

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA CAROLINA MEIRA COLLERE

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOPLASMAS E
PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM QUATIS-DE-
CAUDA-ANELADA (*NASUA NASUA*) DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU,
FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ

CURITIBA

2022

FLÁVIA CAROLINA MEIRA COLLERE

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOPLASMAS E
PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM QUATIS-DE-
CAUDA-ANELADA (*NASUA NASUA*) DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU,
FOZ DO IGUAÇU, PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Rafael F. C. Vieira

Coorientadora: Dra. Thállitha S. W. J. Vieira

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA

Collere, Flávia Carolina Meira

Detecção e caracterização molecular de hemoplasmas e patógenos transmitidos por carrapatos em quatis-de-cauda-anelada (*Nasua nasua*) do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, Paraná. / Flávia Carolina Meira Collere. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Rafael F. C. Vieira.

Coorientadora: Dra. Thállitha S. W. J. Vieira.

Bibliotecário: Fernando Cavalcanti Moreira CRB-9/1665



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de FLAVIA CAROLINA MEIRA COLLERE intitulada: *Deteção e caracterização molecular de hemoplasmas e patógenos transmitidos por carrapatos em quatis-de-cauda-anelada (Nasua nasua) do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, Paraná, sob orientação do Prof. Dr. RAFAEL FELIPE DA COSTA VIEIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.*

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as Indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica

13/04/2022 15:52:33.0

RAFAEL FELIPE DA COSTA VIEIRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

28/03/2022 11:05:04.0

ROGERIO RIBAS LANGE

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/03/2022 14:43:26.0

LUIZ DANIEL DE BARROS

Avallador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Dedico este trabalho à Deus, que em sua infinita
bondade e sabedoria, tornou-o possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que por intercessão de Nossa Senhora, guia meus passos, acalma minha mente e me dá forças quando tudo parece difícil.

Aos meus pais, Edionete e Alcir Collere, por me incentivarem a estudar, dispondo das mais variadas ferramentas para que eu alcançasse este objetivo, e ao meu avô, Leopoldo Meira, por nos ensinar que a única herança a ser deixada aos filhos é o estudo.

À minha irmã Giovanna, por defender meu sonho, me desafiar a ser uma pessoa melhor e a sempre sair da minha zona de conforto. E ao meu noivo, Marcelo, por ser meu melhor amigo e confidente, pelo incentivo em todas as decisões, pelo apoio em cada momento difícil e pela vibração a cada conquista.

Ao meu orientador, Prof. Rafael Vieira e coorientadora, Dra. Thállitha Vieira, por serem pessoas extraordinárias. Não somente por todos os ensinamentos, mas principalmente por acreditarem na minha capacidade e me impulsionarem nessa jornada, quando eu mesma não acreditava que era capaz, por sempre colocarem a saúde mental à frente da produção, pelos elogios (às vezes exagerados) e pelos inúmeros conselhos profissionais e pessoais. São um exemplo de casal, pais e orientadores, e sou muito grata à Deus por cruzar nossos caminhos.

Aos meus colegas do Laboratório de Doenças Transmitidas por Vetores, especialmente à Larissa Ferrari e Monica Kakimori, que compartilharam o aprendizado, conquistas e muitos erros, sempre deixando a vida mais leve, seja com conselhos, risadas ou doces. Também agradeço às alunas de iniciação científica, que confirmaram meu gosto pela educação.

À técnica de laboratório Kelly Barba (*in memorian*) e ao meu sogro Sergio Ribas (*in memorian*) por sempre me incentivarem e acompanharem o início deste sonho. O tempo de Deus é perfeito, mas para nós, misterioso. Sei que de onde estiverem, estão orgulhosos de ver onde cheguei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro que permitiu o desenvolvimento deste projeto.

Aos quatis utilizados neste projeto e ao periódico *Transboundary and Emerging Diseases*, pela publicação deste artigo em um momento muito difícil, o que reuniu minhas forças para seguir em frente e produzir ainda mais.

Por fim, agradeço a mim, por insistir no caminho, pela resiliência nas dificuldades, por ser minha maior crítica e pela perseverança. Muitas vezes pensei que não seria capaz de chegar onde cheguei, ou de realizar as coisas que realizei, mas desistir nunca foi opção.

O grau de comprometimento
determina o sucesso.

- R. J. Lupin

RESUMO

As unidades de conservação ambiental são porções de terra que abrigam fauna e flora nativa, protegidas por lei, essenciais para a conservação da biodiversidade, recursos naturais, macro e micro ecossistemas e de espécies raras e ameaçadas de extinção. A APA mais importante de conservação da Mata Atlântica é o Parque Nacional do Iguaçu (PNI), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, que faz fronteira com Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. Os mamíferos terrestres mais vistos no PNI são os quatis-de-cauda-anelada (*Nasua nasua* Linneaus, 1976) que estão em constante contato com os turistas pedindo e/ou roubando alimentos dos visitantes. Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias intracelulares obrigatórias, não cultiváveis in vitro e sem parede celular que parasitam a superfície dos eritrócitos de uma grande variedade de mamíferos. Em quatis, uma potencial nova espécie de hemoplasma foi descrita infectando animais das regiões centro-oeste e sul do Brasil. Portanto, os objetivos deste estudo foram investigar a ocorrência de *Mycoplasma* sp. e patógenos transmitidos por carrapatos em quatis do PNI. Amostras de sangue foram coletadas de 18 quatis e submetidas a análises moleculares por ensaios de PCR convencional (cPCR) para *Mycoplasma* sp. (rRNA16S e 23S), *Theileria/Babesia* spp. (18S rRNA) e *Ehrlichia/Anaplasma* sp. (16S rRNA, *sodB*, *dsb* e *groEL*). Oito de 18 (44,44%; IC 95%: 24,56%–66,28%) animais foram positivos para *Mycoplasma* spp. Todos os quatis de cauda anelada testaram negativo para *Theileria/Babesia* spp. e apenas um dos 18 (5,56%; IC 95%:0,99%–25,76%) animais testou positivo para *Ehrlichia/Anaplasma* spp. pelo 16S rRNA cPCR. Infelizmente, várias tentativas de sequenciar o gene 16S rRNA da amostra positiva para *Ehrlichia/Anaplasma* falharam. A análise filogenética e de rede de haplótipos dos fragmentos dos genes 16S e 23S rRNA confirmaram que o *Mycoplasma* sp. detectado nestes animais fora relatado anteriormente em quatis-de-cauda-anelada do Brasil. O nome ‘*Candidatus* *Mycoplasma* haematonasua’ foi proposto para este novo organismo.

Palavras-chave: Anaplasmataceae, hemoplasmas, piroplasmas, *Nasua nasua*.

ABSTRACT

Environmental Protection Areas (EPAs) are portions of land that shelter native fauna and flora, protected by law, essential for the conservation of biodiversity, natural resources, macro and micro ecosystems and endangered species. The most important conservation EPA of the Atlantic Forest is the Iguaçu National Park (INP), Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, in the border area with Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. The most terrestrial mammals visualized in the INP are the ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1758) that are in constant contact with tourists asking for and/or stealing food from visitors. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are obligate intracellular, non-cultured in vitro and without cell walls that parasitize the surface of erythrocytes of a wide variety of mammals. A potentially novel haemotropic *Mycoplasma* sp. has been previously detected in the ring-tailed coatis from central-western and southern Brazil. Therefore, the aims of this study were to investigate the occurrence of haemotropic *Mycoplasma* sp. and tickborne pathogens in wild ring-tailed coatis from the INP, Foz do Iguaçu municipality, Paraná State, southern Brazil. Blood samples were collected from 18 wild ring-tailed coatis and evaluated by conventional PCR (cPCR) assays for haemotropic *Mycoplasma* spp. (16S and 23S rRNA), *Theileria/Babesia* spp. (18S rRNA) and *Ehrlichia/Anaplasma* spp. (16S rRNA, sodB, dsb and groEL). Eight out of 18 (44.44%; 95% CI: 24.56%–66.28%) animals were positive for haemotropic *Mycoplasma* spp. All ring-tailed coatis tested negative for *Theileria/Babesia* spp. and only one out of 18 (5.56%; 95% CI: 0.99%–25.76%) animals tested positive for *Ehrlichia/Anaplasma* spp. by the 16S rRNA cPCR. Unfortunately, multiple attempts to sequence the 16S rRNA gene of the *Ehrlichia/Anaplasma*-positive sample have failed. Phylogenetic and network analysis of the hemoplasma 16S and 23S rRNA gene fragments confirmed that animals were infected by a potentially novel haemotropic *Mycoplasma* sp. previously reported in ring tailed coatis from Brazil. The name '*Candidatus* *Mycoplasma* haematonasua' is proposed for this novel organism.

Keywords: Anaplasmatataceae, hemoplasmas, piroplasmas, *Nasua nasua*.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. The consensus sequences were subjected to multiple alignments with the sequences selected from GenBank® using MAFFT available on the GUIDANCE2 server (Sela et al., 2015). The best-fit model of nucleotide substitution was determined using jModeltest v.2.....41

Figure 2. The consensus sequences were subjected to multiple alignments with the sequences selected from GenBank® using MAFFT available on the GUIDANCE2 server (Sela et al., 2015). The best-fit model of nucleotide substitution was determined using jModeltest v.2.....42

Figure 3. Neighbor-Net analysis of 16S rRNA and 23S rRNA sequences obtained from ring-tailed coatis sampled in the present study and compared to related hemoplasmas sequences previously deposited in GenBank®.....43

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CHGM - Concentração média de hemoglobina corpuscular

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

PNI – Parque Nacional do Iguaçu

PCR – Reação em cadeia da polimerase

 cPCR – PCR convencional

 qPCR – PCR em tempo real

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

VCM – Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.	Hemoplasmas	15
2.1.1.	<i>Patogenia</i>	15
2.1.2.	<i>Sinais Clínicos</i>	16
2.1.3.	<i>Transmissão</i>	16
2.1.4.	<i>Diagnóstico</i>	17
2.1.5.	<i>Hemoplasmas em animais silvestres</i>	17
2.1.6.	<i>Potencial zoonótico</i>	18
2.2.	Patógenos transmitidos por carrapatos	19
2.2.1.	<i>Ehrlichia/Anaplasma sp.</i>	19
2.2.2.	<i>Piroplasmas</i>	20
2.3.	Parque Nacional do Iguaçu	20
2.3.1.	<i>Áreas de Proteção Ambiental (APAs)</i>	20
2.3.2.	<i>Mata Atlântica</i>	21
2.3.3.	<i>O Parque Nacional do Iguaçu</i>	21
2.3.4.	<i>Quatis-de-cauda-anelada</i>	22
2.3.5.	<i>Vetores</i>	23
3.	REFERÊNCIAS	25
4.	OBJETIVOS	35
4.1.	Objetivo Geral	35
4.2.	Objetivos Específicos	35
5.	CAPÍTULO 2 - ARTIGO: ‘<i>Candidatus Mycoplasma haematonasua</i>’ and tick-borne pathogens in ring-tailed coatis (<i>Nasua nasua</i> Linnaeus, 1976) from the Iguaçu National Park, Paraná State, southern Brazil	36
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO 1 - TERMO APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	58
	ANEXO 2 – TERMO DE APROVAÇÃO ICMBio	59

1. INTRODUÇÃO

Os animais de vida livre têm grande importância no ciclo de parasitos em um ecossistema. A proximidade cada vez mais frequente da população humana com esses animais demanda vigilância sanitária constante das espécies a fim de prever e evitar surtos de doenças tanto para os animais quanto para a população humana. Essa proximidade é ainda mais evidente em unidades de conservação ambiental, principalmente àquelas próximas à grandes centros urbanos. Espécies sinantrópicas são aquelas que habitam locais próximos à população humana (Tedesco et al., 2018) e esses parques são ótimos locais para essa interação, uma vez que constituem microrregiões preservadas e isoladas dentro das cidades com disponibilidade de alimentos e presença humana pacífica.

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é uma Unidade de Conservação Federal localizada no município de Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, sul do Brasil e faz fronteira com o Parque Nacional Iguazú, ao norte da província de Misiones, Argentina. É o segundo parque mais visitado no Brasil, considerado patrimônio mundial da UNESCO (UNESCO, 2020) com aproximadamente 185.262 hectares do maior remanescente de Mata Atlântica do país. O parque apresenta uma fauna diversa incluindo onça-pintada (*Panthera onca*), anta (*Tapirus terrestris*), catetos (*Tayassu tajacu*), e, entre outras espécies, o quatis-de-cauda-anelada (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1976), um dos animais mais vistos pelos turistas do PNI.

Os quatis-de-cauda-anelada são amplamente distribuídos e no Brasil, habitam predominantemente a Mata Atlântica, Floresta Amazônica e Pantanal (Trovati et al., 2010). Os quatis são onívoros, alimentando-se principalmente de invertebrados e frutas (Gompper e Decker, 1998), mas podem ser encontrados em áreas próximas aos seres humanos, invadindo habitações em busca de alimento (Beisiegel & Mantovani, 2006).

Essa interação entre humanos e quatis-de-cauda-anelada é muito comum no PNI, onde os animais costumam perseguir humanos em busca de alimento fácil. A proximidade entre essas espécies provoca interferência sobre as populações animais e de vetores, resultando assim em maior exposição de humanos à riscos sanitários.

35 Uma grande variedade de espécies de carrapatos de vida livre já foi
36 descrita no PNI (Suzin et al., 2020). Os carrapatos (Acari: Ixodidae) são de
37 grande importância na medicina veterinária e humana. Nesse cenário, a fauna
38 silvestre pode desempenhar um importante papel na epidemiologia de
39 patógenos transmitidos por carrapatos (Szekeres et al., 2019) contudo, poucos
40 estudos avaliaram patógenos transmitidos por carrapatos em quatis do Brasil (de
41 Sousa et al., 2017).

42 A família Anaplasmataceae (ordem Rickettsiales) é formada pelos
43 gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* e *Wolbachia*. São bactérias Gram-negativas
44 intracelulares obrigatórias, transmitidas por vetores artrópodes, principalmente
45 carrapatos. O gênero *Ehrlichia* atualmente consiste em seis espécies: *E. canis*,
46 *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. minasensis* (Cabezas-
47 Cruz et al., 2016; Dumler et al., 2001). Ainda, uma potencial nova espécie de
48 *Ehrlichia*, denominada '*Candidatus Ehrlichia hydrochoerus*' foi detectada em
49 capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) do sul do Brasil (Vieira et al., 2022), além
50 de uma potencial nova espécie de *Ehrlichia* detectada em equinos do Brasil e
51 Nicarágua (Vieira et al., 2018).

