do gene 16S rRNA não estava disponível na base de dados GenBank para comparação e inclusão na análise filogenética.

As análises das sequências do gene 16S rRNA mostraram duas espécies de hemoplasmas diferentes infectando os quatis do RBV.

Uma das sequências (KU554425), detectada no quati fêmea, mostrou maior semelhança com hemoplasmas encontrados em capivaras da mesma região (VIEIRA et al., 2009), apresentando 96,8% e 95,9% de identidade com as sequências encontradas (FJ667773 e FJ667774, respectivamente). Um percentual inferior a 97% de similaridade entre as sequências do gene 16S rRNA de duas bactérias sugere que as mesmas pertençam a diferentes espécies, porém faz-se necessária uma caracterização adicional utilizando sequências menos conservadas para confirmar esta hipótese, como por exemplo os genes *rpoB*, 23S rRNA e sequência ITS (DRANCOURT; RAOULT, 2005). O resultado da análise filogenética confirmou a estreita relação do hemoplasma identificado no quati fêmea com os hemoplasmas detectados em capivaras. Ademais, o posicionamento das sequências em clados diferentes da árvore filogenética corrobora com a hipótese de diferenciação das espécies.

Apesar de quatis e capivaras pertencerem a diferentes ordens (Carnivora e Rodentia, respectivamente) e diferirem em suas ecologias e comportamento, estes animais podem estar expostos aos mesmos vetores, por habitarem a mesma região. Quanto à anemia, algumas das capivaras infectadas com hemoplasma apresentavam essa condição (VIEIRA et al., 2009), enquanto que o quati fêmea não mostrou sinais clínicos de doença e seu valor de Ht estava normal.

A segunda sequência, obtida da amostra do quati macho (GenBank

KU554426), revelou 100% de identidade com *Mycoplasma* sp. encontrado em sangue de guaxinins da América do Norte, também membros da família Procyonidae, como os quatis. A sequência apresentou identidade acima de 99% com diversas sequências do gene 16S rRNA de Mhf depositadas no GenBank. As amostras de ambos os quatis tiveram resultado positivo para Mhf no PCRq. Contudo, no sequenciamento, Mhf foi obtido apenas na amostra do quati macho. Análises de genes adicionais poderiam revelar se o hemoplasma encontrado no quati macho de fato seria Mhf ou outra espécie semelhante, como é o caso de Mhf e *Mycoplasma haemocanis*, os quais possuem o gene 16S rRNA idênticos, porém diferem na sequência do gene RNase P, na morfologia e nas espécies hospedeiras (BIRKENHEUER et al., 2002).

Frequentemente associada à anemia hemolítica, a espécie *Mycoplasma haemofelis* é considerada, dentre os hemoplasmas, a mais patogênica para gatos (SYKES, 2010; TASKER, 2010). Esse quadro não foi observado no quati macho, cujo Ht estava normal e não apresentava sinais clínicos de anemia. A infecção por Mhf já foi relatada também em uma pessoa HIV positivo que apresentava vários arranhões e mordidas de gatos e cujos animais também eram positivos para Mhf (DOS SANTOS et al., 2008). Dessa forma, suspeita-se que Mhf possa ter um maior potencial zoonótico por ser um patógeno com menor especificidade de hospedeiro.

Os quatis são mamíferos onívoros, sociáveis e amplamente distribuídos na América do Sul (GOMPPER; DECKER, 1998). Esses animais têm hábitos que favorecem sua exposição a carrapatos, tais como, a busca por alimentos em comedouros e lixeiras junto com outros animais; a procura de carrapatos no corpo de outros mamíferos; e a prática de escavar o solo em busca de presas (SAZIMA, 2010), o que aumenta a probabilidade de infecções transmitidas por esses vetores. De fato, patógenos transmitidos por vetores já foram relatados em quatis das espécies *Nasua nasua* (LAINSON et al., 1989; RODRIGUES; DAEMON; MASSARD, 2007; HERRERA et al., 2008; ALVES et al., 2011) e *Nasua narica* (MEHRKENS et al., 2013), incluindo *Trypanosoma cruzi*, do qual são um importante reservatório (HERRERA et al., 2008). Por circularem por ambientes peridomiciliares e apresentarem comportamento sinantrópico e destemido em relação a seres humanos e a animais domésticos (BITTNER et al., 2010; MEHRKENS et al., 2013), o contato com esses animais é frequente, podendo ocorrer inclusive casos de ataque a pessoas (BITTNER et al., 2010). Este fato é preocupante para a saúde

pública, pois os quatis podem atuar como potenciais reservatórios para vetores e patógenos.

