



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MONICA TIEMI ALINE KAKIMORI

***Mycoplasma ovis* E PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR
CARRAPATOS EM CAVALOS E CARRAPATOS DE UM
ASSENTAMENTO RURAL DO SUL DO BRASIL**

Londrina
2022

MONICA TIEMI ALINE KAKIMORI

***Mycoplasma ovis* E PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR
CARRAPATOS EM CAVALOS E CARRAPATOS DE UM
ASSENTAMENTO RURAL DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros

Londrina
2022

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA OBRA ELABORADA PELO AUTOR, ATRAVÉS DO PROGRAMA DE GERAÇÃO AUTOMÁTICA DO SISTEMA DE BIBLIOTECAS DA UEL

K13m Kakimori, Monica Tiemi Aline .
Mycoplasma ovis E PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS EM CAVALOS E CARRAPATOS DE UM ASSENTAMENTO RURAL DO SUL DO BRASIL / Monica Tiemi Aline Kakimori. - Londrina, 2022.
56 f. : il.

Orientador: Rafael Felipe da Costa Vieira.
Coorientador: Luiz Daniel de Barros.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Horses - Tese. 2. Tick borne diseases - Tese. 3. Hemoplasms - Tese. 4. *Mycoplasma ovis* - Tese. I. Vieira, Rafael Felipe da Costa . II. de Barros, Luiz Daniel . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

MONICA TIEMI ALINE KAKIMORI

***Mycoplasma ovis* E PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR
CARRAPATOS EM CAVALOS E CARRAPATOS DE UM
ASSENTAMENTO RURAL DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa
Vieira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. João Luís Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Flávio Haragushiku Otomura
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UENP

Londrina, 21 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Expresso minha imensa gratidão primeiramente a Deus, por ter guiado meus passos e me sustentado durante toda jornada, por cada oportunidade e pela graça da vida, sem Ele nada seria possível.

Agradeço especialmente a minha mãe, Margarete Matsuko Kakimori, que sempre foi minha maior incentivadora, sempre acreditando e trazendo força quando tudo parecia impossível. Só ela sabe o quanto lutamos para que esse dia chegasse e o quanto fomos desacreditadas por isso. Essa vitória é sua também, minha fortaleza e exemplo de vida, te amo mais que tudo nesse mundo!

Agradeço ao meu namorado e amigo Jonas por todo o apoio, paciência e companheirismo, mesmo a distância em meio a pandemia. Meus agradecimentos também a Géssica e Janete, que em todos os momentos me acolheram como uma segunda família.

Aos meus amigos de jornada de Curitiba, Flávia (irmã de mestrado), Larissa e as queridas ICs do laboratório de doenças transmitidas por vetores. E aos amigos de Londrina, Ana Clécia, João Pedro, Juliana, Diego, Douglas, Erislaine e Ana Carolina que além de auxiliar na execução do projeto, fizeram cada momento se tornar mais leve.

Aos meus orientadores Prof^o Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira e Prof^o Dr. Luiz Daniel de Barros, a Dr^a Thállitha Samih Wischral Jayme Vieira, por auxiliarem de perto em todos os momentos, por todas as oportunidades inigualáveis que nos proporcionam como alunos e por todo ensinamento compartilhado. Ensinaamentos estes que vão muito além do mundo acadêmico e laboratorial, se extrapolam para o meio do controle emocional, princípios de vida e família.

Ao técnico do Laboratório de Parasitologia, Aldair por todo ensinamento e auxílio nas coletas, sendo nosso domador de equinos, piloto e amigo. E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente com nosso trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

Kakimori, Monica Tiemi Aline. ***Mycoplasma ovis* e patógenos transmitidos por carrapatos em cavalos e carrapatos de um assentamento rural do sul do Brasil.** 2022. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Patógenos transmitidos por carrapatos (PTC) são um importante grupo de organismos que podem afetar animais e seres humanos na América do Sul. Hemoplasmose em cavalos pode ser considerada uma infecção acidental ou incomum. Portanto, este estudo teve como objetivo determinar a ocorrência dos agentes como *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Ehrlichia* sp., e hemoplasmas em equinos de um assentamento rural, localizado no Sul do Brasil, identificar as espécies de carrapatos e determinar os fatores associados à exposição/infecção. Amostras de sangue de 22 cavalos foram triadas para anti-*T. equi* e anti-*Ehrlichia* spp. anticorpos por ensaios de anticorpos fluorescentes indiretos (IFA). As amostras também foram testadas por ensaios de PCR visando o gene 18S rRNA de *T. equi* e *B. caballi*, e o gene 16S rRNA de hemoplasmas. Além disso, ensaios de PCR direcionados ao gene 16S rRNA, proteína formadora de ligação dissulfeto (*dsb*) de *Ehrlichia* spp. também foram realizados. Carrapatos foram coletados dos animais (inspeção) e do ambiente (arrasto de flanela e armadilhas de gelo seco), estes foram identificados por meio de chave de identificação. Adicionalmente 28 carrapatos adultos provenientes dos animais e 4 ninfas provenientes do ambiente, tiveram as glândulas salivares extraídas e triadas para *Ehrlichia* spp. (*dsb* gene) e *Mycoplasma* spp. (16S gene). Anticorpos para *T. equi* e *Ehrlichia* spp. foram detectados em 22/09 (40,91%; IC 95%: 23,26-61,27%) e 22/07 (31,81%; IC 95%: 16,36-52,68%) cavalos, respectivamente. DNA de *T. equi*, *B. caballi* e *Mycoplasma* spp. foram encontrados em 13/22 (59,09%), 1/22 (4,55%) e 11/22 (50%) cavalos, respectivamente, e todos foram negativos para *Ehrlichia* spp. Todas as sequências apresentaram $\geq 99\%$ de identidade com múltiplas sequências de *T. equi* (18S rRNA), *B. caballi* (*rap-1*) e *Mycoplasma ovis* (16S rRNA) depositadas no GenBank. Todos os carrapatos adultos foram identificados como *Dermacentor nitens* 44/47 (93,62%) e *Rhipicephalus microplus* 3/47 (6,38%). Todas as glândulas salivares foram negativas para o gene *dsb* de *Ehrlichia* spp. Dois de 28 (7,14%) glândulas provenientes de adultos dos animais foram positivos por PCR convencional, 11/28 (39,29%) e duas de 4 ninfas (50%) provenientes do ambiente foram positivos por PCR real time para o gene 16S rRNA para *Mycoplasma* spp. Este é o primeiro relato de infecção por *M. ovis* em equinos no Brasil, utilizando técnicas moleculares. *Mycoplasma* spp. foi detectada em glândulas salivares de *D. nitens* e *R. microplus*, sendo necessários mais estudos para esclarecer a ação vetorial dessas espécies. Foi possível observar uma baixa ocorrência de *Ehrlichia* spp. e ausência de PCR positivo em região onde não foram encontrados carrapatos *Amblyomma sculptum*.