52 Os piroplasmas (ordem Piroplasmida) são protozoários apicomplexos que
53 compreendem os gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* e *Rangelia* (Yabsley
54 et al., 2013). Esses agentes são transmitidos por carrapatos e parasitam as
55 células sanguíneas de vertebrados silvestres e domésticos (Alvarado-Rybak et
56 al., 2016).

57 Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são microrganismos
58 pleomórficos Gram-negativos, parasitas obrigatórios, não cultiváveis *in vitro* e
59 sem parede celular que parasitam a superfície dos eritrócitos de uma grande
60 variedade de mamíferos (Messick, 2004). Até o momento, não há evidências
61 robustas quanto a transmissão de hemoplasmas por vetores artrópodes, embora
62 sugere-se que carrapatos e pulgas possam estar envolvidos (Machado et al.,
63 2017; Aktas e Ozubek, 2017).

64 O contato constante entre diferentes espécies animais e humanos
65 predispõe ao fluxo de ectoparasitos e patógenos transmitidos por carrapatos
66 entre as populações. Dessa forma, o conhecimento sanitário de animais de vida
67 livre é o ponto chave para promover a Saúde Única no mundo contemporâneo,
68 preservando espécies e vidas. Sendo assim, o presente estudo teve como

69 objetivo determinar o perfil sanitário de quatis-de-cauda-anelada do PNI, Paraná,
70 por meio da determinação da ocorrência de ectoparasitas e hemoparasitos
71 nesses animais.

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

2. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Hemoplasmas

Hemoplasmas são bactérias eritrocitárias obrigatórias sem parede celular de 0,2 a 3.0 μm de diâmetro que infectam uma grande variedade de mamíferos (Neimark et al., 2001; Messick, 2004; Millán et al., 2021). Apresentam-se em formato de bastão, cocos e/ou em formato de anel e são encontrados individualmente ou formando cadeias na superfície de eritrócitos ou livres no plasma. Essas bactérias não penetram as células, mas permanecem aderidas à superfície dos eritrócitos, onde delicadas fímbrias do microrganismo anexam-no à superfície da célula hospedeira à uma distância de 15 a 25 nm (Messick, 2004).

Os hemoplasmas pertencem à classe Molliculites, Família Mycoplasmataceae e anteriormente faziam parte do grupo das Rickettsias, mas estudos demonstraram que *Haemobartonella* spp. e *Eperythrozoon* spp. diferem deste grupo em relação à ausência de parede celular e ao seu modo de infecção (Neimark et al., 2001). Ainda, a análise minuciosa do gene 16S rRNA apresentou pouca semelhança com a análise do DNA de outras espécies de *Rickettsia*, e maior proximidade filogenética com microrganismos do gênero *Mycoplasma* (Messick, 2004). Assim, foi proposta a alteração taxonômica e afiliação filogenética de *Haemobartonella* spp. e *Eperythrozoon* spp. para o gênero *Mycoplasma* (Neimark et al., 2001).

2.1.1. Patogenia

Uma vez aderidos aos eritrócitos, os hemoplasmas podem produzir radicais livres que induzem dano oxidativo das membranas das células hospedeiras (Somerson et al., 1965) e secretar enzimas que levam à ruptura da membrana eritrocitária (Rottem et al., 1973). Algumas espécies também produzem superantígenos, que se ligam diretamente a moléculas do complexo de histocompatibilidade do hospedeiro sem ser processados, resultando no desenvolvimento de autoanticorpos que desencadeiam distúrbios imunológicos (Messick, 2004).

A produção de citocinas inflamatórias e potencial supressão das defesas do hospedeiro por linfócitos ativados podem resultar no desenvolvimento de

137 doenças crônicas e debilitantes (Drancourt e Raoult et al., 2005). Ainda, a
138 infecção por hemoplasmas pode causar anemia hemolítica aguda associada a
139 essas doenças crônicas (Neimark et al., 2001), que desempenham um papel
140 importante na transformação morfológica celular com formação de alterações
141 cromossômicas que podem levar a neoplasias (Messick, 2004).

142

143 2.1.2. Sinais Clínicos

144 A alta parasitemia das células eritrocitárias pode desencadear anemia
145 hemolítica aguda (Messick, 2004), mesmo assim, as infecções por hemoplasmas
146 são, em sua maioria, assintomáticas, embora coinfeções possam desencadear
147 o agravamento dos sinais clínicos (Neimark et al., 2001).

148 A infecção subclínica está intimamente associada a alterações
149 hematológicas com diminuição no volume corpuscular médio (VCM), na
150 concentração média de hemoglobina corpuscular (CHGM) e na contagem
151 absoluta de eritrócitos (Messick, 2004). A anemia ainda pode resultar em
152 taquicardia, taquipneia e pulsos femorais fracos ou limitados com
153 desenvolvimento de sopros cardíacos, contudo, apesar da natureza hemolítica
154 da anemia, a icterícia é pouco observada (Tasker et al., 2018).

155 Infecções crônicas geralmente ocorrem em animais aparentemente
156 saudáveis e imunocompetentes cujos sinais clínicos mais frequentes são
157 letargia, anorexia, hipertermia e anemia (Messick, 2004).

158

159 2.1.3. Transmissão

160 Uma vez que os hemoplasmas não são cultiváveis *in vitro*, nem
161 encontrados livres natureza, esses organismos dependem de uma célula
162 hospedeira para sua manutenção. Deste modo, a via de transmissão mais
163 provável deste patógeno é por meio de artrópodes hematófagos como
164 carrapatos, pulgas e mosquitos (Messick, 2004), no entanto, estudos
165 relacionados à transmissão de hemoplasmas nas mais diferentes espécies é
166 escassa e não conclusiva.

167 Existem relatos de transmissão de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus*
168 *Mycoplasma haemominutum*' por pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* para
169 gatos domésticos (Woods et al., 2005) e carrapatos do complexo *Rhipicephalus*
170 *sanguineus* sensu lato são considerados os principais vetores de *Mycoplasma*

171 *haemocanis* para cães domésticos (Seneviratna et al., 1973). DNA de
172 ‘*Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus*’ foi detectado em glândulas
173 salivares de *Amblyomma dubitatum* (Vieira et al., 2021) e em *Amblyomma*
174 *sculptum* (Gonçalves et al., 2020), o que reforça o potencial envolvimento de
175 carrapatos na transmissão deste grupo de bactérias. Transfusão sanguínea,
176 fômites contaminados, via transplacentária e mordeduras também são
177 consideradas outras potenciais formas de transmissão (Seneviratna et al., 1973;
178 Messick, 2003; Lappin et al., 2006, Tasker et al., 2010). Estudos anteriores
179 relataram a transmissão de hemoplasmas por meio de interações agressivas
180 entre gatos (Museuxetal., 2009) e roedore silvestre (*Gerbillus andersoni*)
181 (Cohenetal., 2018). Deste modo, o principal vetor de hemoplasmas ainda
182 permanece desconhecido (Machado et al., 2017).

183

184 2.1.4. Diagnóstico

185 O diagnóstico da infecção por hemoplasmas pode ser feito de forma
186 indireta ou direta. A avaliação de esfregaços sanguíneos corados com corantes
187 do tipo Romanowsky em microscopia de luz deve ser cuidadosa para distinguir
188 corretamente os microrganismos de inclusões eritrocitárias como corpos de
189 Pappenheimer, corpúsculos de Howell-Jolly e de Heinz (Neimark et al., 2001;
190 Nishizawa et al., 2010).

191 O uso de técnicas moleculares mais sensíveis e específicas, como
192 ensaios convencionais de PCR e PCR em tempo real, aprimorou a capacidade
193 de diagnosticar a infecção por hemoplasmas em várias espécies (Johnson et al.,
194 2016), sendo considerado o padrão ouro. Para tanto, a detecção do gene 16S
195 rRNA é o mais amplamente utilizado (Berent et al., 1998; Hoelzle et al., 2010;
196 Machado et al., 2016).

197

198 2.1.5. Hemoplasmas em animais silvestres

199 No Brasil, diversas espécies de hemoplasmas já foram detectadas em
200 animais domésticos, como gatos (Miceli et al., 2013; André et al., 2014;
201 Marcondes et al., 2018), cães (Ramos et al., 2010; Valle et al., 2014; Vieira et
202 al., 2015), cabras (Machado et al., 2017), gado bovino (Giroto et al., 2012; Mello
203 et al., 2019), bubalinos (Santos et al., 2018) e ovinos (Souza et al., 2019;
204 Mongruelet al., 2020).

205 Em animais silvestres, espécies de *Mycoplasma* hemotrópico foram
206 descritos em felídeos (Willi et al., 2007; Guimarães et al., 2007; André et al.,
207 2011; de Souza et al., 2017; Furtado et al., 2019), canídeos (André et al., 2011;
208 de Souza et al., 2017), morcegos (Ikeda et al., 2017; Santos et al., 2020; Collere
209 et al., 2022), primatas não-humanos (Bonato et al., 2015; Ramalho et al., 2017;
210 Cubilla et al., 2017; Melo et al., 2019), roedores (Vieira et al., 2009; Conrado et
211 al., 2015; Gonçalves et al., 2015; de Souza et al., 2017; Oliveira et al., 2021;
212 Valente et al., 2021; Vieira et al., 2022), procionídeos (de Souza et al., 2017;
213 Cubilla et al., 2017), cervídeos (Grazziotin et al., 2011), gambás (Massini et al.,
214 2019; Gonçalves et al., 2019; Pontarolo et al., 2020;) e javalis (Dias et al., 2019).

215 Em quatis, uma potencial nova espécie de hemoplasma foi descrita
216 infectando animais das regiões centro-oeste (de Souza et al., 2017) e sul (Cubilla
217 et al., 2017) do Brasil, intimamente relacionada ao ‘*Ca. M.*
218 *haematohydrochoerus*’ descrito em capivaras (Vieira et al., 2009; Vieira et al.,
219 2021).

220

221 2.1.6. *Potencial zoonótico*

222 Uma vez que os micoplasmas hemotrópicos infectam uma grande
223 variedade de mamíferos, existem relatos de infecções em seres humanos por
224 esses agentes (Santos et al., 2008). Em 2015 na Inglaterra, uma nova espécie
225 de hemoplasma, ‘*Candidatus Mycoplasma haematomominis*’ foi identificada
226 como o principal agente infeccioso em um paciente imunocomprometido (Sykes
227 et al., 2011). Ainda, em estudos anteriores, *M. haemofelis* (Santos et al., 2008),
228 *M. suis* (Yuan et al., 2009), *M. ovis* (Sykes et al., 2010), ‘*Candidatus M.*
229 *haematoparvum*’ (Maggi et al., 2013) e ‘*Ca. M. haematomominis*’ (Steer et al.,
230 2011) foram descritos infectando seres humanos.

231 Recentemente, ‘*Ca. M. haematomominis*’ foi detectado em um paciente
232 humano com síndrome hemofagocítica no Japão (Hattori et al., 2020) e em um
233 cuidador de animais com pirexia persistente na Austrália (Alcorn et al., 2021).

234

235

236

237

238

2.2. Patógenos transmitidos por carrapatos

2.2.1. *Ehrlichia/Anaplasma* sp.

Os agentes da família Anaplasmataceae são bactérias intracelulares obrigatórias, cujo ciclo no ambiente envolve interações complexas entre vetores invertebrados e hospedeiros vertebrados (de Souza et al., 2017).

Esses agentes podem infectar diferentes células de mamíferos, dependendo da espécie infectante. *Anaplasma marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* infectam eritrócitos; *Anaplasma platys* infecta plaquetas e neutrófilos; *Anaplasma phagocytophilum* e *E. ewingii* infectam granulócitos; *Anaplasma bovis*, *E. chafeensis* e *E. muris* infectam monócitos e macrófagos; *E. ruminantium* infecta células endoteliais, neutrófilos e macrófagos (Dumler et al., 2001); *E. minasensis* infecta monócitos (Cabezas-Cruz et al., 2016) *E. canis* infecta monócitos, macrófagos e neutrófilos (Aguiar et al., 2019). E a apresentação clínica pode incluir febre, petéquias, vômitos, dor abdominal, diarreia, leucopenia, trombocitopenia e alteração dos níveis séricos das enzimas hepáticas (Dumler et al., 2001).

O diagnóstico molecular desses agentes é realizado pela detecção de fragmentos dos genes 16S rRNA, *sodb*, *dsb* e *groEL*. No Brasil, a detecção de novos genótipos de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em cervídeos (Machado et al., 2006; Mongruel et al., 2017; Picoloto et al., 2010; Sacchi et al., 2012; Silveira et al., 2014, 2013, 2012), canídeos selvagens (Almeida et al., 2013; André et al., 2012; de Souza et al., 2017), felinos selvagens (André et al., 2010, 2012; Widmer et al., 2011), catetos e queixadas (Soares et al., 2015), gambás (Guimarães et al., 2019; Lopes et al., 2018), roedores (Benevenuto et al., 2017; Braga et al., 2018; de Sousa et al., 2017; Vieira et al., 2022) e em quati-de-cauda-anelada (de Souza et al., 2017; Cubilla et al., 2017) tem mostrado uma diversidade de agentes da família Anaplasmataceae circulando em mamíferos domésticos e selvagens.

A principal forma de transmissão de *Ehrlichia* sp. é pela picada de carrapatos infectados, por isso uma alta prevalência de erliquiose é observada em regiões tropicais e subtropicais devido a distribuição geográfica de seu vetor.