A transmissão dos hemoplasmas pode ocorrer através do contato agressivo entre animais, além da via indireta, por meio de vetores artrópodes (WILLI et al., 2007c; LAPPIN et al., 2008; MUSEUX et al., 2009). Considerando o convívio de quatis com outros animais selvagens e domésticos, e a ocorrência de eventuais contatos com seres humanos (HERRERA et al., 2008; BITTNER et al., 2010; MEHRKENS et al., 2013), sugere-se a investigação de seu papel na transmissão de hemoplasmas. No Refúgio Biológico de Bela Vista, local da amostragem, já foram vistos gatos domésticos provenientes de casas e propriedades agrícolas próximas. Por tratar-se de parte integrante de um corredor de biodiversidade, felinos selvagens regionais, quatis, capivaras, cervídeos e outros animais de vida livre também já foram observados em áreas próximas. Esse ambiente, associado à presença de vetores, pode facilitar a infecção e transmissão entre espécies.

Os quatis analisados no estudo apresentaram resultados negativos para todos os outros patógenos transmitidos por vetores testados no PCRq e embora CMt tenha sido detectado em ambos quatis utilizando PCRq, a presença dessa espécie não pôde ser confirmada pelo PCRC e sequenciamento.

Mediante a utilização de três técnicas diferentes de microscopia (microscopia de luz convencional, microscopia confocal e MEV) foram observadas, nas amostras de sangue dos quatis, pequenas estruturas cocoides aderidas à superfície dos eritrócitos, como descrito anteriormente para outras espécies de hemoplasma (MAEDE; SONODA, 1975; FOLEY; PEDERSEN, 2001; NEIMARK et al., 2002a; SYKES et al., 2005; WILLI et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2014). Na amostra do quati fêmea, as estruturas epieritrocíticas se assemelharam a hemoplasmas de tamanho menor como '*Ca. M. haemominutum*' (FOLEY; PEDERSEN, 2001; WILLI et al., 2011), CMt (WILLI et al., 2011), '*Ca. M. haematoparvum*' (SYKES et al., 2005) e '*Ca. M. kahanei*' (NEIMARK et al., 2002a), conforme observado nas imagens de confocal e de MEV. A utilização da microscopia confocal e eletrônica possibilita uma melhor compreensão das relações patógeno-hospedeiro, pois fornecem maiores detalhes morfológicos e morfométricos quando comparados com a microscopia de luz (NEIMARK et al., 2002a; GROEBEL et al., 2009; WILLI et al., 2011; DO NASCIMENTO et al., 2014).

Em relação ao método de identificação dos hemoplasmas, o gene 16S rRNA

tem sido o marcador molecular mais utilizado (NEIMARK; KOCAN, 1997; RIKIHISA et al., 1997; NEIMARK et al., 2001, 2002a), mas outros genes menos conservados podem esclarecer e auxiliar na caracterização molecular e taxonômica dos mesmos (TASKER et al., 2003; DRANCOURT; RAOULT, 2005; PETERS et al., 2008; HICKS et al., 2014). Contudo, poucas espécies de micoplasma possuem outras sequências disponíveis em bancos de dados de nucleotídeos, como o GenBank, para serem utilizadas na filogenia. Além disso, o crescente acesso a técnicas moleculares e de sequenciamento de DNA, associado à falta de treinamento para análise dos resultados, favorecem o depósito de sequências incorretas e conclusões errôneas (LAL; LAL, 2011), o que demonstra a necessidade de revisão deste grupo, tão ubíquo.