Palavras-chave: *Babesia caballi*; *Mycoplasma* hemotrópico; *Theileria equi*; *Dermacentor nitens*; *Ehrlichia* spp.

Kakimori, Monica Tiemi Aline. ***Mycoplasma ovis* and tick-borne pathogens in horses and ticks from a rural settlement from southern Brazil.** 2022. 56 p. Dissertations (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Tick-borne pathogens (TBP) are an important group of organisms that can affect animals and humans in South America. Hemoplasma in horses can be considered an accidental or unusual infection. Therefore, this study aimed to determine the occurrence of agents such as *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Ehrlichia* sp., and hemoplasmas in horses from a rural settlement located in southern Brazil, identify the tick species and determine the factors associated with exposure/infection. Blood samples from 22 horses were screened for anti-*T. equi* and anti-*Ehrlichia* spp. antibodies by indirect fluorescent antibody (IFA) assays. The samples were also tested by PCR assays targeting the 18S rRNA gene from *T. equi* and *B. caballi*, and the 16S rRNA gene from hemoplasmas. In addition, PCR assays targeting the 16S rRNA gene, a disulfide bond forming protein (*dsb*) from *Ehrlichia* spp. were also carried out. Ticks were collected from the animals (inspection) and from the environment (flannel trawling and dry ice traps), and they were identified by means of an identification key. Additionally, 28 adult ticks from the animals and 4 nymphs from the environment had their salivary glands extracted and screened for *Ehrlichia* spp. (*dsb* gene) and *Mycoplasma* spp. (16S gene). Antibodies to *T. equi* and *Ehrlichia* spp. were detected in 09/22 (40.91%; 95% CI: 23.26-61.27%) and 07/22 (31.81%; 95% CI: 16.36-52.68%) horses, respectively. DNA from *T. equi*, *B. caballi* and *Mycoplasma* spp. were found in 13/22 (59.09%), 1/22 (4.55%) and 11/22 (50%) horses, respectively, and all were negative for *Ehrlichia* spp. All sequences showed $\geq 99\%$ identity with multiple *T. equi* (18S rRNA), *B. caballi* (*rap-1*) and *Mycoplasma ovis* (16S rRNA) sequences deposited in GenBank. All adult ticks were identified as *Dermacentor nitens* 44/47 (93.62%) and *Rhipicephalus microplus* 3/47 (6.38%). All salivary glands were negative for *Ehrlichia* spp. by *dsb* gene. Two of 28 (7.14%) glands from adult animals were positive by conventional PCR, 11/28 (39.29%) and two of 4 nymphs (50%) from the environment were positive by real time PCR for the gene 16S rRNA for *Mycoplasma* spp. This is the first report of *M. ovis* infection in horses in Brazil, using molecular techniques. *Mycoplasma* spp. was detected in salivary glands of *D. nitens* and *R. microplus*, and further studies are needed to clarify the vectorial action of these species. It was possible to observe a low occurrence of *Ehrlichia* spp. and absence of positive PCR in region where *Amblyomma sculptum* ticks were not found.

Keywords: *Babesia caballi*; hemotropic *Mycoplasma*; *Theileria equi*; *Dermacentor nitens*; *Ehrlichia* spp.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	CARRAPATOS DE IMPORTÂNCIA EM EQUINOS	14
2.2	DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS (DTCs) EM EQUINOS	16
2.2.1	Piroplasmose	16
2.2.2	Erliquiose e Anaplasnose	18
2.3	MICOPLASMOSE HEMOTRÓPICA	19
	REFERENCIAS	21
4	OBJETIVO GERAL	28
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5	ARTIGO: <i>Mycoplasma ovís</i> and tick-borne pathogens in horses and salivary glands of ticks from rural settlement from Southern Brazil	35
	ANEXO 1. AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – UEL	62
	ANEXO 2. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	63

1 1 INTRODUÇÃO

2 As patógenos transmitidas por vetores (PTV), responsáveis por grandes
3 danos à saúde humana e produtividade animal,) tem aumentado em todo o
4 mundo, principalmente em países em desenvolvimento, tanto em animais
5 domésticos e silvestres, quanto em seres humanos (DANTAS-TORRES;
6 CHOMEL; OTRANTO, 2012; SALEEM et al., 2018). Devido a alterações
7 climáticas extremas, combinadas com mudanças socioeconômicas, os
8 carrapatos vem expandindo sua distribuição temporal, hospedeiros suscetíveis
9 e, por conseguinte, a transmissão de patógenos (SUTHERST, 2004).