Anaplasma spp. e *Ehrlichia* spp. já foram detectados em *Amblyomma sculptum* (Melo et al., 2016; Widmer et al., 2011; de Souza et al., 2017),

273 *Amblyomma triste* (Widmer et al., 2011), *Amblyomma ovale* e *Amblyomma*
274 *parvum* (de Souza et al., 2017), e *Amblyomma* spp. (Widmer et al., 2011; de
275 Souza et al., 2017), mesmo assim, os vetores artrópodes envolvidos nos ciclos
276 de transmissão de *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. entre mamíferos silvestres no
277 Brasil ainda são desconhecidos (de Souza et al., 2017). Assim, animais
278 domésticos e silvestres são considerados reservatórios e favorecem a
279 disseminação desses agentes que podem causar doenças em animais e
280 humanos (Doudier et al., 2010; Dumler et al., 2001; Parola, 2005).

281

282 2.2.2. *Piroplasmas*

283 Os piroplasmas (ordem Piroplasmida) são protozoários apicomplexos que
284 compreendem os gêneros *Babesia*, *Theileria*, *Cytauxzoon* e *Rangelia* (Yabsley;
285 Shock, 2013). Esses agentes são transmitidos por carrapatos que parasitam
286 células sanguíneas de vertebrados silvestres e domésticos em todo o mundo
287 (Alvarado-Rybak, 2016). Esses organismos têm um grande impacto veterinário,
288 sendo considerado o parasita sanguíneo mais comumente encontrado no
289 sangue de mamíferos (Schnittger et al., 2012).

290 Nos últimos anos, o advento de técnicas moleculares tem contribuído para
291 um aumento expressivo no número de estudos relatando infecção por
292 piroplasmas em animais silvestres em todo o mundo (Alvarado-Rybak et al.,
293 2016). A caracterização molecular é baseada principalmente nos genes 18S
294 rRNA e β -tubulina (André et al., 2010; Alvarado-Rybak et al., 2016).

295 Souza et al. (2018) detectaram sequências similares com *Theileria* sp. em
296 quatis-de-cauda-anelada do Mato Grosso do Sul, Brasil. Esses achados
297 incomuns sugerem que algumas espécies de piroplasmas podem apresentar
298 falta de especificidade de hospedeiros ou novas espécies de piroplasmas
299 relacionadas às já descritas em animais domésticos podem estar circulando em
300 diferentes hospedeiros.

301

302 2.3. Parque Nacional do Iguaçu

303

304 2.3.1. Unidades de Conservação Ambiental

305 As unidades de conservação ambiental são porções de terra que abrigam
306 fauna e flora nativa, protegidas por lei, essenciais para a conservação da

307 biodiversidade (Mace, 2014). A criação de unidades de conservação é uma
308 estratégia importante de controle territorial de uso e ocupação de áreas naturais,
309 desta forma, áreas protegidas têm como principal função a conservação e
310 preservação de recursos naturais, de ecossistemas e de espécies raras e
311 ameaçadas de extinção (Medeiros, 2006).

312 Atualmente, cerca de 15% da superfície terrestre está protegida da
313 degradação por essas unidades (Juffe-Bignoni et al., 2014) e o Brasil se destaca
314 tanto pela biodiversidade quanto pelo investimento abrigando hoje o maior
315 sistema de proteção de biodiversidade e ecossistema do mundo, protegendo
316 cerca de 12% de todo o ecossistema global (WDPA, 2012). Contudo, a maioria
317 das áreas protegidas ainda são em formatos de parques, com apenas 20-50%
318 sendo efetivamente gerenciadas (Geldmann et al., 2013; Watson et al., 2014).

319 Essas unidades ainda contribuem significativamente para a redução dos
320 impactos na fauna e flora, causados por ações antrópicas, como queimadas e
321 desmatamento, mas mesmo assim, as localizadas próximas à grandes centros
322 urbanos estão sujeitas à diversas ameaças como a caça, surgimento de
323 espécies invasoras e mudanças no ecossistema (da Silva et al., 2018).

324

325 2.3.2. *Mata Atlântica*

326 A Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical da América do Sul,
327 com uma das maiores riquezas de espécies e taxas de endemismo do planeta
328 (Metzger, 2009) abrigando 70% da população brasileira, e está reduzida a menos
329 de 16% de sua extensão original (Ribeiro et al., 2009). É uma das áreas mais
330 ricas e ameaçadas do mundo e têm sido recrutada para conservação devido ao
331 endemismo de vários grupos de organismos que ultrapassa 8.000 espécies
332 (Tabarelli et al., 2005), dentre elas, muitas presentes na Lista Vermelha de
333 espécies ameaçadas de extinção (Araújo et al., 2014).

334

335 2.3.3. *O Parque Nacional do Iguaçu*

336 Uma das unidades de conservação ambiental mais importantes da Mata
337 Atlântica é o Parque Nacional do Iguaçu (Ribeiro et al., 2009; da Silva et al.,
338 2018), localizado no município de Foz do Iguaçu (25 ° 05 ' a 25 ° 41 ' S e 53 ° 40
339 ' a 54 ° 38 ' O), Estado do Paraná, sul do Brasil, fronteira com fronteira com
340 Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. Essa área forma um corredor verde entre

341 os dois países, garantindo proteção de diversas espécies ameaçadas (Moraes
342 et al., 2017).

343 Trata-se de uma Unidade de Conservação Federal com
344 aproximadamente 185.262 hectares do maior remanescente de Mata Atlântica
345 do país. Juntamente com as APAs adjacentes e outros remanescentes florestais,
346 o parque protege aproximadamente 10.000 km² de fauna e flora nativa (Di Bitetti
347 et al., 2006). O parque abriga uma rica fauna de grandes mamíferos terrestres,
348 incluindo muitas espécies-chave para a biodiversidade da Mata Atlântica, como
349 herbívoros (*Tapirus terrestris*, *Mazama* sp.), predadores (*Panthera onca*,
350 *Leopardus pardalis*) e pequenos mamíferos (*Nasua nasua*, *Didelphis* sp. e
351 *Cuniculus paca*) sendo muitas das espécies com alta ocupação dentro do
352 parque, mas raras ou extintas na maior parte de remanescentes florestais pelo
353 país (da Silva et al., 2018). Em um levantamento de fauna nativa, oito espécies
354 encontram-se ameaçados de extinção, de acordo com a lista vermelha nacional
355 e/ou da IUCN.

356 Mesmo assim, as espécies nele protegidas convivem com ameaças
357 antrópicas, como caça, pesca, extração dos recursos naturais e outras
358 atividades ilícitas que comprometem as espécies silvestres existentes neste local
359 (Araújo et al, 2014). O PNI é fortemente influenciado pela ação antrópica, uma
360 vez que seus arredores foram transformados em paisagens agrícolas para
361 produção de grãos e, em menor escala, para a pecuária leiteira para atender
362 crescente demanda por alimentos (da Silva et al., 2018). Ainda, o PNI é o
363 segundo parque mais visitado no Brasil e considerada patrimônio mundial da
364 UNESCO (UNESCO, 2020) sendo assim, o turismo pode gerar um impacto
365 negativo na fauna uma vez que a atividade humana leva a mudanças na vida
366 selvagem, com maior presença de espécies oportunistas como gambás e quatis
367 em áreas adjacentes e urbanizadas (da Silva et al., 2014).

368

369 2.3.4. *Quatis-de-cauda-anelada*

370 Os quatis-de-cauda-anelada (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) são
371 amplamente distribuídos na América do Sul, habitando predominantemente a
372 Mata Atlântica, a Floresta Amazônica e as regiões do Pantanal brasileiro (Trovati
373 et al., 2010). São os mamíferos terrestres mais vistos por turistas no Parque
374 Nacional do Iguaçu, devido à suas atividades diurnas, gregárias e hábitos sociais

375 (Trovati et al., 2017) seguidos do veado-mateiro (*Mazama americana*) e iraras
376 (*Eira barbara*) (da Silva et al., 2018).

377 São carnívoros pertencentes à família Procyonidae com hábitos onívoros,
378 alimentando-se principalmente de invertebrados e frutas (Gompper & Decker,
379 1998). Como espécie oportunista, costumam invadir fazendas ou casas em
380 busca de alimentos (Beisiegel & Mantovani, 2006), favorecendo o contato com
381 animais domésticos e humanos e aumentando riscos de ataques e mordeduras
382 (Bittneretal et al., 2010).

383 A fácil adaptação dos quatis a diferentes ambientes e recursos
384 alimentares facilita o trânsito entre áreas urbanas e florestais resultando em um
385 intercâmbio entre animais silvestres e ambientes domésticos (Rodrigues et al.
386 2006). No PNI, por exemplo, os quatis estão em constante contato com os
387 turistas pedindo e/ou roubando alimentos dos visitantes (Sazima, 2010).

388

389 2.3.5. Vetores

390 Muitos dos patógenos transmitidos por vetores são mantidos em
391 reservatórios de vida silvestre (Herrera et al. 2008; Shock et al. 2011; Yabsley
392 and Shock 2013; Alvarado-Rybak et al. 2016). No PNI, uma grande variedade de
393 espécies de carrapatos de vida livre já foi descrita (Suzin et al., 2020). Ademais,
394 as Cataratas do Iguaçu estão localizadas no parque, atraindo milhares de
395 visitantes de todo o mundo, sendo uma das sete maravilhas do mundo. Esses
396 visitantes ficam vulneráveis ao contato com vetores e patógenos associados à
397 fauna local, uma vez que a maioria dos visitantes passam em média quatro dias
398 em áreas contíguas ao parque (Moraes et al., 2017). Ainda, a ausência de uma
399 zona tampão entre o parque e as áreas adjacentes como fazendas e centros
400 urbanos, favorece a presença de vida selvagem fora do parque e animais,
401 especialmente cães, dentro do parque, aumentando a translocação de vetores
402 entre as espécies (da Silva et al., 2014).

403 Dentre os patógenos transmitidos por vetores já diagnosticados em
404 quatis, estão o *Trypanosoma cruzi* (Herrera et al., 2004), causador da
405 tripanossomíase ou Doença de Chagas, *Hepatozoon procyonis* (Rodrigues et al.,
406 2007; de Souza et al., 2018), *Ehrlichia* sp. e *Anaplasma* sp. (André et al., 2012;
407 de Souza et al., 2017; de Souza et al., 2018) e piroplasmas (Alvarado-Rybak et
408 al., 2016; de Souza, 2018). Desta forma, a triagem de animais silvestres para os

409 patógenos transmitidos por vetores é de grande importância para a
410 manutenção da segurança zoonótica do parque.

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

3. REFERÊNCIAS

- 443
444
445 AGUIAR, D.M. et al. Uncommon *Ehrlichia canis* infection associated with morulae
446 in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. *Transbound Emerg Dis*, v.
447 67, n. 2, p. 135-141, 2019.
- 448
449 ALCORN, K. et al. First report of *Candidatus* *Mycoplasma haemohominis*
450 infection in Australia causing persistent fever in an animal carer. *Clin. Infect. Dis.*,
451 v. 72, n. 4, p. 634–640, 2021.
- 452
453 ALMEIDA, A. P. et al. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari:
454 Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 3, n. 4, p. 203–206. 2012.
- 455
456 ALMEIDA, A. P. et al. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-
457 eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.*, v. 50, n.
458 3, p. 640-646. 2013.
- 459
460 ALVARADO-RYBAK, M. et al. A review of piroplasmid infections in wild
461 carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife
462 conservation. *Parasit. Vectors*, v. 9, n. 1, p. 538. 2016.
- 463
464 ALVES-COSTA, C.P. et al. Variation in the diet of the brown nosed coati (*Nasua*
465 *nasua*) in Southeastern Brazil. *J. Mammal.* v. 85, p. 478–482, 2004.
- 466
467 ANDRÉ; M.R. et al. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming
468 domestic cats in a zoo environment in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* v.5, p.545-
469 551, 2014.
- 470
471 ANDRÉ, M. R. et al. Molecular and Serologic Detection of *Ehrlichia* spp. in
472 Endangered Brazilian Wild Captive Felids. *J. Wildl. Dis.*, v. 46, n. 3, p. 1017–
473 1023, jul. 2010.
- 474
475 ANDRÉ, M. R. et al. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian
476 and exotic captive carnivores. *Ticks Tick Borne Dis.*, v. 3, n. 4, p. 247-253. 2012.

- 477 ANDRÉ, M. R. et al. Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. J. Zoo Wildl.
478 Med. v.42, p. 342-347, 2011.
479
- 480 ARAÚJO, K. F. et al. Insetos atraídos por caldo de cana de açúcar e mel de
481 abelhas no Parque Nacional do Iguaçu/ Foz do Iguaçu- PR, Brasil. Magistra, Cruz
482 das Almas, v. 26, n. 2, p. 255-261, 2014.
483
- 484 AKTAS, M., OZUBEK, S. Molecular survey of haemoplasmas in shelter dogs and
485 associations with *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Med. Vet. Entomol., v.
486 31, n. 4, p. 457-461. 2017.
487
- 488 BEISIEGEL, B.M. et al. Habitat use, home range and foraging preferences of the
489 coati *Nasua nasua* in a pluvial tropical Atlantic forest area. J. Zoo., v. 269, p.77–
490 87, 2006.
491
- 492 BENEVENUTE, J.L. et al. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time
493 polymerase chain reaction using groEL gene for *Ehrlichia* and *Anaplasma*
494 species in rodents in Brazil. Ticks Tick Borne Dis., v. 8, p. 646-656, 2017.
495
- 496 BONATO, L. et al. Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp.
497 And hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. Comp
498 Immunol, Microbiol Infec Dis, v.42, p.15-20, 2015.
499
- 500 BRAGA, M. et al. Molecular detection of Anaplasmataceae agents in *Dasyprocta*
501 *azarae* in northeastern Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., v. 27, n. 1, p. 98–104,
502 2018.
503
- 504 CABEZAS-CRUZ, A. et al. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick
505 *Rhipicephalus microplus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., v. 66, n. 3, p. 1426–1430,
506 2016.
507
- 508 CUBILLA, M.P. et al. Microscopic and molecular identification of hemotropic
509 mycoplasmas in South American coatis (*Nasua nasua*). Comp. Immunol.
510 Microbiol. Infect. Dis., v. 53, p. 19-25, 2017.