As análises realizadas mostraram a presença de diferentes espécies de hemoplasmas em animais que compartilhavam o mesmo ambiente, apesar de terem hábitos diferentes. Dessa forma, além da necessidade de métodos de diagnósticos padronizados, é imprescindível o estudo das formas de transmissão dos hemoplasmas para que mecanismos de prevenção possam ser estabelecidos.

Como infecções crônicas por hemoplasmas podem ter alguma relação com a diminuição da eficiência reprodutiva em alguns animais (MESSICK, 2004), é importante investigar também o impacto desses microrganismos para animais silvestres em refúgios, reservas ecológicas e criadouro de animais selvagens, especialmente aquelas espécies consideradas vulneráveis ou em risco de extinção. Além disso, deve-se considerar o potencial risco de transmissão entre diferentes espécies de animais silvestres, domésticos e para seres humanos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, verificou-se a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em mamíferos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu destacando-se os seguintes resultados:

- a) Mediante a utilização de técnicas moleculares e de microscopia foram encontradas evidências de infecção por micoplasmas hemotrópicos em bugio-preto (*Alouatta caraya*), macaco-prego (*Sapajus nigritus*) e quati (*Nasua nasua*);
- b) Nenhum animal apresentou resultado positivo para os outros microrganismos testados (*Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii* e *Bartonella* spp.);
- c) Dos PNH avaliados, a espécie bugio-preto (*Alouatta caraya*) foi a mais propensa a apresentar resultado positivo para hemoplasma, com maior incidência nos machos e nos animais provenientes de vida livre;
- d) Em PNH, a infecção por hemoplasma não estava associada com anemia, mas sim com valores aumentados de proteína plasmática total e volume corpuscular médio;
- e) Os saguis apresentaram resultados negativos para todos os patógenos testados;
- f) Os quatis infectados estavam sadios e não apresentaram alterações nos valores de hematócrito;
- g) A espécie de hemoplasma encontrada em bugio-preto (*Alouatta caraya*) pertence ao grupo haemosuis e apresentou maior identidade com a espécie 'Ca. *M. kahanei*', pela análise do gene 16S rRNA, sendo uma provável nova espécie;
- h) Duas espécies foram identificadas nos quatis (*Nasua nasua*), *Mycoplasma haemofelis* e uma possível nova espécie de hemoplasma, ambas pertencentes ao grupo haemofelis.

Os resultados do estudo foram apresentados em dois artigos publicados no periódico internacional *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious*

Diseases, ISSN: 0147-9571 (ANEXO 2 e 3).

As conclusões deste trabalho não representam a opinião da Usina Hidrelétrica de Itaipu.

REFERÊNCIAS

- ALMOSNY, N. R. P.; DOS SANTOS, L. C. Laboratory Support in Wild Animal Medicine. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. (Eds.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 500–505.
- ALVES, F. M. et al. Modulating variables of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* transmission in free-ranging coati (*Nasua nasua*) from the Brazilian Pantanal region. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 835–841, jul. 2011.
- ANDRÉ, M. R. et al. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017–1023, jul. 2010.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.
- BARKER, E. N. et al. A novel haemoplasma species identified in archived primate blood smears. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3–4, p. 478–481, 2011.
- BARKER, E.; TASKER, S. Haemoplasmas: lessons learnt from cats. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. March 2015, p. 184–192, 2013.
- BAZINET, A. L.; ZWICKL, D. J.; CUMMINGS, M. P. A gateway for phylogenetic analysis powered by grid computing featuring GARLI 2.0. **Systematic biology**, v. 63, n. 5, p. 812–818, set. 2014.
- BIONDO, A. W. et al. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 1–7, 2009.
- BIRKENHEUER, A. J. et al. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 10, p. 1385–1388, 2002.
- BITTNER, G. C. et al. Coati (*Nasua nasua*) attacks on humans: case report. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 21, n. 4, p. 349–352, 2010.
- BONATO, L. et al. Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 42, p. 15–20, 2015.
- COHEN, S. et al. Chronic social stress, affiliation, and cellular immune response in nonhuman primates. **American Psychological Society**, v. 3, n. 5, p. 301–304, 1992.
- CONGBIN, Y. et al. Overexpression of complement receptor type I (CR1, CD35) on erythrocytes in patients with hemoplasma infection. **Microbiology and Immunology**,

v. 54, n. 8, p. 460–465, ago. 2010.