10 No Brasil, equinos executam funções importantes que os fazem estar mais
11 expostos a picada de carrapatos, além de doenças transmitidas por carrapatos,
12 como por exemplo: atividades de lazer, alimentação, competição em eventos,
13 corridas equestres internacionais, transporte, equitação terapêutica, e tração
14 (HAUSBERGER et al., 2008; SALEEM et al., 2018). Além disso, o país é
15 apontado como líder no pódio de produção de equinos na América Latina com
16 aproximadamente 6 milhões de cabeças e como o quarto maior produtor mundial
17 (FAO, 2017; IBGE, 2020).

18 Responsável por regular diretrizes, recomendações internacionais e
19 medidas sanitárias em padrões, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE)
20 é responsável pela circulação de animais vivos, seus produtos e
21 regulamentação do comércio seguro, incluindo equídeos. Com o objetivo de
22 garantir a segurança sanitária do comércio internacional de animais terrestres
23 e seus produtos criou o Código Sanitário dos Animais Terrestres (*Terrestrial*
24 *Animal Health Code – TAHC*). O guia determina parâmetros concernentes à
25 principal doença transmitida por carrapatos que acomete equídeos
26 (piroplasmose equina), como requisitos que precisam ser certificadas por
27 autoridades veterinárias de países importadores e padrões diagnósticos (OIE,
28 2014, 2017), visto que, se não estiverem em conformidade, o transporte
29 internacional de animais pode ser restringido.

30 A principal doença transmitida por carrapatos em equinos é a
31 piroplasmose equina, causada pelos agentes *Theileria equi* e *Babesia caballi*.
32 As prevalências altas caracterizam determinadas regiões como endêmicas, em
33 que vários animais podem apresentar-se como persistentemente infectados

34 (SCOLES; UETI, 2015). Ademais, recentemente foi detectada no Brasil, por
35 métodos moleculares e sorológicos, uma potencial nova espécie de *Ehrlichia*, e
36 com base na análise filogenética dos genes 16S rDNA, *sodB* e *groEL*, é
37 provável que esta seja a mesma espécie descrita recentemente na Nicarágua
38 (O'NION et al., 2015; VIEIRA et al., 2016, 2018b). A falta de cuidados
39 veterinários, má nutrição, manejo inadequado e trabalho excessivo , podem
40 agravar os impactos destas infecções sobre os animais (SCOLES; UETI, 2015).
41 Por conseguinte, equinos expostos a essas condições, como animais
42 provenientes de um assentamento rural, podem encontrar-se mais vulneráveis
43 a infecção e apresentação de sinais clínicos de tais patologias.

44 2 REFERENCIAL TEÓRICO

45 2.1 CARRAPATOS DE IMPORTÂNCIA EM EQUINOS

46 *Dermacentor nitens* é a espécie de carrapatos mais comum parasitando
47 equinos e é extensamente distribuída no Brasil (LABRUNA et al., 2002). Embora
48 equinos sejam hospedeiros primários dessa espécie, existem relatos de
49 infestações naturais em outros animais domésticos e silvestres, como bovinos,
50 cães e onça-parda (BORGES; SILVA, 1994; FERREIRA; BEZERRA; AHID,
51 2010; MARTINS et al., 2015). Bovinos também podem ser considerados como
52 hospedeiros naturais *D. nitens*, porém o grau de infestação é baixo quando
53 comparado aos equinos, acreditando-se que o parasitismo em bovinos pode ser
54 acidental (BORGES; SILVA, 1994).

55 O carrapato *D. nitens* é monóxeno e possui predileção por infestar
56 áreas como orelhas, região perineal, crina e divertículo nasal de equinos
57 (BORGES; LEITE, 1993; LABRUNA et al., 2002). Infestações massivas são
58 capazes de ocasionar lesões, ou até mesmo danos permanentes à cartilagem
59 nas orelhas; lesões essas que podem propiciar o surgimento de infecções
60 secundárias e de miíases. (LABRUNA; AMAKU, 2006). *D. nitens* apresenta 3-4
61 gerações por ano, na região sudeste do Brasil, sendo que os maiores picos de
62 infestação ocorrem no primeiro semestre do ano e nos meses de setembro e
63 outubro (BORGES; OLIVEIRA; RIBEIRO, 2000; LABRUNA et al., 2002). Essa
64 espécie ocorre em propriedades com pasto com supercrescimento misto e
65 pastagens limpas, que fazem ou não corte de pastagem anualmente, sendo
66 bem adaptada a diferentes variações ambientais (LABRUNA et al., 2001). A
67 técnica de rotação de pastagens com descanso durante o verão não elimina a
68 ocorrência, porém pode diminuir a infestação (LABRUNA et al., 2001).

69 Conhecido popularmente como “carrapato estrela”, o *Amblyomma*
70 *cajennense sensu latum* é vastamente disseminado nas Américas (COOLEY;
71 KOHLS, 1944). No Brasil, está distribuído em todo o território nacional, sobre
72 tudo na região sudeste (VIEIRA et al., 2002). A espécie é responsável por
73 provocar perdas econômicas por alto custo com acaricidas e redução de
74 produtividade dos animais (CUNHA et al., 2007; OLIVEIRA, 2004; PRATA;

75 ALONSO; SANAVRIA; 1996). Equinos são tidos como os principais hospedeiros
76 domésticos desse artrópode (LABRUNA et al., 2002), no entanto, em virtude de
77 sua baixa especificidade parasitária, ele é capaz de infestar diferentes espécies
78 de animais domésticos, silvestres e seres humanos (ARAGÃO; FONSECA,
79 1961; PAROLA; RAOULT, 2001). Além disso, esse carrapato possui a
80 capacidade de transmissão de vários patógenos, entre eles o agente etiológico
81 da Febre Maculosa Brasileira, a bactéria *Rickettsia rickettsii*, uma das principais
82 doenças zoonóticas de interesse em saúde única em diversas regiões do Brasil
83 (PAROLA et al., 2013). *A. Cajennense* s.l. ainda é responsável por transmitir *T.*
84 *equi*, outro patógeno de transmissão zoonótica (SCOLES; UETI, 2013). Seu ciclo
85 de vida é trióxeno e alguns fatores são capazes de beneficiar a sua disseminação
86 em equinos, como o uso pastagens altas, presença de ervas e arbustos, além
87 do uso indiscriminado de tratamentos acaricidas químicos, propiciando a
88 manutenção de formas resistentes de carrapatos no ambiente (LABRUNA et al.,
89 2001).