- 511 DA SILVA, M. X. et al. Effectiveness of Protected Areas for biodiversity
512 conservation: Mammal occupancy patterns in the Iguaçu National Park, Brazil. J.
513 Nat. Conserv., v. 41, p. 51–62, 2018.
- 514
- 515 DE SOUZA, K. C. et al. Anaplasmatataceae agents among wild mammals and
516 ectoparasites in Brazil. Epidemiol. Infect., v. 16, p. 3424–3437, 2017.
- 517
- 518 DI BITETTI, M. S. et al. Density, habitat use and activity patterns of ocelots
519 (*Leopardus pardalis*) in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. J. Zoo., v. 270,
520 p. 153–163, 2006.
- 521
- 522 DIAS, G.B. et al. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in captive white-lipped
523 peccaries (*Tayassu pecari*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. Comp. Immunol.
524 Microbiol. Infect. Dis., v.63, p.94–96, 2019.
- 525
- 526 DOUDIER, B. et al. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and
527 *Anaplasma* spp. as human pathogens. Vet. Parasitol., v. 167, n 2-4, p. 149-154.
528 2010.
- 529
- 530 DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and
531 Anaplasmatataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of
532 *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*.
533 Int. J. Syst. Evol. Microbiol., v. 51, n. 6, p. 2145 – 2165, 2001.
- 534
- 535 FURTADO, M.M. et al. First detection of feline hemoplasmas in free-ranging
536 jaguars (*Panthera onca*). Vet. Microbiol., v.214, p.75-80, 2019.
- 537
- 538 GELDMANN, J. et al. Effectiveness of terrestrial protected areas in reducing
539 habitat loss and population declines. Biol. Conserv., v. 161, p. 230–238, 2013.
- 540
- 541 GIROTTO, A. et al. Molecular detection and occurrence of 'Candidatus
542 Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of Southern Brazil. Rev. Bras. Parasitol.
543 Vet., v.21, p.342-344, 2012.
- 544

- 545 GONÇALVES, L.R. et al. Diversity and molecular characterization of novel
546 hemoplasmas infecting wild rodents from diferente Brazilian biomes. *Comp*
547 *Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.43, p.50–56, 2015.
- 548
- 549 GONÇALVES, L. R. et al. Genetic diversity and lack of molecular evidence for
550 hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic
551 mammals from Central-Western Brazil. *Acta Trop.*, v. 203, 105303. 2019.
- 552
- 553 GUIMARÃES, A. et al. Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp.
554 from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 28, n.
555 1, p. 140-144. 2019.
- 556
- 557 GRAZZIOTIN, A. L. et al. Prevalence and molecular characterization of
558 *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer populations. *J. Wildl.*
559 *Dis.*, v.47, p.1005-1011, 2011.
- 560
- 561 HATTORI, N. et al., '*Candidatus* Mycoplasma haemohominis in Human, Japan.
562 *Emerg. Infect. Dis.*, v. 26, n.1, p.11-19, 2020.
- 563
- 564 HERRERA, H. M. et al. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a
565 reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region,
566 Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 102, p. 1133–1139, 2008.
- 567
- 568 IKEDA, P. et al. Evidence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and
569 hemoplasmas in neotropical bats in Brazil. *Epidemiol. Infect.*, v.45, p.2038-2052,
570 2017.
- 571
- 572 JOHNSON, K. A. et al. Detection of hemoplasma infection of goats by use of a
573 quantitative polymerase chain reaction assay and risk factor analysis for
574 infection. *Am. J. Vet. Res.*, v. 77, n. 8, p. 882-889. 2016.
- 575
- 576 JUFFE-BIGNOLI, D., Protected Planet Report (2014 ed). Cambridge, UK: UNEP-
577 WCMC, p. 80, 2014.

- 578 LAPPIN, M.R., et al. Prevalence of *Bartonella* species haemoplasma species,
579 *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in
580 the blood of cats and their fleas in the United States. *J. Feline Med. Surg*, v. 8, p.
581 85–90, 2006.
- 582
- 583 LOPES, M. G. et al. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals
584 from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. *Int. J. Parasitol. Parasites*
585 *Wildl.*, v. 7, n. 3, p. 380–385, 2018.
- 586
- 587 MACE, G. M. Ecology. Whose conservation? *Science*, v. 345, n. 3, p. 1558-1560.
588 2014.
- 589
- 590 MACHADO, R. Z. et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer
591 (*Blastocercus dichotomus*). *Vet. Parasitol.*, v. 139, p. 1–3, 2006.
- 592
- 593 MACHADO, C. et al. *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern
594 Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 55, p. 1–5. 2017.
- 595
- 596 MAGGI, R. G. et al. Infection with Hemotropic *Mycoplasma* species in Patients
597 with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *J. Clin. Microbiol.*, v. 51,
598 n. 10 p. 3237–3241, 2013.
- 599
- 600 MASSINI, P. F. et al. Detection of Hemotropic *Mycoplasma* sp. in white-eared
601 opossums (*Didelphis albiventris*) from Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*,
602 v.28, n.4, p.797-801, 2019.
- 603
- 604 MEDEIROS, R. Evolução das tipologias e categorias de Áreas Protegidas no
605 Brasil. *Ambient. Soc.*, v.9, p. 41-63, 2006.
- 606
- 607 MELLO, V. V. C. et al. Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef
608 cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis
609 in South America. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 66, p. 101337. 2019.
- 610

- 611 MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new
612 insights into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 2-13. 2004.
613
- 614 METZGER, J. P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol.*
615 *Conserv.*, v. 142, p. 1138–1140, 2009.
616
- 617 MICELI, N.G. et al. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in
618 cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. *Rev. Bras.*
619 *Parasitol. Vet.*, v.22, p.385-390, 2013.
620
- 621 MONGRUEL, A. C. B. et al. Survey of vector-borne and nematode parasites
622 involved in the etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. *Rev.*
623 *Bras. Parasitol. Vet.*, v. 29, n. 3, p. 1–12, 2020.
624
- 625 MORAES, M. F. D. et al. Filarial nematodes with zoonotic potential in ring-tailed
626 coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae) and domestic
627 dogs from Iguaçu National Park, Brazil. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports*, v. 8,
628 p. 1–9, 2017
629
- 630 NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera
631 *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions
632 of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’,
633 ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’.
634 *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 891-899. 2001.
635
- 636 PAROLA, P. et al. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.*,
637 v. 36, n. 3, p. 469-492. 2005.
- 638 PICOLOTO, G. et al. Real time polymerase chain reaction to diagnose
639 *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of
640 the Brazilian Pantanal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, n. 3, p. 186-188. 2010.
641
- 642 PONTAROLO, G. H. et al. ‘*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*’, a novel
643 hemoplasma species in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Brazil.
644 *Transbound. Emerg. Dis.*, v.67, n 6, p. 565-572. 2020.

- 645 RAMALHO, A. C. et al. *Mycoplasma* sp. infection in captive Marcgrave's capuchin
646 monkeys (*Sapajus flavius*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 51, p. 34–
647 36, 2017.
- 648
- 649 RAMOS, R. et al. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne
650 pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitol. Res.*,
651 v. 107, p.1115-1120, 2010.
- 652
- 653 RIBEIRO, M. C., et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how
654 is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol. Conserv.*,
655 v. 142, p. 1141–1153, 2009.
- 656
- 657 RODRIGUES, A. F. S. F. et al. Ectoparasites of *Nasua nasua* (Carnivora,
658 Procyonidae) from an urban forest in Southeastern Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet.*
659 *Zootec.*, v. 58, p. 969–971, 2006
- 660
- 661 RODRIGUES, A. F. S. F. et al. Morphological and morphometrical
662 characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961
663 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procyonid *Nasua nasua* and *Procyon*
664 *cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). *Parasitol. Res.*, v. 100, p. 347–350, 2007.
- 665
- 666 ROTTEM, S. et al. Differences in susceptibility to phospholipase C of free and
667 membrane-bound phospholipids of *Mycoplasma hominis*. *Biochim. Biophys.*
668 *Acta*, v. 323, n. 4, p. 520-531, 1973.
- 669
- 670 SACCHI, A.B.V. et al. Prevalence and molecular characterization of
671 Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus*
672 *dichotomus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 4, p. 325-334. 2012.
- 673
- 674 SANTOS, A. P. et al. Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil.
675 *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, n. 12, p. 1922-1924. 2008.
- 676

- 677 SANTOS, N. J. R. et al. Hemotropic mycoplasmas infection in water buffaloes
678 (*Bubalus bubalis*) from northeastern Brazil. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect.*
679 *dis.*, v. 56, p. 27-29. 2018.
- 680
- 681 SCHNITTGER, L., et al. *Babesia*: a world emerging. *Infect. Genet. Evol.* v. 12, p.
682 1788–17809, 2012.
- 683
- 684 SENEVIRATNA, P., et al. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick,
685 *Rhipicephalus sanguineus*. *Res. Vet. Sci.* v. 14, p. 112–114, 1973.
- 686
- 687 SHOCK, B. C. et al. Distribution and prevalence of *Cytauxzoon felis* in bobcats
688 (*Lynx rufus*), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states. *Vet.*
689 *Parasitol.*, v. 175, p. 325–330, 2011.
- 690
- 691 SILVEIRA, J. A. G. et al. Post-mortem hemoparasite detection in free-living
692 Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). *Rev. Bras.*
693 *Parasitol. Vet.*, v. 23, n. 2, p. 206-215. 2014.
- 694
- 695 SILVEIRA, J. A. G. et al. Molecular detection and identification of hemoparasites
696 in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal
697 Brazil. *Ticks Tick borne Dis.*, v. 4, n. 4, p. 341-345. 2013.
- 698
- 699 SILVEIRA, J. A. G. et al. Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens of the
700 Family Anaplasmataceae in Brazilian Brown Brocket Deer (*Mazama*
701 *gouazoubira*, Fischer, 1814) and Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger,
702 1815). *Transbound. Emerg. Dis.*, v. 59, n. 4, p. 353–360, ago. 2012.
- 703
- 704 SOARES, H. S. et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions
705 of the Brazilian Amazon. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 65, n. 1, p. 124-140. 2015.
- 706
- 707 SOUZA, U. A. et al. First molecular detection of *Mycoplasma ovis* (Hemotropic
708 mycoplasmas) from Sheep in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, v. 28,
709 n. 3, p. 360-366. 2019.
- 710

- 711 SOMERSON, N. L. et al. Hemolysin of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Bacteriol, v.
712 89, p. 813-818, 1965.
713
- 714 STEER, J. A. et al. A novel hemotropic Mycoplasma (hemoplasma) in a patient
715 with hemolytic anemia and pyrexia. Clin. Infect. Dis. v. 53, p. 147-51, 2011
716
- 717 SUZIN, A. et al. Free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the Iguaçu National Park,
718 Brazil: Temporal dynamics and questing behavior on vegetation. Ticks Tick
719 Borne Dis., v. 11, p. 101-471, 2020.
720
- 721 SYKES, J. N. et al. Human Coinfection with *Bartonella henselae* and Two
722 Hemotropic Mycoplasma Variants Resembling *Mycoplasma ovis*. J. Clin.
723 Microbiol, v. 48, n. 10, p. 3782–3785, 2010.
724
- 725 SZEKERES, S. et al. Road-Killed Mammals Provide Insight into Tick-Borne
726 Bacterial Pathogen Communities Within Urban Habitats. Transbound. Emerg.
727 Dis., v. 66, n. 1, p. 277-286. 2019.
728
- 729 TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da
730 biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade, v. 1, n. 1, p. 132 –
731 138, 2005.
732
- 733 TASKER, S. et al. Hemotropic mycoplasmas: what's their real significance in
734 cats? J. Feline Med. Surg. v. 12, p. 369–381, 2010.
735
- 736 TEDESCO, C.D. et al. Medium-Sized Mammals in Peri-Urban Environments in
737 Southern Brazil. Acta Sci. Biol. Sci.s, v.40, p.1-9, 2018.
- 738 TROVATI, G.R. et al. Habitat use and home range of brown-nosed coati, (*Nasua*
739 *nasua*) Carnivora: Procyonidae in the brazilian cerrado biome. Rev. de Biol.
740 Trop., v. 58, n. 20, p. 256-261. 2018.
741
- 742 VALLE, S.D.E.F. et al. Identification, occurrence and clinical findings of canine
743 hemoplasmas in southern Brazil. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., v. 37, p.
744 259-265. 2014.

- 745 VIEIRA, R.F.C. et al. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene
746 DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Vet.
747 Microbiol., v. 139, p. 410-413. 2009.
748
- 749 VIEIRA, R. F. C. et al. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in
750 human beings, dogs and horses in a rural settlement in southern Brazil. Rev. Inst.
751 Med. Trop. Sao Paulo., v. 57, n. 4, p. 353-357. 2015.
752
- 753 VIEIRA, R.F.C. et al. '*Candidatus* Mycoplasma haematohydrochoerus', a novel
754 hemoplasma species in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil.
755 Infect. Genet. Evol., v. 93, p. 104988. 2021.
756
- 757 WATSON, J. E. M. et al. The performance and potencial of protected areas.
758 Nature, v. 515, n. 7, p. 67-73. 2014
759
- 760 WIDMER, C. E. et al. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*)
761 in Pantanal, Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, v. 11, n. 8, 2011.
762
- 763 WILLI, B. et al. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild
764 felid species. J.Clin. Microbiol., v.45, p.1159-1166, 2007.
765
- 766 YABSLEY, M. J. et al. Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife
767 reservoirs. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl., v. 2, p. 18-31. 2013.
768
- 769 YUAN, C. L. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection
770 in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. Am. J. Vet. Res., v. 70, n.
771 4, p. 70-890, 2009.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo Geral*

Deteccção e caracterização molecular de hemoplasmas e patógenos transmitidos por carrapatos em quatis-de-cauda-anelada do PNI, município de Foz do Iguaçu, Paraná.

4.2. *Objetivos Específicos*

- a) Detectar patógenos transmitidos por carrapatos e hemoplasmas em quatis;
- b) Detectar e caracterizar molecularmente *Mycoplasma* spp. (genes 16S e 23S rRNA, RNase P);
- c) Detectar e caracterizar molecularmente *Ehrlichia/Anaplasma* spp. (genes 16S rRNA, *sodB*, *dsb* e *groEL*);
- d) Detectar e caracterizar molecularmente *Theileria/Babesia* spp. (gene 18S rRNA);
- e) Realizar a análise filogenética dos genótipos detectados.