CONTAMIN, H.; MICHEL, J. C. Haemobartonellosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): antagonism between *Haemobartonella* sp. and experimental *Plasmodium falciparum* malaria. **Experimental parasitology**, v. 91, n. 4, p. 297–305, 1999.

CROCKETT, C. M.; SHIMOJI, M.; BOWDEN, D. M. Behavior, appetite, and urinary cortisol responses by adult female pigtailed macaques to cage size, cage level, room change, and ketamine sedation. **American Journal of Primatology**, v. 52, n. 2, p. 63–80, 2000.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DE THOISY, B. et al. A survey of hemoparasite infections in free-ranging mammals and reptiles in French Guiana. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 5, p. 1035–1040, 2000.

DO NASCIMENTO, N. C. et al. Microscopy and genomic analysis of *Mycoplasma parvum* strain Indiana. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 1–11, 2014.

DOS SANTOS, A. P. et al. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 12, p. 1922–1924, dez. 2008.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4311–4315, 2005.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 1 out. 2010.

FERNANDEZ-DUQUE, E.; WALLACE, R. B.; RYLANDS, A. B. *Alouatta caraya*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2008**: e.T41545A10496784. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/iucn.uk.2008.rlts.t41545a10496784.en>>. Acesso em: 6 nov. 2016.

FLAIBAN, K. K. M. C. et al. Valores hematológicos de bugios pretos (*Alouatta caraya*) de vida livre da região do Alto Rio Paraná, sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 628–634, jun. 2008.

FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N. C. “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, a low virulence epierthrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 815–817, 2001.

GOMPPER, M. E.; DECKER, D. M. *Nasua nasua*. **Mammalian Species**, v. 580, p. 1–9, 1998.

GRAZZIOTIN, A.L. et al. *Mycoplasma ovis* in captive cervids: prevalence, molecular characterization and phylogeny. **Veterinary Microbiology**, n.152, p.415-419, 2011.

GROEBEL, K. et al. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 576–584, 2009.

GUIMARÃES, A.M.S. **Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu**. 129f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HA, J. C.; ROBINETTE, R. L.; DAVIS, A. Survival and reproduction in the first two years following a large-scale primate colony move and social reorganization. **American Journal of Primatology**, v. 50, n. 2, p. 131–138, 2000.

HARVEY, J. W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. 1. ed. Missouri: Elsevier, 2012.

HERRERA, H. M. et al. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1133–1139, 2008.

HICKS, C.A. et al. Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: new insights into haemoplasma taxonomy. **Infection, Genetics and Evolution**, v.23, p. 99-105, Apr. 2014.

HOELZLE, L. E. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3–4, p. 215–226, ago. 2008.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HU, Z. et al. Outbreaks of hemotrophic mycoplasma infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1139–1140, jul. 2009.

HULME-MOIR, K. L. et al. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 4, p. 582–587, 1 jul. 2010.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Lista de Espécies Ameaçadas, 2014**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/lista-de-especies?start=350>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

ISHAK, A. M. et al. Marbofloxacin for the treatment of experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 288–292, 2008.

ITAIPIU BINACIONAL. **Refúgio Biológico Bela Vista**. Foz do Iguaçu, PR, 2011a. Folder.

ITAIPU BINACIONAL. **Relatório de sustentabilidade 2010**. Disponível em: <http://www.itaipu.gov.br/sites/default/files/2010_relatorio_sustentabilidade.pdf>. Acesso em: 15 out. 2011b.

ITAIPU BINACIONAL. **Reservas e refúgios**. Criado em: 05 abril 2010. Disponível em: <<http://www.itaipu.gov.br/meioambiente/reservas-e-refugios>>. Acesso em: 25 set. 2011c.