90 *Rhipicephalus microplus*, popularmente conhecido como carrapato
91 bovino, é responsável por causar severos prejuízos econômicos na produção
92 animal, em áreas tropicais e subtropicais. Os impactos econômicos da
93 infestação estão relacionados as perdas como diminuição no ganho de peso,
94 aumento na taxa de mortalidade, menor rendimento na carcaça, menor
95 produção de carne, leite, risco de miíase e transmissão de doenças, além dos
96 gastos com medicamentos (RECK et al., 2014; ROCHA et al., 2011). Ainda que
97 tenha como hospedeiros preferencialmente bovinos, relatos de parasitismo em
98 outras espécies domésticas e silvestres têm sido documentados (DA SILVA et
99 al., 2018; SZABÓ et al., 2003). *R. microplus* foi descrito pela primeira vez em
100 1909 (ROHR, 1909) e de acordo com relatos de vários autores ao longo dos
101 anos, observa-se que a ocorrência de *R. microplus* em equinos, de diferentes
102 regiões do país, pode ser frequente (BARBOSA et al., 1995; BATTSETSEG et al.,
103 2002; HEUCHERT et al., 1999; KERBER et al., 2009; LABRUNA et al., 2001;
104 NOGUEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2013b). Além de ser responsável pela
105 transmissão de *T. equi* (UETI et al., 2005), demonstrando assim, a grande
106 importância dessa espécie na sanidade equina.

107 2.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS (DTCs) EM EQUINOS

108 2.2.1 PIROPLASMOSE

109 A mais importante doença parasitária que afeta equinos no mundo todo é
110 a piroplasmose equina (PE), uma doença transmitida por carrapatos, que (WISE
111 et al., 2013; ZOBBA et al., 2008). Causada por *T. equi* (anteriormente *B. equi*)
112 e *B. caballi*, hemoprotozoários pertencentes à ordem Piroplasmida. Muitos dos
113 protozoários dessa ordem foram classificados de acordo com a morfologia do
114 parasito e células hospedeiras, nas quais se observa a esquizogonia em
115 eritrócitos associado à manifestação da doença e especificidade do hospedeiro
116 (MANS; PIENAAR; LATIF, 2015). O gênero *Theileria* se diferencia por causar
117 primeiro uma infecção de leucócitos por esporozoítos, depois ocorre a maturação
118 de esquizontes em merozoítos e, apenas posteriormente, infectam eritrócitos
119 (UILENBERG, 2006). Por isso, algumas espécies do gênero *Babesia* foram
120 reclassificadas, como *T. equi* (MEHLHORN; SCHEIN, 1998).

121 A piroplasmose equina é endêmica na Ásia, e em grande parte da Europa,
122 África e Américas central e do Sul (OIE, 2014). É listada pela Organização
123 Mundial de Saúde Animal (OIE) como uma doença notificável, responsável pela
124 restrição internacional do tráfego dos animais infectados (OIE, 2017). A
125 ocorrência da doença é frequente em regiões tropicais, subtropicais e
126 temperadas, e a manutenção nas populações de equinos ocorre quando se tem
127 vetores artrópodes competentes (PASOLINI et al., 2018). O Brasil é endêmico
128 para *T. equi*, sendo que a prevalência é dependente de vários fatores como por
129 exemplo o tipo de criação dos animais e espécies de carrapatos existentes na
130 região estudada (HEIM et al., 2007).

131 A transmissão ocorre por meio carrapatos infectados da família Ixodidae,
132 dos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* e *Ixodes*,
133 onde ocorre a transmissão intraestadial (IE), transestadial (TE) e transovariana
134 (TO) (SCOLES; UETI, 2015). No Brasil, por *R. microplus* (IE, TE) e *D. nitens*
135 (IE, TE e TO) são os principais vetores para os agentes *T. equi* e *B. caballi*,
136 respectivamente (GUIMARÃES; LIMA; RIBEIRO, 1998; ROBY et al., 1964;
137 SCOLES; UETI, 2015). Já o carrapato *A. Cajennense* s.l., é considerado como
138 vetor competente de *T. equi*, porém somente a transmissão intraestadial foi

139 comprovada (RIBEIRO; DA SILVEIRA; BASTOS, 2011; SCOLES; UETI, 2013).
140 Além da transmissão vetorial, também ocorrem as transmissões iatrogênica e
141 vertical, podendo levar à abortamentos, infecções congênitas em potros e morte
142 neonatal (WISE et al., 2013).

143 Equinos adultos podem manifestar as formas aguda ou crônica. A forma
144 aguda nesses animais é associada à hemólise acentuada, apresentando sinais
145 clínicos e laboratoriais como hipertermia, taquipneia e taquicardia, constipação
146 seguida por diarreia, anorexia trombocitopenia, esplenomegalia, e anemia
147 hemolítica com consequente icterícia e hemoglobinúria, principalmente com alta
148 parasitemia (DE WAAL; VAN HEERDEN, 2004; WISE et al., 2013). Ainda,
149 infecções por *B. caballi* ou *T. equi* ou podem ser inespecíficas com animais
150 apresentando anorexia, perda de peso, letargia e mau desempenho, ou também
151 problemas locomotores como miopatia inflamatória (WISE et al., 2013).
152 Animais subclínicos/crônicos podem não apresentar anemia nem sinais
153 clínicos, mas atuam como reservatórios para transmissão iatrogênica ou vetorial
154 (ROTHSCHILD, 2013). Além disso, uma vez que não existe imunidade cruzada
155 entre *T. equi* e *B. caballi*, os animais podem apresentar infecção por ambos os
156 patógenos ao mesmo tempo (PASOLINI et al., 2018)

157 O diagnóstico, na fase aguda, pode ser realizado por meio de esfregaço
158 sanguíneo, que se trata de uma técnica rápida e simples, que permite observar
159 a forma de merozoítos nas hemácias, porém essa técnica possui baixa
160 sensibilidade em casos de parasitemia baixa e necessita de pessoal treinado a
161 identificar as formas parasitárias (OIE, 2014).