1 **5. CAPÍTULO 2 - ARTIGO: ‘*Candidatus Mycoplasma haematonasua*’**
2 **and tick-borne pathogens in ring-tailed coatis (*Nasua nasua***
3 **Linnaeus, 1976) from the Iguaçu National Park, Paraná State,**
4 **southern Brazil**

5
6 Artigo publicado no periódico Transboundary and Emerging Diseases, fator de
7 impacto 5,005.

8
9 **Abstract**

10 The Iguaçu National Park (INP) is the largest remnant of Atlantic Forest in
11 southern Brazil, representing an ecological continuum with Argentina. The INP
12 harbours a diverse fauna, with ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1976,
13 Carnivora: Procyonidae) in close contact with tourists either begging and/or
14 snatching food from visitors. A potentially novel haemotropic *Mycoplasma* sp. has
15 been previously detected in the ring-tailed coatis from central-western and
16 southern Brazil. Therefore, the aims of this study were to investigate the
17 occurrence of haemotropic *Mycoplasma* sp. and tickborne pathogens in wild ring-
18 tailed coatis from the INP, Foz do Iguaçu municipality, Paraná State, southern
19 Brazil. Blood samples were collected from 18 wild ring-tailed coatis and evaluated
20 by conventional PCR (cPCR) assays for haemotropic *Mycoplasma* spp. (16S and
21 23S rRNA), *Theileria/Babesia* spp. (18S rRNA) and *Ehrlichia/Anaplasma* spp.
22 (16S rRNA, sodB, dsb and groEL). Eight out of 18 (44.44%; 95% CI: 24.56%–
23 66.28%) animals were positive for haemotropic *Mycoplasma* spp. All ring-tailed
24 coatis tested negative for *Theileria/Babesia* spp. and only one out of 18 (5.56%;
25 95% CI: 0.99%–25.76%) animals tested positive for *Ehrlichia/Anaplasma* spp. by
26 the 16S rRNA cPCR. Unfortunately, multiple attempts to sequence the 16S rRNA
27 gene of the *Ehrlichia/Anaplasma*-positive sample have failed. Phylogenetic and
28 network analysis of the hemoplasma 16S and 23S rRNA gene fragments
29 confirmed that animals were infected by a potentially novel haemotropic
30 *Mycoplasma* sp. previously reported in ring tailed coatis from Brazil. The name
31 ‘*Candidatus Mycoplasma haematonasua*’ is proposed for this novel organism.

32
33 Keywords: Anaplasmataceae, haemoplasmas, haemotropicmycoplasmas, wild
34 mammals

35 Introduction

36 The ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora:
37 Procyonidae) are widely distributed mammals in South America, and
38 predominantly inhabits the Atlantic Forest, the Amazon Rainforest and Pantanal
39 regions of Brazil (Trovati et al., 2010). Coatis are omnivores, feeding mainly on
40 invertebrates and fruits (Gompper and Decker, 1998), and may be found in areas
41 close to human beings, frequently invading human dwellings in search of food
42 (Beisiegel & Mantovani, 2006), where coati attacks on humans may occur (Bitner
43 et al., 2010).

44 The Iguaçu National Park (INP) contains the largest remnant of Atlantic
45 Forest in southern Brazil, and along with the INP in Argentina promotes a
46 protection area for a diverse fauna, including endangered species (Instituto
47 Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, 2000). A wide variety of tick
48 species have been described in the INP (Suzin et al., 2020), with *Amblyomma*
49 *brasiliense*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma rotundatum* and *Amblyomma*
50 *coelebs* commonly associated with ring-tailed coatis (Labruna et al., 2005;
51 Magalhães-Matos et al., 2017). Although ticks have been reported parasitizing
52 coatis, few studies have evaluated tick-borne pathogens (TBP) in coatis from
53 Brazil (de Sousa et al., 2017).

54 Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are worldwide distributed
55 Gram-negative, obligate epierythrocytic bacteria that parasitize red blood cells of
56 mammals (Messick et al., 2004), including humans (Maggi et al., 2013). In ring-
57 tailed coatis, a potentially novel hemoplasma species has been detected in
58 animals from Southern (Cubilla et al., 2017) and Central-western (Sousa et al.,
59 2017) regions of Brazil.

60 In the INP, ring-tailed coatis are in close contact with tourists either
61 begging and/or snatching food from visitors (Sazima, 2010). Previous studies
62 have reported that the transmission of hemoplasmas through aggressive
63 interactions may occur between cats (Museux et al., 2009) and wild rodents
64 (*Gerbillus andersoni*) (Cohen et al., 2018). Thus, monitoring the health status of
65 ring-tailed coatis may be of public health concern. Therefore, this study aimed to
66 investigate the occurrence of hemotropic *Mycoplasma* sp. and TBP
67 (*Ehrlichia/Anaplasma* and *Babesia/Theileria*) in free-ranging ring-tailed coatis
68 from the INP, Foz do Iguaçu municipality, Paraná State, southern Brazil.

69 **Material and Methods**

70 The study was carried out in the INP, located in Foz do Iguaçu municipality
71 (25°05' to 25°41' S and 53°40' to 54°38' W), Paraná State, southern Brazil: a
72 border area of Brazil and Argentina. The Iguaçu National Park is the second most
73 visited park in Brazil and considered UNESCO's world heritage (UNESCO, 2020).
74 It is a protected area with approximately 185,262 hectares of the largest remnant
75 of the Atlantic Forest. The region presents a humid subtropical climate (Köppen:
76 Cfa) with rainfall throughout the year and an average temperature of 22.1 °C
77 (INMET, 2018). The Park has a diverse fauna including jaguars (*Panthera onca*),
78 tapirs (*Tapirus terrestris*), the collared peccaries (*Tayassu tajacu*), among several
79 other species.

80 A total of 18 ring-tailed coatis were captured using net traps baited with
81 fruits (apple and banana) between March and September 2019. Animals were
82 chemically restraint with an association of ketamine (5 mg/kg) and xylazine (1
83 mg/kg) for clinical examination and blood sampling. Blood samples (up to 3 mL)
84 were collected by venipuncture using sterile EDTA-coated tubes (Becton &
85 Dickinson Co, Franklin Lakes, NJ, USA) and stored at -20 °C until molecular
86 analysis.

87 DNA from 200 µL whole blood was extracted using a commercial kit (GE
88 Helthcare, Ilustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit, Buckinghamshire, UK),
89 according to the manufacturer's instructions. Ultrapure water was used in parallel
90 as a negative control to monitor cross-contamination.

91 To ensure successful DNA extraction, a conventional PCR assay targeting
92 a fragment of the mammalian endogenous gene glyceraldehyde-3-phosphate
93 dehydrogenase (*gapdh*) was performed in all samples. Thereafter, ring-tailed
94 coatis' DNA samples were initially screened by a genus-specific conventional
95 PCR (cPCR) assay targeting a fragment (900 bp) of the 16S rRNA gene of
96 hemoplasmas (Hoelzle et al., 2011; Machado et al., 2017). Ring-tailed coatis'
97 DNA samples that showed to be positive in the cPCR assay based on the 16S
98 rRNA were submitted to genus-specific cPCR assays targeting fragments of the
99 23S rRNA (800 pb) (Mongruel et al., 2020) and RNaseP (170 bp) genes
100 (Compton et al., 2012) of hemoplasmas. Nuclease-free water and *Mycoplasma*
101 *ovis* DNA obtained from a naturally infected goat (*Capra hircus*) blood sample
102 were used as negative and positive controls, respectively, in both cPCR assays.

103 Moreover, ring-tailed coatis' DNA samples were also screened by cPCR assays
104 targeting a fragment (551 bp) of the 18S rRNA gene of *Theileria/Babesia* spp.
105 (Almeida et al., 2012) and a fragment (349 bp) of the 16S rRNA gene of
106 *Ehrlichia/Anaplasma* spp. (Parola et al., 2000). DNA samples that showed to be
107 positive in the cPCR assay based on 16S rRNA gene of *Ehrlichia/Anaplasma*
108 spp. were submitted to genus-specific cPCR assays targeting fragments of *sodb*
109 (300 bp) (Qurollo et al., 2013), *dsb* (349 bp) (Almeida et al., 2011) and *groEL*
110 (1,097 bp) (Lee et al., 2017) genes. *Babesia vogeli* and *Ehrlichia canis* DNA
111 obtained from naturally infected dogs were used as positive controls. Nuclease-
112 free water was used as negative control.

113 Amplicons (~900 bp) obtained from three hemotropic *Mycoplasma* sp.-
114 positive samples were sequenced in both directions by Sanger method, with
115 nucleotide sequences of the 16S rRNA and 23S rRNA genes of hemoplasmas
116 submitted to GenBank® (accession numbers. MZ293799-MZ293801, and
117 MZ297959-MZ297961, respectively).

118 The partial sequences of the 16S and 23S rRNA genes of hemotropic
119 *Mycoplasma* sp. were aligned with other *Mycoplasma suis* group and
120 *Mycoplasma felis* species available in GenBank® using MAFFT 7.110 (Katoh &
121 Standley, 2013) on the Guidance 2 server (Sela, Ashkenazy, Katoh, & Pupko,
122 2015). Phylogenetic analyses on the 16S and 23S rRNA genes were performed
123 based on Bayesian inference (BI) using the Beast 1.8.0 package (Drummond,
124 Suchard, Xie & Rambaut, 2012). Three independent runs of 100,000,000
125 generations of Monte Carlo Markov Chain (MCMC) were performed, with one
126 sampling per 10,000 generations and a 10% burn-in. The substitution models
127 were estimated as GTR+G for the 16S rRNA and the 23S rRNA genes, based on
128 the Akaike information criterion (AIC) using jModeltest 2.1.10 (Darriba, Taboada,
129 Doallo & Posada, 2012). Reconstructions were visualized using the FigTree 1.4.4
130 software (Rambaut, 2014). The 16S rRNA gene and 23S rRNA gene trees were
131 rooted with *Mycoplasma pneumoniae* (CP039761). Moreover, a haplotype
132 network for each fragment was estimated in the PopArt 1.7 (Leigh & Bryant, 2015)
133 using the median-joining method (Bandelt, Forster, & Röhl, 1999).

134

135

136

137 Results and Discussion

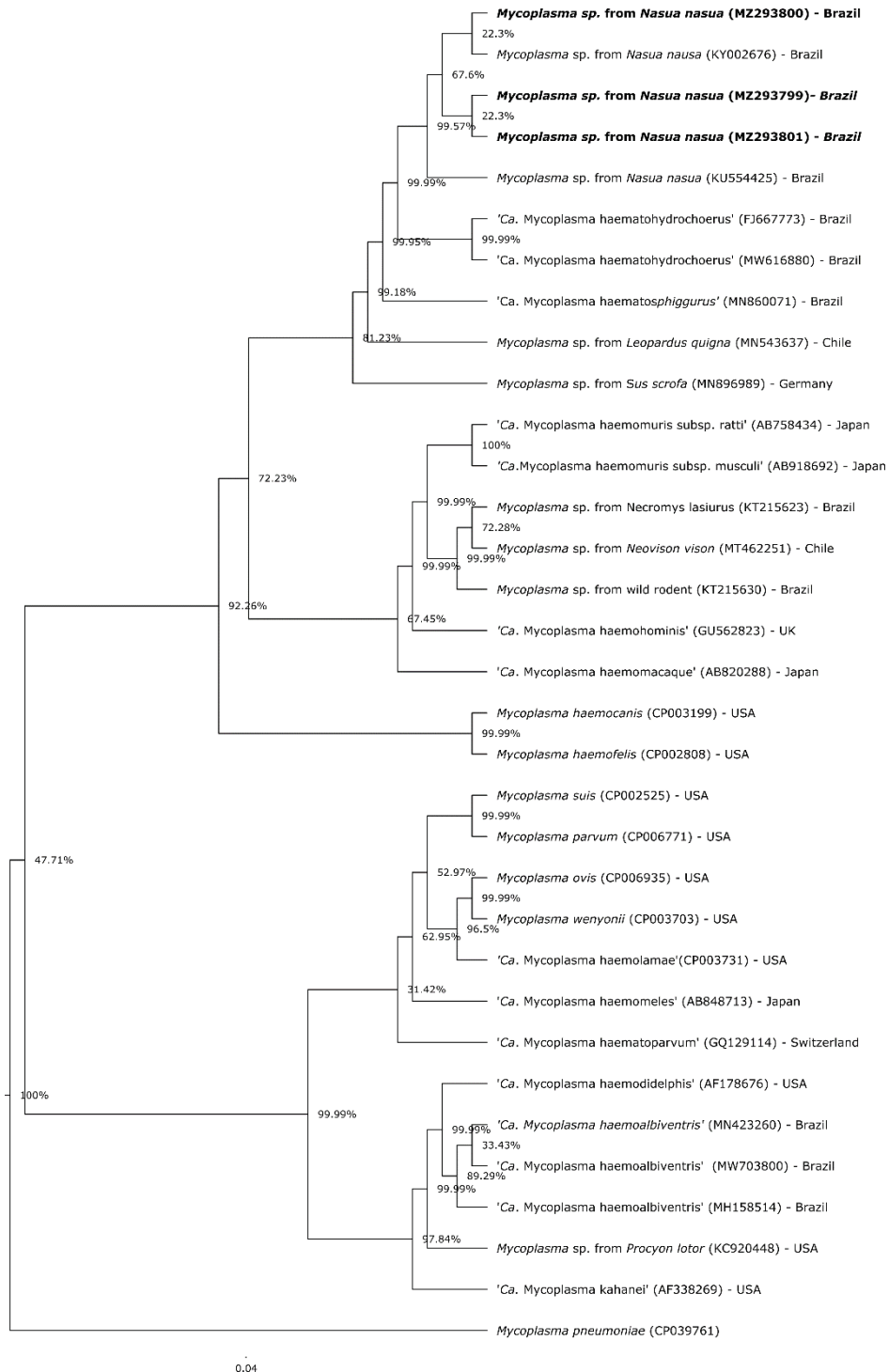
138 The *gapdh* gene was consistently amplified in all ring-tailed coati samples.
139 A total of 8/18 (44.44%; 95% CI: 24.56 – 66.28%) animals were positive for
140 hemotropic *Mycoplasma* spp. by the cPCR targeting the 16S and 23S rRNA
141 genes. Two out of eight hemoplasma-positive ring-tailed coati samples were
142 positive for hemotropic *Mycoplasma* sp. by the cPCR targeting the RNaseP gene.
143 One out of 18 (5,56%; 95% CI: 0.99 – 25.76%) ring-tailed coati tested positive for
144 *Ehrlichia/Anaplasma* sp. by the cPCR assay targeting the 16S rRNA gene, but all
145 samples tested negative by the cPCR assays for *Ehrlichia/Anaplasma* spp.
146 targeting *sodB*, *dsb* and *groEL* genes. All animals tested negative for
147 *Theileria/Babesia* spp.