ITAIPU BINACIONAL. **Conservação da fauna silvestre *ex situ***. Foz do Iguaçu, PR, 2016. Relatório técnico.

JENSEN, W. A. et al. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 604–608, 2001.

JOHANSSON, K. E. et al. *Mycoplasma caviopharyngis* and *Mycoplasma fastidiosum*, the closest relatives to *Eperythrozoon* spp. and *Haemobartonella* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 174, n. 2, p. 321–326, 1999.

KARNOVSKY, M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 27, n. 15, p. 137, 1965.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; RYLANDS, A. B. *Sapajus nigritus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**: e.T136717A70614145. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-1.RLTS.T136717A70614145.en>>. Acesso em: 6 nov. 2016.

LABATE, A. S.; NUNES, A. L. V.; GOMES, M. DA S. Order Carnivora, Family Procyonidae (Raccoons, Kinkajous). In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Ames: Iowa State University Press, 2001. p. 317–322.

LAINSON, R. et al. *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 64, n. 3, p. 200–207, 1989.

LAL, D.; LAL, R. Wrong sequences in databases: whose fault??. **Indian Journal of Microbiology**, v.51, n.3, p. 413, 2011.

LAPPIN, M. R. et al. Detection of hemoplasma DNA on the gingiva and claw beds of naturally exposed cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 3, p. 779, 2008.

MAEDE, Y.; SONODA, M. Studies on feline haemobartonellosis. III. Scanning electron microscopy of *Haemobartonella felis*. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 37, n. 2, p. 209–211, 1975.

- MAGGI, R. G. et al. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, n.1, p.103, 2013a.
- MAGGI, R. G. et al. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animal contact. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3237–3241, 2013b.
- MAGGI, R. G. et al. “*Candidatus mycoplasma haemomacaque*” and *Bartonella quintana* bacteremia in cynomolgus monkeys. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1408–1411, 2013c.
- MEHRKENS, L. R. et al. White-nosed coatis (*Nasua narica*) are a potential reservoir of *Trypanosoma cruzi* and other potentially zoonotic pathogens in Monteverde, Costa Rica. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 4, p. 1014–1018, out. 2013.
- MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2–13, mar. 2004.
- MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. **International journal of systematic bacteriology**, v. 45, n. 1, p. 186–7, jan. 1995.
- MUSEUX, K. et al. In vivo transmission studies of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” in the domestic cat. **Veterinary research**, v. 40, n. 5, p. 45, 2009.
- NEIMARK, H. et al. 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 My.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 891–899, maio 2001.
- NEIMARK, H. et al. The putative haemobartonella that influences *Plasmodium falciparum* parasitaemia in squirrel monkeys is a haemotrophic mycoplasma. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 7, p. 693–698, 2002a.
- NEIMARK, H. et al. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. Pt 2, p. 683, 1 mar. 2002b.
- NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. Pt 2, p. 365–71, 1 mar. 2004.
- NEIMARK, H.; KOCAN, K. M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. **FEMS microbiology letters**, v. 156, n. 2, p. 287–91, 15 nov. 1997.

NOVACCO, M. et al. Chronic “*Candidatus mycoplasma turicensis*” infection. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 59, 2011.

PETERS, I. R. et al. RNase P RNA gene (*rnpB*) phylogeny of hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1873–1877, 2008.

PITULLE, C. et al. Novel bacterium isolated from a lung transplant patient with cystic fibrosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3851–3855, 1999.

REAGAN, K. L. et al. Assessment of the ability of *Aedes* species mosquitoes to transmit feline *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”. **Journal of feline medicine and surgery**, p. 1–5, 14 jul. 2016.

RIKIHISA, Y. et al. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823–9, abr. 1997.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E.; MASSARD, C. L. Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procionid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). **Parasitology Research**, v. 100, n. 2, p. 347–350, 2007.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

ROURA, X. et al. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 2, p. 270–4, mar. 2010.