162 Os testes sorológicos por sua vez são o padrão ouro da OIE, sobretudo
163 em cavalos destinados a importação para países em que há presença de vetores
164 competentes. As principais técnicas de diagnóstico sorológico utilizadas são
165 teste de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA)
166 e teste de fixação de complemento (TCF). Existem ainda um teste
167 imunocromatográfico que pode ser utilizado para *T. equi* e *B. caballi* que pode
168 ser usado para triagem plantéis (HUANG et al., 2006). Existem ainda testes que
169 avançam positivamente com o uso de antígenos recombinantes e variações do
170 ELISA em avaliação, o entanto os testes mais apropriados para diagnóstico e
171 certificação de equinos são RIFI e ELISA de competição (OIE, 2014).

172 2.2.2 ERLIQUIOSE E ANAPLASMOSE

173 *Ehrlichia* sp. é uma bactéria, gram-negativa e pleomórfica, , intracelular
174 obrigatória, capaz de infectar uma variedade de espécies mamíferas, incluindo
175 humanos, mundialmente e pertencente a ordem Rickettsiales, família
176 Anaplasmataceae. Baseado em características fenotípicas, este gênero foi
177 inicialmente composto de 10 espécies classificadas em diferentes grupos de
178 acordo com a célula hospedeira que infecta em: monocítica (*E. canis*, *E. risticii*
179 e *E. sennetsu*), granulocítica (*E. ewingii*, *E. equi*, *E. phagocytophilum*, agente
180 da Erliquiose Monocítica Humana [EGH]), e trombocítica (*E. platys*). Baseada
181 no sequenciamento do gene 16S rRNA e outros genes (groESL operon e genes
182 de proteínas de superfície), o gênero *Ehrlichia* foi reorganizado e atualmente
183 consiste em seis espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, *E.*
184 *ruminantium* e *E. minasensis* (CABEZAS-CRUZ et al., 2016; DUMLER et al.,
185 2001).

186 A erliquiose monocítica equina (EME), causada pela *Neorickettsia risticii*
187 (anteriormente *E. risticii*), e a anaplasnose granulocítica equina (AGE) causada
188 por *Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente *E. equi*), são duas doenças
189 causadas por agentes erliquiais (Dumler et al., 2001). Os carrapatos nunca foram
190 implicados na transmissão de *N. risticii* (Dumler et al., 2001), e sim a ingestão de
191 trematódeos de vida livre (água ou vegetação) ou presentes em hospedeiros
192 intermediários, entretanto carrapatos pertencentes ao gênero *Ixodes* são vetores
193 de *A. phagocytophilum* (Woldehiwet, 2010). No Brasil, apesar de ser considerada
194 uma doença emergente, pouco se sabe sobre a epidemiologia, patologia e
195 transmissão, uma vez que o carrapato *Ixodes ricinus*, principal vetor fora do país,
196 não ocorre no Brasil (STUEN, 2007).

197 Recentemente, foi descrito a confirmação molecular de infecção por uma
198 possível nova espécie de *Ehrlichia* em equinos no Brasil. Detectada
199 anteriormente em equinos da Nicarágua (O'NION et al., 2015), baseada em
200 análises filogenéticas de fragmentos dos genes 16S rRNA, *sodB* e *groEL*
201 (VIEIRA et al., 2018b). Embora seja a primeira comprovação molecular, no Brasil,
202 estudos tem relatado soropositividade dos equinos por meio de RIFI e ELISA
203 comercial (VIEIRA et al., 2013^a).

204 2.3 MICOPLASMOSE HEMOTRÓPICA

205 Hemoplasmas são bactérias gram-negativas pleomórficas, pequenas e
206 sem parede celular, pertencentes a família Mycoplasmataceae, que aderem à
207 superfície dos eritrócitos de vários hospedeiros animais domésticos, silvestres e
208 humanos (MESSICK, 2004; NEIMARK et al., 2001; 2002). Micoplasmose é
209 considerada uma doença zoonótica emergente, sobretudo em
210 imunocomprometidos (HIV/AIDS, lúpus, neoplasias ou coinfectados). Existem
211 relatos de infecções em humanos por espécies de hemoplasmas como *M.*
212 *haemofelis* e *M. haemocanis* (KALLICK, 2007; STEER et al., 2011), *M. suis*
213 (YUAN et al., 2009) e *M. ovis* (SYKES et al., 2010).

214 A transmissão até o momento ainda não foi completamente elucidada,
215 uma vez que os hemoplasmas nunca foram possíveis de serem cultivados *in*
216 *vitro*. No entanto, um experimento sugeriu que o carrapato *R. sanguineus*
217 poderia estar envolvido na transmissão de hemoplasmas em cães
218 (SENEVIRATNA; WEERASINGHE; ARIYADASA, 1973). Além disso, em
219 estudo recente, também foi possível detectar molecularmente a presença do
220 agente *Mycoplasma* sp. Em glândulas salivares de carrapatos do gênero
221 *Amblyomma*, reforçando a hipótese desses artrópodes podem atuar como
222 vetores da bactéria (VIEIRA et al., 2021)

223 O diagnóstico, pode ser realizado por meio de esfregaço sanguíneo para
224 a visualização da bactéria nos eritrócitos, porém essa técnica possui baixa
225 especificidade e sensibilidade, necessitando de avaliador treinado. Além disso o
226 anticoagulante EDTA, muito utilizado na rotina clínica, causa desprendimento da
227 bactéria da superfície celular, resultando assim resultados falsos negativos
228 (TASKER, 2006). Sendo assim, a técnica preconizada como método definitivo
229 capaz de diagnosticar e identificar o agente é a PCR (SYKES, 2010).