148 Sequencing of the 16S rRNA gene fragments from three hemoplasma-
149 positive ring-tailed coatids revealed 99.42%-100% identity with multiple
150 hemotropic mycoplasmas 16S rRNA gene sequences detected in ring-tailed
151 coatids from Central-Western (KY002676, KY002668, KY002663, KY002660,
152 KY002659, KY002658, KY002656, KY002651, KU554425) and southern Brazil
153 (KU554425). In addition, the hemoplasmas 16S rRNA gene sequences detected
154 herein showed 96.39%-97.03% identity with '*Candidatus* Mycoplasma
155 haematohydrochoerus' detected in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from
156 Brazil (MW616880, MW616876, MW616875, FJ667773 and FJ667774).

157 Sequencing of the 23S rRNA gene fragments from hemoplasma-positive
158 ring-tailed coatids showed 93.40%-93.53% identity with the '*Candidatus*
159 Mycoplasma haemosphiggurus' detected in orange-spined hairy dwarf
160 porcupines (*Sphiggurus villosus*, formerly *Coendou villosus*) from southern Brazil
161 (MN692881), and 94.34%-94.12% identity with '*Ca. M. haematohydrochoerus*'
162 from capybaras from Southern and Central-western Brazil (MW617212,
163 MW617213, MW617215, MW617216 and MW617218). Unfortunately, multiple
164 attempts to sequence the RNaseP gene of hemoplasmas and the 16S rRNA gene
165 of the *Ehrlichia/Anaplasma* sp. detected have failed due to the occurrence of faint
166 bands in the agarose gel electrophoresis.

167 Phylogenetic analyses on the 16S rRNA and 23S rRNA genes of the
168 hemoplasmas detected herein clustered together with those of the *Mycoplasma*
169 *haemofelis* group (Figures 1 and 2). Hemoplasmas sequences obtained from
170 ring-tailed coatids clustered together (Figure 1) with hemotropic *Mycoplasma* sp.

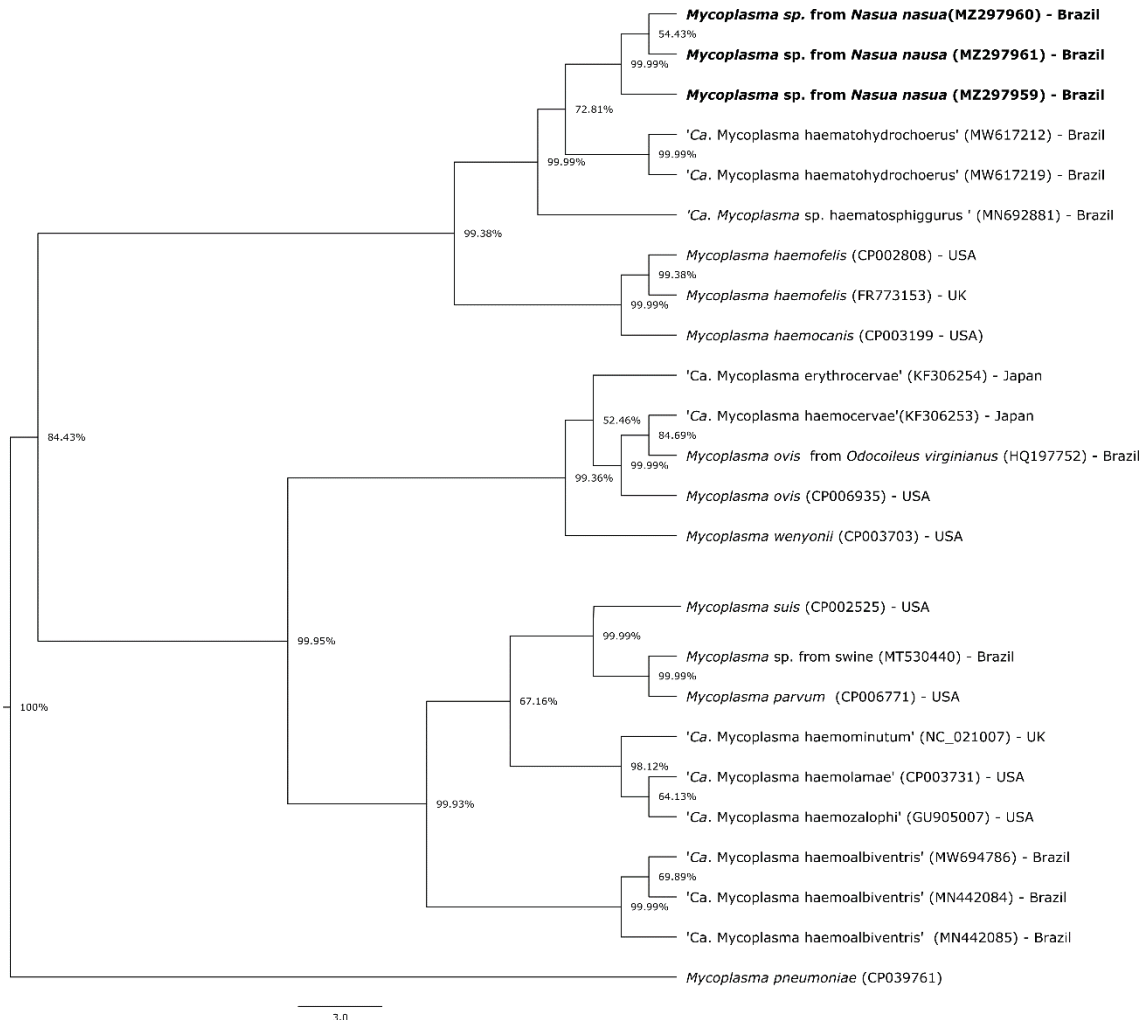
171 sequences previously detected in ring-tailed coatis from Central-western
 172 (KY002676) and southern (KU554425) Brazil, with high support branch (i.e.
 173 posterior probabilities) for the closely related 'Ca. *M. haematohydrochoerus*'
 174 described in capybaras from Brazil (FJ667773 and MW616880) (Figure 1).



175

176 Figure 1. The consensus sequences were subjected to multiple alignment with the sequences
 177 selected from GenBank® using MAFFT available on the GUIDANCE2 server (Sela et al., 2015).
 178 The best-fit model of nucleotide substitution was determined using jModeltest v.2.

179 The 23S rRNA gene sequences were closely positioned to 'Ca. *M.*
 180 haematohydrochoerus' (MW617212 and MW617219) and 'Ca. *M.*
 181 haemosphiggurus' (MN692881) but in separates clades supported by high
 182 posterior probabilities (Figure 2).

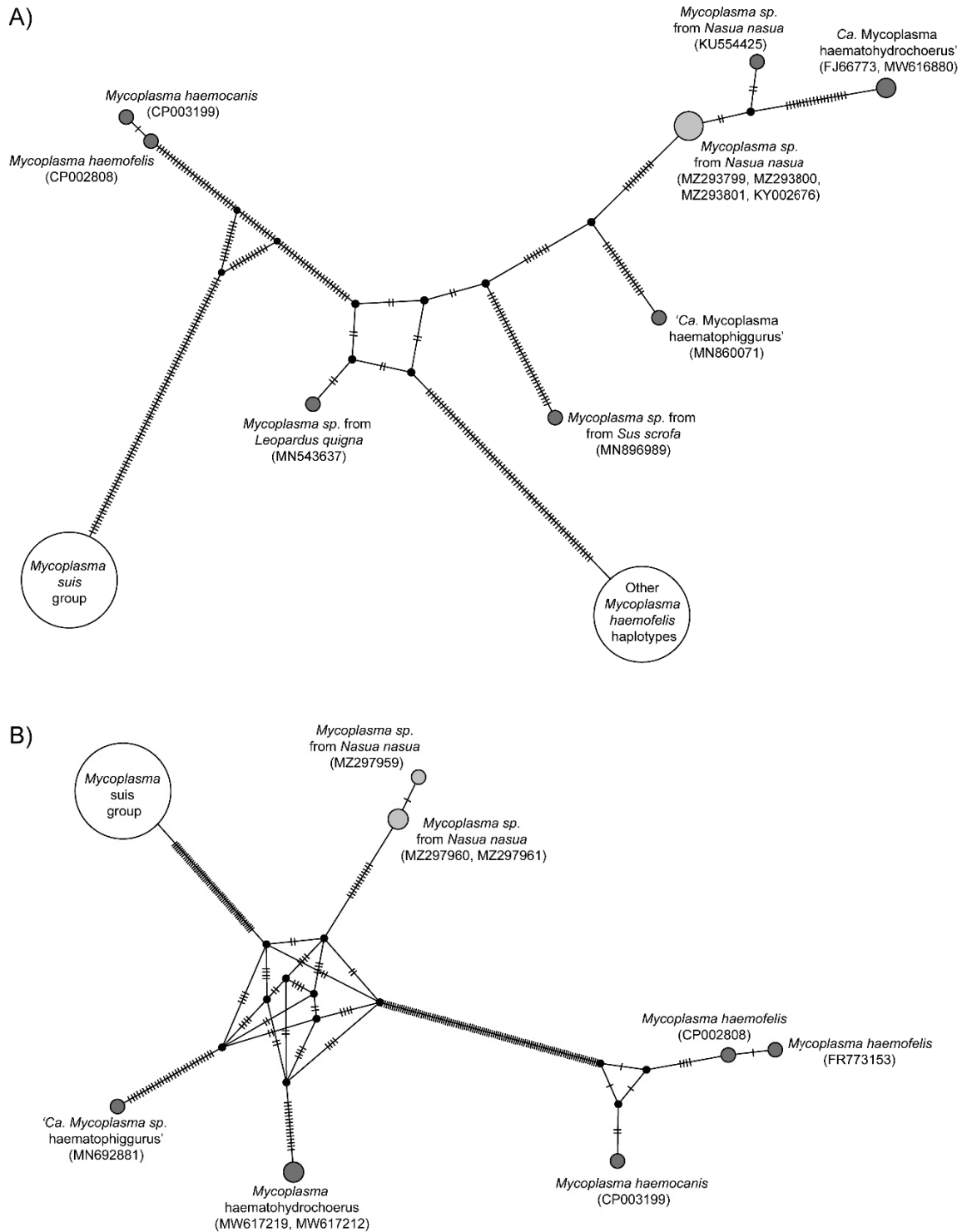


183
 184 Figure 2. The consensus sequences were subjected to multiple alignment with the sequences
 185 selected from GenBank® using MAFFT available on the GUIDANCE2 server (Sela et al., 2015).
 186 The best-fit model of nucleotide substitution was determined using jModeltest v.2.

187
 188 The haplotype networks support these results (Figure 3A and 3B). Our
 189 sequences were assigned in the *M. haemofelis* group as isolated genotypes, with
 190 high number of mutations to the hypothetical haplotypes that link these
 191 sequences with the sequences of the other species (11-14 and 13 mutations in
 192 the 16S and 23S networks, respectively).

193 Herein, 44.44% ring-tailed coatis from the INP, southern Brazil were
 194 positive for hemotropic *Mycoplasma* sp. The 16S rRNA gene sequences
 195 confirmed that ring-tailed coatis were infected by a novel hemoplasma species

196 previously detected in ring-tailed coatis from Central-western and southern Brazil
 197 (Cubilla et al., 2017; Sousa et al., 2017), and closely related to 'Ca. M.
 198 haematohydrochoerus'.
 199



200

201 Figure 3. Neighbor-Net analysis of 16S rRNA and 23S rRNA sequences obtained from ring-tailed
 202 coatis sampled in the present study and compared to related hemoplasmas sequences previously
 203 deposited in GenBank.

204 The 16S rRNA gene sequences from the novel hemotropic *Mycoplasma*
205 sp. of the ring-tailed coatis were closely related to 'Ca. M. haematohydrochoerus'
206 detected in capybaras from Brazil, but with only a 97% identity score and
207 separated from it by a high branch support. A previous study has proposed a
208 *Candidatus* status for the hemoplasma species detected in coatis from Central-
209 western Brazil, based on the 16S rRNA and RNaseP genes (Sousa, 2017).
210 Drancourt and Raoult (2005) stated that if the similarity in the 16S rRNA gene
211 sequence between bacterial isolates were less than 97%, they would belong to
212 different species. Moreover, novel '*Candidatus Mycoplasma*' species have been
213 determined worldwide based on the 16S rRNA, 23S rRNA and/or RNaseP gene
214 sequencing and phylogenetic analysis (Barker et al., 2011; Pontarolo et al., 2020;
215 Valente et al., 2020, Vieira et al., 2021). On this pattern, the 23S rRNA sequences
216 amplified in the present study showed only 94.3% to 94.1% identity to 'Ca. M.
217 haematohydrochoerus'. Unfortunately, multiple attempts to sequence the
218 RNaseP gene of the hemoplasma species detected herein failed due to the
219 occurrence of faint bands in agarose gel electrophoresis. Accordingly, based on
220 the 16S rRNA and 23S rRNA gene sequences amplified in the present study, the
221 name '*Candidatus Mycoplasma haematonasua*' is proposed for this novel
222 organism.

223 '*Candidatus Mycoplasma haematonasua*' has been previously observed
224 by light and scanning electron microscopy of coati's blood smears as small
225 basophilic epierythrocytic structures of coccoid shape, individually attached and
226 often more than one per erythrocyte, or freely on smears, with 0.2–0.4 μm in
227 diameter (Cubilla et al., 2017). Although the packed cell volume from captive
228 coatis infected by this novel hemoplasma species were within the reference
229 values for the species in a previous study (Cubilla et al., 2017), further studies
230 should be conducted to evaluate the clinical impact of 'Ca. M. haematonasua'
231 infection in ring-tailed coatis.