SANTOS, L. C. **Laboratório ambiental**. 2. ed. Cascavel: Edunioeste, 2011.

SANTOS, L. C. et al. Hemotropic mycoplasma in a free-ranging black howler monkey (*Alouatta caraya*) in Brazil. **Journal of wildlife diseases**, v. 49, n. 3, p. 728–731, 2013.

SASHIDA, H. et al. Molecular demonstration of hemotropic mycoplasmas in wild Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 1, p. 97–101, 2014.

SAZIMA, I. What coatis and mongooses have in common? **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 457–461, 2010.

STEER, J. A. et al. A novel hemotropic mycoplasma (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 11, p. 147–151, 2011.

SYKES, J. E. et al. “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”, a novel small

haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 27–30, 2005.

SYKES, J. E. et al. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 4, p. 685–693, 2007.

SYKES, J. E. et al. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 3, p. 372–379, 2008.

SYKES, J. E. et al. Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3782–3785, 2010.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 62–69, fev. 2010.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 1 dez. 2013.

TASKER, S. et al. Phylogenetic analysis of hemoplasma species: an international study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3877–3880. Aug. 2003.

TASKER, S. et al. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 6, p. 345–354, 2004.

TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of feline medicine and surgery**, v. 12, n. 5, p. 369–381, maio 2010.

TASKER, S. et al. Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 1285–1292, 1 nov. 2010.

TAVARÉ, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. **Lectures on Mathematics in the Life Sciences**, v. 17, p. 57–86, 1986.

VIEIRA, R. F. C. et al. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 3–4, p. 410–413, 2009.

WENGI, N. et al. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1–3, p. 132–141, 2008.

WILLI, B. et al. Phylogenetic analysis of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4430–4435, 2006a.

WILLI, B. et al. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 961–969, 1 mar. 2006b.

WILLI, B. et al. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, v. 125, n. 3–4, p. 197–209, 2007a.

WILLI, B. et al. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159–1166, 2007b.

WILLI, B. et al. Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3798–3802, 2007c.

WILLI, B. et al. First morphological characterization of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” using electron microscopy. **Veterinary microbiology**, v. 149, n. 3–4, p. 367–373, maio 2011.

YUAN, C. L. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 7, p. 890–894, jul. 2009.

ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of computational biology**, v. 7, n. 1–2, p. 203–14, 2000.

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 047/2014, referente ao projeto “Detecção e caracterização de hemoparasitas em mamíferos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu”, sob a responsabilidade de Michelle Pires Cubilla, na forma em que foi apresentado (utilização de amostras de banco de sangue de 141 mamíferos selvagens), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 05 de Setembro de 2014.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 047/2014, regarding the project “Detection and molecular characterization of hemoparasites in mammals from the preservation area of Itaipu Hydroelectric Power Plant”, under Michelle Pires Cubilla’s supervision, in the terms it was presented (use of previously collected blood samples of 141 wild mammals), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of Paraná, Brazil) during session on September 5th, 2014.

Curitiba, 20 de Setembro de 2014.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.

Ricardo Guilherme D’Otaviano de Castro Vilani
Presidente CEUA-SCA

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Ananda Portella Félix'.

Ananda Portella Félix
Vice-Presidente CEUA-SCA

ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 52 (2017) 6–13



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology
and Infectious Diseasesjournal homepage: www.elsevier.com/locate/cimidOccurrence of hemotropic mycoplasmas in non-human primates (*Alouatta caraya*, *Sapajus nigritus* and *Callithrix jacchus*) of southern Brazil

Michelle P. Cubilla^{a,b,*}, Leonilda C. Santos^c, Wanderlei de Moraes^{b,c}, Zalmir S. Cubas^b,
Christian M. Leutenegger^d, Marko Estrada^d, Rafael F.C. Vieira^c, Maurilio J. Soares^e,
LeAnn L. Lindsay^f, Jane E. Sykes^f, Alexander W. Biondo^{a,c}

^a Department of Cell and Molecular Biology, Universidade Federal do Paraná, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, s/n., Curitiba, PR 81531-980, Brazil