230 O primeiro relato de hemoplasmas de organismos *Haemartonella-like*
231 em cavalos foi realizado por microscopia de luz em esfregaços de sangue
232 corados com Giemsa na Nigéria (Gretilat, 1978). No entanto, a primeira
233 evidência molecular só foi realizada na Alemanha em 2010, com cavalos
234 infectados por hemoplasmas intimamente relacionados a *M. haemofelis* e
235 '*Candidatus Mycoplasma haematobos*' (Dieckmann et al., 2010). Eles relataram

236 que cavalos positivos para PCR com menos de um ano de idade apresentavam
237 anemia, portanto a infecção clínica foi mais relevante nesses animais
238 (Dieckmann et al., 2012). Além disso, microorganismos *M. ovis-like* foram
239 detectados em cavalos do Irã (Kalantari et al., 2020) e Nigéria (Happi; Oluniyi,
240 2020), e apenas na Nigéria foi relatada infestação por poucos carrapatos não
241 identificados nos animais. No Brasil, aproximadamente 400 equinos foram
242 triados quanto à presença de hemoplasmas (FERREIRA et al., 2016; VIEIRA et
243 al., 2015a; 2015b; VALENTE et al., 2019), no entanto ainda não foram
244 detectados equinos infectados.

245

REFERENCIAS

- 246 ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. DA. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para
 247 os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto**
 248 **Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115–129, 1961.
- 249
 250
- 251 BARBOSA, I. P. et al. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd
 252 of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 1–2, p. 1–8, maio 1995.
- 253
- 254 BATTSETSEG, B. et al. Detection of natural infection of *Boophilus microplus*
 255 with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested
 256 polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 4, p. 351–7, 22
 257 ago. 2002.
- 258
- 259 BORGES, L. M. F.; LEITE, R. C. Comparação entre as populações auriculares
 260 e nasais de *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) oriundas de equinos de
 261 Minas Gerais e Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,
 262 v. 2, p. 109–110, 1993.
- 263
- 264 BORGES, L. M. F.; SILVA, C. R. F. DA. Ixodídeos parasitos de bovinos e
 265 equinos da microrregião de Goiânia, Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, v.23,
 266 n. 1, 1994.
- 267
- 268 CABEZAS-CRUZ, A. et al. *Ehrlichia minasensis* sp. Nov., isolated from the tick
 269 *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and**
 270 **Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1426–1430, 1 mar. 2016.
- 271
- 272 COOLEY, R. A.; KOHLS, G. M. The genus *Amblyomma* (Ixodidae) in the
 273 United States.
 274 **Journal of Parasitology**, v. 30, n. 2, p. 77–111, 1944.
- 275
- 276 CUNHA, A. P. DA et al. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense*
 277 (Fabricius, 1787) (acarí: ixodidae) em eqüinos, Minas Gerais, Brasil – Parte I.
 278 **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 221–228, dez.
 279 2007.
- 280
- 281 DA SILVA, N. B. et al. First report of *Anaplasma marginale* infection in goats,
 282 Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0202140, 13 ago. 2018.
- 283
- 284 DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne
 285 diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p.
 286 437–446, 1 out. 2012.
- 287
- 288 FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAOSTAT**.
 289 Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 24 jan. 2021.
- 290

- 291 DE WAAL, D. T.; VAN HEERDEN, J. No Title. In: **Coetzer JAW, ed. Equine**
292 **Babesiosis in Infectious Diseases of Livestock**. 2. Ed. Cape Town, South
293 Africa: Oxford University Press, 2004.
294
- 295 DIECKMANN, S. M. et al. Haemotrophic *Mycoplasma* infection in horses.
296 **Veterinary microbiology**, v. 145, n. 3–4, p. 351–3, 26 out. 2010.
297
- 298 DIECKMANN, S. M. et al. Occurrence of hemotrophic mycoplasmas in horses
299 with correlation to hematological findings. **Veterinary microbiology**, v. 160, n.
300 1-2, p. 43-52, 2012.
301
- 302 DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae
303 and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of
304 Ehrlichia with *Anaplasma*, Cowdria with *Ehrlichia* and Ehrlichia with
305 Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of
306 Ehrlichia equi and 'I ag'nt'as subjective synonyms of Ehrlichia
307 phagocytophila. **International journal of systematic and evolutionary**
308 **microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.
309
- 310 FERREIRA, C. G. T.; BEZERRA, A. C. D. S.; AHID, S. M. M. Ectoparasitas de
311 cães do Município de Apodi, Rio Grande do Norte, Brasil. **PUBVET**, v. 4, n. 14,
312 2010.
313
- 314 FERREIRA, E. P. et al. Serological and molecular detection of *Theileria equi* in
315 sport horses of northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology**
316 **and Infectious Diseases**, v.47, p. 72–76, 2016.
317
- 318 GRETILLAT, S. L'hémobartonellose equine au Niger. **Bulletin d' l'Académie**
319 **Vétérinaire de France**, 1978.
320
- 321 GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and
322 experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*.
323 **Parasitology Research**, v. 84, n. 4, p. 323–327, 1998.
324
- 325 HAUSBERGER, M. et al. A review of the human–horse relationship. **Applied**
326 **Animal Behaviour Science**, v. 109, n. 1, p. 1–24, 1 jan. 2008.
327
- 328 HAPPI, A. N.; OLUNIYI, P. E. A rare case of equine Haemotropic Mycoplasma
329 infection in Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 274-286, 2020.
330
- 331 HEUCHERT, C. M. et al. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and
332 *Babesia caballi*
333 infections in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 85, n. 1, p. 1–11, 16 ago. 1999.
334
- 335 HEIM, A. et al. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and
336 *Theileria equi*
337 isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology research**, v. 102, n. 1, p. 63–
338 8, dez. 2007.
339