232 The phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene sequences showed that
233 the hemoplasma detected in ring-tailed coatis grouped with other hemoplasma
234 sequences previously detected in coatis from Brazil, and clustered separated
235 from 'Ca. M. haematohydrochoerus' detected in capybaras, supported by a
236 posterior probability of 99.95%. Corroborating this finding, the Neighbor-net
237 network analysis evidenced the genetic distinction among the hemoplasma

238 species circulating in ring-tailed coatis and other mammal species from Brazil.
239 Additionally, phylogenetic analysis of the 23S rRNA gene sequences showed that
240 'Ca. M. haematonasua' clustered separated from 'Ca. M. haematohydrochoerus,
241 supported by a posterior probability of 72.81%. Corroborating this finding, the
242 Neighbor-Net network analysis evidenced the genetic distinction between 'Ca. M.
243 haematonasua' and other hemoplasma species.

244 The transmission of hemoplasmas by ixodid ticks still requires further
245 investigation. To date, although *Mycoplasma haemocanis* has been
246 experimentally transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) ticks in
247 dogs (Seneviratna, Weerasinghe, & Ariyadasa, 1973), a previous study failed in
248 detecting hemoplasmas in *R. sanguineus* s.l. ticks in an animal shelter (Aktas &
249 Ozubek, 2017), and in *Amblyomma dubitatum* ticks from capybaras (Gonçalves
250 et al., 2020). Conversely, hemotropic *Mycoplasma* sp. were detected in 1/33
251 (3.33%) *Amblyomma sculptum* adult tick (Gonçalves et al., 2020) and 1/11
252 (9.09%) *A. dubitatum* adult ticks' salivary glands (Vieira et al., 2021) found
253 parasitizing hemoplasma-infected capybaras from Central-western and Southern
254 Brazil, respectively. Unfortunately, ticks infesting ring-tailed coatis were not
255 collected in the present study. It is important to highlight that the transmission of
256 hemoplasmas through aggressive interactions may occur between cats (Museux
257 et al., 2009) and wild rodents (*Gerbillus andersoni*) (Cohen et al., 2018).
258 Considering that hemoplasma species from animals have already been found
259 infecting and causing infectious anemia in humans (dos Santos et al., 2008; Yuan
260 et al., 2009; Sykes et al., 2010; Maggi et al., 2013), associated to the fact that
261 'Candidatus Mycoplasma haematomominis', which causes disease in humans,
262 probably has its natural host in bats (Milla'n et al., 2020; Descloux et al., 2020),
263 the zoonotic potential of 'Ca. M. haematonasua' may be considered, particularly
264 in the INP.

265 In Brazil, the detection of new genotypes of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma*
266 spp. in wild carnivores (André et al., 2010; 2012; André, 2018), deer (Sacchi et
267 al., 2012), wild rodents (Benevenuto et al., 2017), opossums (Guimarães et al.,
268 2019) and Xenarthra mammals (Calchi et al., 2020) indicate a great diversity of
269 Anaplasmataceae agents circulating in wild mammals. On this pattern, screening
270 wild animals for Anaplasmataceae agents, especially those that are closely
271 related to species previously detected in humans, is of great importance. In a

272 previous study, 31 ring-tailed coatis from Brazilian Pantanal were screened for
273 Anaplasmataceae agents by serological and molecular assays, and only one
274 animal was reactive to *E. canis* antibodies and tested positive by a cPCR assay
275 for 16S rRNA gene of *Ehrlichia* spp. Phylogenetic analysis showed that the
276 *Ehrlichia* species detected in ring-tailed coati was close related to multiple
277 *Ehrlichia* spp. previously detected in ticks and wild rodents from Brazil (de Sousa
278 et al., 2017). Herein, although one ring-tailed coati has tested positive for
279 *Ehrlichia/Anaplasma* sp. by the cPCR assay targeting the 16S rRNA gene, the
280 animal tested negative by the cPCR assays for *Ehrlichia/Anaplasma* spp.
281 targeting *sodB*, *dsb* and *groEL* genes. Unfortunately, multiple attempts to
282 sequence the 16S rRNA gene of the *Ehrlichia/Anaplasma* sp. detected were
283 unsuccessful due to the low DNA concentration.

284 In a previous study, three/31 (9.6%) ring-tailed coatis from Central-western
285 Brazil amplified piroplasmid DNA sequences using a PCR protocol for
286 *Hepatozoon* based on 18SrRNA gene, with the amplified sequences showing
287 100% of identity with a *Theileria* sp. sequence obtained from a domestic cat
288 sampled in Brazil and closely related to *Theileria equi* (de Sousa et al., 2018).
289 Additionally, *Theileria*-suggestive piroplasmid inclusions were found in a coati
290 blood smear (de Sousa et al., 2018). In the present study, animals tested negative
291 for *Babesia/Theileria* sp. by cPCR. Further studies should be conducted to
292 characterize the *Theileria* species infecting ring-tailed coatis from Brazil.

293 In conclusion, a potentially novel hemoplasma species has been identified
294 by 16S and 23S rRNA gene sequence analysis in ring-tailed coatis in INP
295 southern of Brazil. The name '*Candidatus Mycoplasma haematonasua*' is
296 proposed for this novel organism that should be further fully characterized.

297

298 **Acknowledgements**

299 This study is part of a Master's degree for Flávia C. M. Collere at the Universidade
300 Federal do Paraná. Flávia C. M. Collere was sponsored by a fellowship from the
301 the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) at
302 the time of research. The Brazilian National Council of Scientific and
303 Technological Development (CNPq) provided a fellowship of research
304 productivity (PQ) to Dr. Marcos R André (CNPq - 309520/2017-7) and Dr. Rafael

305 F.C. Vieira (CNPq - 313161/2020-8). Dr. Estevam G. Lux Hoppe is provided by
306 PET/MEC-SESu a fellowship for tutorial education.

307

308 **Conflict of interest**

309 The authors declare no conflicts of interest.

310

311 **Ethical approval**

312 This study was approved by the Ethics Committee in Animal
313 Experimentation and Animal Welfare at the Universidade Federal do Parana
314 (UFPR) (protocol number 044/2020). Animal and laboratory procedures were
315 approved and performed under regulations of the Chico Mendes Institute for
316 Biodiversity Conservation (ICMBio, protocol number 72893-1).

317

318 **References**

319 Almeida, A. P., Marcili, A., Leite, R. C., Nieri-Bastos, F. A., Domingues, L. N.,
320 Martins, J. R., & Labruna, M. B. (2012). Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros*
321 *rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3, 203–206.
322 [doi:10.1016/j.ttbdis.2012.02.003](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.02.003)

323

324 André, M.R. (2018). Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neoehrlichia* Agents in
325 Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic
326 Animal Health and Wildlife Conservation. *Front. Vet. Sci.*
327 [doi:org10.3389/fvets.2018.00293](https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00293)

328

329 André, M.R., Adania, C.H., Machado R.Z., Allegretti, S.M., Felipe, P.A.N., Silva,
330 K.F., Nakaghi, A.C.H. (2010). Molecular and Serologic Detection of *Ehrlichia* spp.
331 in Endangered Brazilian Wild Captive Felids. *J Wildl Dis.* 3, 1017–1023.
332 [doi:10.7589/0090-3558-46.3.1017](https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.1017)

333

334 André, M.R., Dumler, J.S., Scorpio, D.G., Teixeira, R.H.F., Allegretti, S.M.,
335 Machado, R.Z. (2012) Molecular detection of tick-borne bacterial agents in
336 Brazilian and exotic captive carnivores. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3, 247–
337 253. [doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.04.002](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.04.002)

- 338 Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring
339 intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
340 doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
341
- 342 Barker EN, Helps CR, Neimark H, Peters IR, Peters W, Tasker S. (2011). A novel
343 haemoplasma species identified in archived primate blood smears. *Veterinary*
344 *Microbiology*, 149, 478-481. doi:10.1016/j.vetmic.2010.11.016
345
- 346 Beisiegel, B.M., Mantovani, W. (2006). Habitat use, home range and foraging
347 preferences of the coati *Nasua nasua* in a pluvial tropical Atlantic forest area.
348 *Journal of Zoology*, 269, 77–87. doi:10.1111/j.1469-7998.2006.00083.x
349
- 350 Benevenuto, J.L., Dumler, J.S., Ogrzewalska, M., Roque, A.L.R., Mello, V.V.C.,
351 de Souza, K.C.M., ... André, M.R. (2017). Assessment of a quantitative 5'
352 nuclease real-time polymerase chain reaction using *groEL* gene for Ehrlichia and
353 Anaplasma species in rodents in Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8, 646-
354 656. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.04.011.
355
- 356 Bittner, G.C., Ritter, H.N., Hans, N.G., Morais, M.O., Hans, G.F., Haddad, V.J.
357 (2010). Coati (*Nasua nasua*) attacks on humans: case report. *Wilderness &*
358 *Environmental Medicine*, 21, 349-52. doi: 10.1016/j.wem.2010.09.005.
359
- 360 Calchi, A.C., Vultão, J.G., Alves, M.H., Yogui D.R., Desbiez, A.L.J., De Santi, M.,
361 ... André, M.R. (2020). *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in Xenarthra mammals
362 from Brazil, with evidence of novel 'Candidate Anaplasma spp.'. *Sci Rep* 10,
363 12615. doi:10.1038/s41598-020-69263-w
364
- 365 Cohen, C., Shemesh, M., Garrido, M., Messika, I., Einav, M., Khokhova, I.,
366 Tasker, S., Hawlena, H. (2018). Hemoplasmas in wild rodents: routes of
367 transmission and infection dynamics. *Molecular Ecology*, 27, 3714–3726.
368 doi:10.1111/mec.14826
369
- 370 Compton, S.M., Maggi, R.G., Breitschwerdt, E.B. (2012). 'Candidate
371 *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs

372 from the United States. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious*
373 *Diseases*, 35, 557– 562. doi:10.1016/j.cimid.2012.06.004

374

375 Cubilla, M.P., Santos, L.C., de Moraes, W., Cubas, Z.C., Leutenegger, C.M.
376 Estrada, M., ... Sykes, J.E. (2017). Microscopic and molecular identification of
377 hemotropic mycoplasmas in South American coatis (*Nasua nasua*). *Comparative*
378 *Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 53, 19-25.
379 doi:10.1016/j.cimid.2017.06.004.

380

381 Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: More
382 models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
383 doi:10.1038/nmeth.2109

384

385 de Sousa, K.C.M., Calchi, A.C., Herrera, H.M., Dumler, J.S., Barros-Battesti,
386 D.M., Machado, R.Z., André, M.R. (2017). Anaplasmatataceae agents among wild
387 mammals and ectoparasites in Brazil. *Epidemiology and Infection*, 16, 3424-
388 3437. doi: 10.1017/S095026881700245X.

389

390 de Sousa, K.C.M., Fernandes, M.P., Herrera, H.M., Freschic, C.R., Machado,
391 R.Z., André, M.R. (2018). Diversity of piroplasmids among wild and domestic
392 mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks and Tick-Borne*
393 *Diseases*, 9,245-253. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.09.010

394

395 Drancourt, M., Raoult, D. (2005). Sequence-based identification of new bacteria:
396 a proposition for creation of an orphan bacterium repository, *Journal of Clinical*
397 *Microbiology*, 43, 4311–4315. doi:10.1128/JCM.43.9.4311-4315.

398

399 Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut A. (2012). Bayesian
400 phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*,
401 29, 1969-1973. doi:10.1093/molbe v/mss075

402

403 Gompper, M.E., Decker, D.M. (1998). *Nasua nasua*. *Mammalian Species*, 580,
404 1–9. doi:10.2307/3504444

- 405 Gonçalves, L.R., Herrera, H.M., Nantes, W.A.G., Santos, F.M., Porfírio, G.E.O.,
406 Barreto, W.T.G., ...André, M.R. (2020). Genetic diversity and lack of molecular
407 evidence for hemoplasma cross-species transmission between wild and
408 synanthropic mammals from Central-Western Brazil. *Acta Tropica*, 203, 105303.
409 doi:10.1016/j.actatropica.2019.105303.
- 410
- 411 Guimarães, A., Raimundo, J.M., Silva, A.T.D., Carpintero, F.M., Pires, J.R.,
412 Benevenuto, J.L., ..., Baldani, C.D. (2019). Detection of a putative novel genotype
413 of Ehrlichia sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Rev Bras Parasitol*
414 *Vet.* 28, 140-144. doi: 10.1590/S1984-296120180068.
- 415
- 416 Hirata, M., Tateno, M., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., ...Endo,
417 Y. (2012). An Epidemiological Survey of Hemoplasma Infection in Iriomote Cats
418 (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*). *The Journal of Veterinary Medical*
419 *Science*, 74, 1531–1537. doi:10.1292/jvms.12-0094
- 420
- 421 Hoelzle, K., Winkler, M., Kramer, M.M., Wittenbrink, M.M., Dieckmann, S.M.,
422 Hoelzle, L.E. (2011). Detection of 'Candidatus Mycoplasma haemobos in cattle
423 with anaemia. *Veterinary Journal*, 3, 408–410. doi:10.1016/j.tvjl.2010.01.016
- 424
- 425 Katoh, K., Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software
426 version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and*
427 *Evolution*, 30, 772-780. doi:10.1093/molbev/mst010
- 428
- 429 Labruna, M.B., Jorge, R.S., Sana, D.A., Jácomo, A.T., Kashivakura, C.K.,
430 Furtado, M.M., ...Barros-Battesti, D.M. (2005). Ticks (Acari: Ixodida) on wild
431 carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 36, 149-63. doi:
432 10.1007/s10493-005-2563-1.
- 433
- 434 Laurance, W. F., Lovejoy, T. E., Vasconcelos, H. L., Bruna, E. M., Didham, R. K.,
435 Stouffer, ... Sampaio, E. (2002). Ecosystem decay of Amazonian Forest
436 fragments: A 22-year investigation. *Conservation Biology*, 16, 605–618.
437 doi:10.1046/j.1523-1739.2002.01025.x
- 438