^b Bela Vista Biological Sanctuary, Itaipu Binacional, R. Teresina, 62, Foz do Iguaçu, PR 85866-900, Brazil

^c Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Paraná, R. dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil

^d IDEXX Laboratories Inc., 2825 KOVR Drive, West Sacramento, CA 95605, USA

^e Laboratory of Cell Biology, Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba PR, 81350-010, Brazil

^f Department of Medicine & Epidemiology, School of Veterinary Medicine, University of California, 2108 Tupper Hall, Davis, CA 95616, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Hemoplasma
Vector-borne disease
Wild mammal
Monkey

ABSTRACT

Hemoplasmas, the erythrocyte-associated mycoplasmas, have been detected in several primates, causing mostly subclinical infection. This study aimed to determine the prevalence of hemoplasma infection in captive and free-ranging monkeys from southern Brazil, as well as factors and hematological abnormalities associated with infection. Blood samples from 40 non-human primates (NHP) were tested for hemoplasmas and coinfections. An overall of 10/40 (25.0%) NHP tested positive for hemoplasmas using PCR-based assays, including 9/14 (64.3%) black howler monkeys (*Alouatta caraya*) and 1/24 (4.2%) black-horned capuchin (*Sapajus nigritus*). Infection was not statistically associated with anemia, but wild-born monkeys and male black howler monkeys were more likely to be positive when compared with captive-born animals and female black howler monkeys, respectively. The sequences from the black howler monkey hemoplasma were similar (94% identity) to the squirrel monkey hemoplasma (“*Candidatus Mycoplasma kahanei*”) and were phylogenetically located in a different cluster when compared to the human hemoplasma (“*Candidatus Mycoplasma haemohominis*”).

ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 53 (2017) 19–25



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology
and Infectious Diseasesjournal homepage: www.elsevier.com/locate/cimidMicroscopic and molecular identification of hemotropic mycoplasmas in
South American coatis (*Nasua nasua*)

Michelle P. Cubilla^{a,b,*}, Leonilda C. Santos^c, Wanderlei de Moraes^{b,c}, Zalmir S. Cubas^b,
Christian M. Leutenegger^d, Marko Estrada^d, LeAnn L. Lindsay^e, Edvaldo S. Trindade^a,
Célia Regina C. Franco^a, Rafael F.C. Vieira^c, Alexander W. Biondo^{a,c}, Jane E. Sykes^e

^a Department of Cell and Molecular Biology, Universidade Federal do Paraná, Av. Cel. Francisco H. dos Santos, s/n., Curitiba, PR 81531-980, Brazil

^b Bela Vista Biological Sanctuary, Itaipu Binacional, R. Teresina, 62, Foz do Iguaçu, PR 85866-900, Brazil

^c Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Paraná, R. dos Funcionários, 1540, Curitiba, PR 80035-050, Brazil

^d IDEXX Laboratories Inc., 2825 KOVR Drive, West Sacramento, CA 95605, USA

^e Department of Medicine & Epidemiology, School of Veterinary Medicine, University of California, 2108 Tupper Hall, Davis, CA 95616, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Hemoplasma
Vector-borne disease
Wild mammal
Mycoplasma haemofelis

ABSTRACT

Hemoplasmas were detected in two apparently healthy captive South American coatis (*Nasua nasua*) from southern Brazil during an investigation for vector-borne pathogens. Blood was subjected to packed cell volume (PCV) determination, a commercial real-time PCR panel for the detection of *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp., *Hepatozoon* spp., *Leishmania* spp., *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia rickettsii* and *Leptospira* spp., and a pan-hemoplasma conventional PCR assay. PCV was normal, but both coatis tested positive for hemoplasmas and negative for all the remaining pathogens tested. Using different techniques for microscopy (light, confocal or SEM), structures compatible with hemoplasmas were identified. Sequencing of the 16S rRNA gene identified an organism resembling *Mycoplasma haemofelis* and another hemotropic *Mycoplasma* sp., with a sequence identity of 96.8% to a *Mycoplasma* sp. previously detected in capybaras.