- 340 HUANG, X. et al. Immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis
341 of *Babesia caballi* and *B. equi* infections in horses. **Clinical and vaccine**
342 **immunology : CVI**, v. 13, n. 5, p. 553–5, maio 2006.
- 343
344 IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal: Efetivo dos rebanhos, por tipo de
345 rebanho. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2017.
- 346
347 KALANTARI, M. et al. The occurrence of hemotropic *Mycoplasma ovis*-like
348 species in horses. **Preventive veterinary medicine**, v. 175, p. 104877, 2020.
- 349
350 KALLICK, C. A. Specific bacterial inclusions in bone marrow cells indicate
351 systematic lupus erythematosus, and treatment for lupus. **US patent, 2007, WO**
352 **2007/019415 A2**, 2007.
- 353
354 KERBER, C. E. et al. Prevalence of equine Piroplasmosis and its association
355 with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian journal of**
356 **veterinary parasitology**, v.18, n. 4, p. 1–8, jan. 2009.
- 357
358 LABRUNA, M. B. et al. Risk factors to tick infestations and their occurrence on
359 horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p.
360 1–14, 2001.
- 361
362 LABRUNA, M. B. et al. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses
363 in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65–
364 77, 19 abr. 2002.
- 365
366 LABRUNA, M. B.; AMAKU, M. Rhythm of engorgement and detachment of
367 *Anocentor nitens* females feeding on horses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n.
368 3–4, p. 316–332, 30 abr. 2006.
- 369
370 MANS, B. J.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. A review of *Theileria* diagnostics and
371 epidemiology. **International Journal for Parasitology: Parasites and**
372 **Wildlife**, v. 4, n. 1, p.104–118, 2015.
- 373
374 MARTINS, T. F. et al. Ocorrência de carrapatos em animais silvestres recebidos
375 e atendidos pelo Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba,
376 São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal**
377 **Science**, v. 52, n. 4, p. 319, 10 dez. 2015.
- 378 MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new
379 insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p.
380 2–13, 2004.
- 381
382 MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901
383 as *Theileriaequi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology research**, v. 84, n.
384 6, p. 467–75, jun. 1998.
- 385
386 NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera
387 *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with
388 descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma*
389 *haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and “*Candidatus*

- 390 Mycoplasma wenyonii". **International Journal Of Systematic And**
391 **Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 891–899, 1
392 maio 2001.
- 393
394 NEIMARK, H. et al. Revision of haemotrophic Mycoplasma species names.
395 **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52,
396 n. 2, p. 683–683, 1 mar. 2002.
- 397
398 NOGUEIRA, R. DE M. S. et al. Molecular and serological detection of *Theileria*
399 *equi*, *Babesiacaballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in
400 Maranhão, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1416–1422,
401 dez. 2017.
- 402
403 O'NION, V. L. et al. Potentially Novel *Ehrlichia* Species in Horses, Nicaragua.
404 **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 335–338, fev. 2015.
- 405
406 OIE. **Equine Piroplasmosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for**
407 **Terrestrial Animals**. Paris: [s.n.]. Disponível em:
408 <[http://www.oie.int/international-standard-](http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/)
409 [setting/terrestrial-manual/access-](http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/)
410 [online/](http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/)>. Acesso em: 11 nov. 2021. OIE. **Chapter 12.7. Equine Piroplasmosis.**
411 2017.
- 412
413 PAROLA, P. et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a
414 Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 657–702,
415 1 out. 2013.
- 416
417 PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans:
418 An Emerging Infectious Threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p.
419 897–928, 15 mar. 2001.
- 420
421 PASOLINI, M. P. et al. Inflammatory Myopathy in Horses With Chronic
422 Piroplasmosis. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 1, p. 133–143, 18 jan. 2018.
- 423
424 RECK, J. et al. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk
425 for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive**
426 **Veterinary Medicine**, v. 113, n. 1, p. 59–62, 1 jan. 2014.
- 427
428 RIBEIRO, M. F. B. B.; DA SILVEIRA, J. A. G. G.; BASTOS, C. V. Failure of the
429 *Amblyomma cajennense* nymph to become infected by *Theileria equi* after
430 feeding on acute or chronically infected horses. **Experimental Parasitology**, v.
431 128, n. 4, p. 324–327, ago. 2011.
- 432
433 ROBY, T. O. et al. THE HEREDITARY TRANSMISSION OF *BABESIA CABALLI*
434 IN THE TROPICAL HORSE TICK, *DERMACENTOR NITENS* NEUMANN.
435 **American journal of veterinary research**, v. 25, p. 494–9, mar. 1964.
- 436
437 ROCHA, C. M. B. M. DA et al. Perceptions of milk producers from Divinópolis,
438 Minas Gerais, regarding *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control. **Revista**
439 **Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 295–302, dez. 2011.