- 439 Lee, S.H., Kim, N., Kwak, D. (2017). First clinical case of canine granulocytic
440 anaplasmosis in Korea and genotypic analyses of *Anaplasma phagocytophilum*
441 *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4, 462-465. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.02.003.
442
- 443 Leigh, J. W., Bryant, D. (2015). Popart: Full-feature software for hap- lotype
444 network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110–1116.
445 doi:10.1111/2041-210X.12410
446
- 447 Machado, C.A.L., Vidotto, O., Conrado, F.O., Santos, N.J.R., Valente, J.D.M.,
448 Barbosa, I.C, et al. (2017). *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from
449 northeastern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious*
450 *Diseases*, 55, 1-5. doi:10.1016/j.cimid.2017.08.004.
451
- 452 Magalhães, P.C., Moraes, M.F.D., Valim, J.R.A., Castro, G.N.S., Santos, P.N.,
453 Manier, B.S.M.L. and Fonseca, A.H. (2017). "Ticks (Acari: Ixodidae) and lice
454 (Phthiraptera: Trichodectidae) infesting free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus,
455 1766) with sylvatic and synanthropic habits in the Atlantic rainforest of Southern
456 Brazil. *Systematic and Applied Acarology*, 22, 779-784. doi:10.11158/saa.22.6.3
457
- 458 Maggi, R.G., Compton, S.M., Trull, C.L., Mascarelli, P.E., Mozayeni, B.R.,
459 Breitschwerdt, E.B. (2013). Infection with hemotropic Mycoplasma species in
460 patients with or without extensive arthropod or animal contact. *Journal of Clinical*
461 *Microbiology*, 51, 3237–3241. doi:10.1128/JCM.01125-13.
462
- 463 Messick, J.B., (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and
464 new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33, 2–13.
465 doi:10.1111/j.1939-165x.2004.tb00342.x
466
- 467 Michelazzo, M.D.M.Z., Oliveira, T.E.S.D., Viana, N.E., de Moraes W., Cubas,
468 Z.S., Headley, S.A. (2020). Immunohistochemical evidence of canine
469 morbillivirus (canine distemper) infection in coatis (*Nasua nasua*) from Southern
470 Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 78–184.
471 doi:10.1111/tbed.13456

- 472 Millán, J., Di Cataldo, S., Volokhov, D.V., Becker, D.J. (2020). Worldwide
473 occurrence of haemoplasmas in wildlife: Insights into the patterns of infection,
474 transmission, pathology and zoonotic potential. *Transboundary and Emerging*
475 *Diseases*, online ahead of print. doi:10.1111/tbed.13932
476
- 477 Mongrue, A.C.B., Spanhol, V.C., Valente, J.D.M., Porto, P.P., Ogawa, L.,
478 Otomura, F., et al. (2020). Survey of vector-borne and nematode parasites
479 involved in the etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil.
480 *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29. doi:10.1590/S1984 -
481 29612020062
482
- 483 Neimark, H., Peters, W., Robinson, B.L., Stewart, L.B. (2005). Phylogenetic
484 analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the
485 genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and request for an
486 opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55,
487 1385–1391. doi: 10.1099/ijs.0.63437-0
488
- 489 Peters, I.R., Helps, C.R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M.R., Gruffydd-
490 Jones, T.J., ... Tasker, S., (2008). RNase P RNA gene (*rnpB*) phylogeny of
491 hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. *Journal of Clinical Microbiology*,
492 46, 1873–1877. doi: 10.1128/JCM.01859-07
493
- 494 Pontarolo, G.H., Kühl, L.F., Pedrassani, D., Campos, M., Figueiredo, F.B.,
495 Valente, J.D.M., ... de Barros Filho, I.R. (2021). 'Candidatus *Mycoplasma*
496 *haemoalbiventris*', a novel hemoplasma species in white-eared opossums
497 (*Didelphis albiventris*) from Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68,
498 565 - 572. doi: 10.1111/tbed.13716.
499
- 500 Quorollo, B.A., Davenport, A.C., Sherbert, B.M., Grindem, C.B., Birkenheuer, A.J.,
501 Breitschwerdt, E.B. (2013). Infection with Panama Mountain *Ehrlichia* sp. in a Dog
502 with Atypical Lymphocytes and Clonal T-Cell Expansion. *Journal of Veterinary*
503 *Internal Medicine*, 27, 1251-1255. <https://doi.org/10.1111/jvim.12148>
504

- 505 Rambaut, A. FigTree. 2014. v1.4.5, a graphical viewer of phylogenetic trees.
506 Available on: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
507
- 508 Sacchi, A.B.V., Duarte, J.M.B., André, M.R., Machado, R.Z. (2012). Prevalence
509 and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging
510 Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Comparative Immunology,*
511 *Microbiology and Infectious Diseases.* 4, 325-334.
512 doi:10.1016/j.cimid.2012.02.001.
513
- 514 Sazima I. (2010). What coatis and mongooses have in common? *Biota*
515 *Neotropica*, 10. doi:10.1590/S1676-06032010000300040
516
- 517 Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., Pupko, T. (2015). Guidance 2: Accurate
518 detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of
519 multiple parameters. *Nucleic Acids Research*, 43, 7-14. doi:10.1093/nar/gkv318
520
- 521 Sousa, K.C.M., Herrera, H.M., Secato, C.T., Oliveira, A.V., Santos, F.M., Rocha,
522 F.L., ... André, M.R. (2017). Occurrence and molecular characterization of
523 hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. *Acta*
524 *Tropica*, 171, 172-181. doi:10.1016/j.actatropica.2017.03.030
525
- 526 Suzin, A., Vogliotti, A., Nunes, P.H., Barbieri, A.R.M., Labruna, M.B., Szabó,
527 M.P.J. (2020) Free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the Iguaçu National Park,
528 Brazil: Temporal dynamics and questing behavior on vegetation. *Ticks and Tick-*
529 *Borne Diseases*, 11, 101-471. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101471.
530
- 531 Tasker, S., Hofmann-Lehmann, R., Belák, S., Frymus, T., Addie, D.D., Pennisi,
532 M.G., ... Möstl, K. (2018). Haemoplasmosis in cats: European guidelines from
533 the ABCD on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and*
534 *Surgery*, 20, 256–261. doi: 10.1177/1098612X18758594.
535
- 536 Trovati, G.R., Brito, B.A., Duarte, J.M.B., (2010). Habitat use and home range of
537 brown-nosed coati, (*Nasua nasua*) Carnivora: Procyonidae in the Brazilian

538 cerrado biome. *Revista de Biologia Tropical*, 58, 1069–1077. doi:
539 10.1177/1098612X18758594.

540

541 Valente, J.D.M., Saldanha, A., Martini, R., Lange, R.R., Baggio, R.A., Martins,
542 T.F., ... Vieira, R.F.C. (2021) '*Candidatus* Mycoplasma haemosphiggurus' a novel
543 haemoplasma species in orange-spined hairy dwarf porcupines (*Sphiggurus*
544 *villosus*) from Southern Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68, 1054-
545 1061. doi:10.1111/tbed.13801

546

547 Vieira, R.F.C., Santos, N.J.R., Valente, J.D.M., Santos, L.P., Lange, R.R., Duque,
548 J.C.M., Vieira, T.S.W.J. (2021) '*Candidatus* Mycoplasma haematohydrochoerus',
549 a novel hemoplasma species in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from
550 Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 30. doi:10.1016/j.meegid.2021.104988.

551

552 Willi, B., Boretti, F.S., Tasker, S., Meli, M.L., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H.,
553 Hofmann-Lehmann, R. (2007). From Haemobartonella to hemoplasma:
554 Molecular methods provide new insights. *Veterinary Microbiology*, 125, 197–209.
555 doi: 10.1016/j.vetmic.2007.06.027

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Realizar o perfil sanitário de animais silvestres é crucial para a manutenção da saúde de uma população e seus contactantes. Neste estudo, uma potencial nova espécie de hemoplasma foi identificada e caracterizada molecularmente por meio da análise genética dos genes 16S e 23S rRNA em quatis-de-cauda-anelada no PNI, sul do Brasil, e foi proposta a denominação '*Candidatus Mycoplasma haematonasua*' para este novo micro-organismo.

Ainda, a realização de análises hematológicas completas é importante para melhor elucidarmos as possíveis alterações bioquímicas e hematológicas nos quatis infectados, uma vez que o perfil clínico-laboratorial dos hemoplasmas nesta espécie animal ainda é desconhecido. Do mesmo modo, a triagem de animais silvestres para agentes Anaplasmataceae é de grande importância, entretanto, apenas um animal testou positivo para *Ehrlichia/Anaplasma* sp. pelo ensaio de cPCR visando o gene 16S rRNA e várias tentativas de sequenciamento genético não foram bem sucedidas. Isso pode ser explicado devido à baixa concentração de DNA presente nas amostras ou ainda devido ao baixo número de pares de bases nas sequências genéticas geradas pelos primers utilizados nas reações.

Ademais, todos os animais neste estudo testaram negativo para *Babesia/Theileria* sp. por cPCR, portanto, mais ensaios devem ser realizados para caracterizar as espécies de Theileria que infectam quatis no Brasil.

Uma vez que os agentes da família Anaplasmataceae e os piroplasmas são patógenos transmitidos por carrapatos, e carrapatos podem ser potenciais vetores para a transmissão de hemoplasmas, a coleta de ectoparasitos é de suma importância para melhor elucidar a cadeia de transmissão dos hemoplasmas, bem como o perfil sanitário destes animais, uma vez que o PNI abriga grande diversidade desses invertebrados.

7. CONCLUSÃO

Os quatis-de-cauda anelada são conhecidos pelo hábito sociável com humanos, entretanto, a busca por alimentos pode resultar em interações mais agressivas aos visitantes do parque. Uma vez que o potencial zoonótico desses agentes é desconhecido, e acidentes com mordeduras e arranhaduras podem ser potenciais vias de transmissão de hemoplasmas, a triagem de animais silvestres para hemoplasmas e patógenos transmitidos por carrapatos, especialmente aqueles que estão intimamente relacionados com espécies previamente detectadas em humanos, é de grande importância, principalmente em áreas de constante contato humano-animal, como no PNI.

8. REFERÊNCIAS

- 69
70
71 ANDRÉ, M. R., et al., Molecular and Serologic Detection of *Ehrlichia* spp. in
72 Endangered Brazilian Wild Captive Felids. *J Wildl Dis.* 3, 1017–1023, 2010.
73
74 ANDRÉ, M. R., et al., Molecular detection of tick-borne bacterial agents in
75 Brazilian and exotic captive carnivores. *Ticks and Tick-Borne Dis,* 3, 247–253,
76 2012.
77
78 BENEVENUTE, J. L. et al. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time
79 polymerase chain reaction using *groEL* gene for Ehrlichia and Anaplasma
80 species in rodents in Brazil. *Ticks and Tick-Borne Dis,* 8, 646-656, 2017.
81
82 CALCHI, A.C. et al. *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in Xenarthra mammals
83 from Brazil, with evidence of novel '*Candidatus Anaplasma* spp.'. *Sci Rep* 10,
84 12615, 2020.
85
86 COHEN, C. et al. Hemoplasmas in wild rodents: routes of transmission and
87 infection dynamics. *Molecular Ecology,* 27, 3714–372, 2018.
88
89 GUIMARÃES, A. et al. Detection of a putative novel genotype of Ehrlichia sp.
90 from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 28, 140-
91 144, 2019.
92
93 SACCHI, A. B. V. et al. Prevalence and molecular characterization of
94 Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus*
95 *dichotomus*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.*
96 4, 325-334, 2012.
97
98 TROVATI, G.R. et al. Habitat use and home range of brown-nosed coati, (*Nasua*
99 *nasua*) Carnivora: Procyonidae in the brazilian cerrado biome. *Rev. de Biol.*
100 *Trop.,* v. 58, n. 20, p. 256-261. 2018.

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 044/2020, referente ao projeto de pesquisa “**Levantamento sanitário de mastofauna em Curitiba e região metropolitana**”, sob a responsabilidade de **Rafael Felipe da Costa Vieira** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em 02/10/2020.

Finalidade	Pesquisa
Vigência da autorização	Novembro/2020 até Novembro/2025
Espécie/Linhagem	Diversas
Número de animais	Dependente da ocorrência em zonas urbanas e rodovias
Peso/Idade	Variável/Variável
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Animais de vida livre sob responsabilidade do ICMBio.

*A autorização para início da pesquisa se torna válida a partir da data de emissão deste certificado.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 044/2020, regarding the research project “**Health survey of mastofauna in Curitiba and metropolitan region**” under **Rafael Felipe da Costa Vieira** – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 10/02/2020.

Purpose	Research
Validity	November/2020 until November/2025
Specie/Line	Various
Number of animals	Dependent on occurrence in urban areas and highways
Weight/Age	Variable/Variable
Sex	Male and female
Origin	Wild animals under responsibility of ICMBio.

*The authorization to start the research becomes valid from the date of issue of this certificate.

Curitiba, 20 de outubro de 2020

**Simone Tostes de Oliveira Stedile
Coordenadora CEUA-SCA**

ANEXO 2 – TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA (ICMBio)



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 76984-1	Data da Emissão: 23/02/2021 20:40:20	Data da Revalidação*: 23/02/2022
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: RAFAEL F C VIEIRA	CPF: 041.694.404-39
Título do Projeto: Levantamento sanitário de mastofauna em Curitiba e região metropolitana	
Nome da Instituição: Universidade Federal do Paraná	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras insitu	01/2021	12/2023
2	Processamento de amostras	01/2021	12/2024
3	Recebimento de carcaças	01/2021	01/2023

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Andre Saldanha Ferreira	Manejo dos animais, coleta e processamento das amostras	102.517.026-18	Brasileira
2	Renato Silva de Sousa	Necropsias e coleta de amostras	893.025.839-53	Brasileira
3	Thalitha Samih Wischral Jayme Vieira	Coleta e processamento de amostras	042.856.639-10	Brasileira
4	Flávia Carolina Meira Collere	Coleta e processamento das amostras	081.430.749-35	Brasileira
5	Leonardo Pereira dos Santos	Manejo dos animais e coleta de amostras	020.163.289-67	Brasileira
6	Larissa Dantas Roeder Ferrari	Manejo dos animais, coleta e processamento de amostras	039.167.539-75	Brasileira
7	Eloisa Muehlbauer	Manejo e anestesia dos animais	079.230.609-08	Brasileira