- 440 RODRIGUES, V. DA S. et al. Life cycle and parasitic competence of
441 *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae) on different animal
442 species. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 3, p. 379–384, mar. 2017.
443
- 444 ROHR, C. L. **Estudos sobre Ixodidas do Brasil**. Rio de Janeiro: Gomes Irmãos
445 & C, 1909.
446
- 447 ROTHSCCHILD, C. M. Equine piroplasmosis. **Journal of Equine Veterinary
448 Science**, v. 33, n. 7, p. 497–508, 2013.
449
- 450 SALEEM, S. et al. Equine Granulocytic Anaplasmosis 28 years later. **Microbial
451 Pathogenesis**, v. 119, p. 1–8, jun. 2018.
452
- 453 SCOLES, G. A.; UETI, M. W. Vector Ecology of Equine Piroplasmosis. **Annual
454 Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 561–580, 2015.
455
- 456 SCOLES, G. A.; UETI, M. W. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial
457 biological vector of *Theileria equi*. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 306, 2013.
458
- 459 SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE; ARIYADASA, S. Transmission of
460 *Haemobartonellacanis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in
461 veterinary science**, v. 14, n. 1, p. 112–4, jan. 1973.
462
- 463 STEER, J. A. et al. A Novel Hemotropic Mycoplasma (Hemoplasma) in a Patient
464 With Hemolytic Anemia and Pyrexia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 11,
465 p. e147–e151, 1 dez. 2011.
466
- 467 STUEN, S. *Anaplasma Phagocytophilum* - the Most Widespread Tick-Borne
468 Infection in Animals in Europe. **Veterinary Research Communications**, v. 31,
469 n. S1, p. 79–84, 16 ago. 2007.
470
- 471 SUTHERST, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne
472 diseases. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 1, p. 136–73, jan. 2004.
473
- 474 SYKES, J. E. et al. Human coinfection with *Bartonella henselae* and two
475 hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of
476 clinical microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3782–5, out. 2010.
477
- 478 SZABÓ, J. et al. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors
479 in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. July, p. 1–
480 9, 2013.
481
- 482 SZABÓ, M. P. J. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocerus
483 dichotomus*) from Southeast Brazil: infestations before and after habitat loss.
484 **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 3, p. 268–74, maio 2003.
485
- 486 TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In Practice**, v. 28,
487 n. 3, p. 136–141, 1 mar. 2006.
488

- 489 UETI, M. W. et al. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and
490 transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-
491 level parasitemia. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3755–9, 1
492 ago. 2005.
- 493
494 UILENBERG, G. *Babesia*—A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.
495 138, n. 1–2, p. 3–10, 31 maio 2006.
- 496
497 VALENTE, J. D. M. et al. Tick-borne pathogens in carthorses from Foz do Iguaçu
498 City, Paraná State, southern Brazil: A tri-border area of Brazil, Paraguay and
499 Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 273, p. 71-79, 2019.
- 500
501 VIEIRA, M. I. B. et al. Serological detection and molecular characterization of
502 piroplasmids in equids in Brazil. **Acta Tropica**, v. 179, n. September 2017, p.
503 81–87, mar. 2018a.
- 504
505 VIEIRA, R. F. D. C. et al. Serological survey of *Ehrlichia* species in dogs, horses
506 and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from Southern Brazil.
507 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 5, p. 335–
508 340, set. 2013a.
- 509
510 VIEIRA, R. F. C. et al. 'Candidatus Mycoplasma haematohydrochoerus', a novel
511 hemoplasma species in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from
512 Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, p. 104988, 2021.
- 513
514 VIEIRA, R. F. DA C. et al. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas
515 on human beings, dogs and horses in a rural settlement in southern Brazil.
516 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 353–
517 357, ago. 2015a.
- 518
519 VIEIRA, T. S. et al. *Ehrlichia* sp. infection in carthorses of low-income owners,
520 Southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious
521 Diseases**, v. 48, p. 1–5, out.2016.
- 522
523 VIEIRA, T. S. W. J. et al. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and
524 *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State,
525 southern Brazil. **Ticks and tick- borne diseases**, v. 4, n. 6, p. 537–41, dez.
526 2013b.
- 527
528 VIEIRA, T. S. W. J. et al. Use of pan-hemoplasma PCR for screening horses
529 highly exposed to tick bites from southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.
530 36, n. 1, p. 291, 27 fev. 2015b.
- 531
532 VIEIRA, T. S. W. J. et al. Potentially Same Novel *Ehrlichia* Species in Horses in
533 Nicaragua and Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 953–953,
534 maio 2018b.
- 535
536 WISE, L. N. et al. Review of Equine Piroplasmosis. **Journal of Veterinary
537 Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1334–1346, nov. 2013.
- 538

- 539 WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*.
540 **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 108-122, 2010.
541
- 542 YUAN, C. L. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection
543 in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American journal of**
544 **veterinary research**, v. 70, n. 7, p. 890-894, 2009.
545
- 546 ZOBBA, R. et al. Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmiasis.
547 **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 5, p. 301–308, 1 maio 2008.

548 4 OBJETIVO GERAL

- 549 - Avaliar a prevalência de agentes transmitidos por carrapatos (*Theileria*
550 *equi*, *Babesia caballi* e *Ehrlichia* spp.) e hemoplasmas em equinos
551 provenientes de um assentamento rural localizado em Alvorada do Sul,
552 Paraná, Brasil.

553 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 554 - Determinar a prevalência de anticorpos anti-*T. equi* e anti-*Ehrlichia* spp.
555 em equinos de um assentamento rural localizado em Alvorada do Sul,
556 Paraná
- 557 - Determinar a prevalência de *Ehrlichia* spp., *T. equi*, *B. caballi* e
558 *Mycoplasma* sp.
- 559 - Caracterizar geneticamente as sequencias obtidas;
- 560 - Identificar morfológicamente as espécies de carrapatos presentes nos
561 equinos;
- 562 - Verificar fatores correlacionados a exposição/infecção para o(s)
563 agente(s) identificado(s).

564 **5 ARTIGO: *Mycoplasma ovis* and tick-borne pathogens in horses and**
565 **salivary glands of ticks from rural settlement from Southern Brazil**

566 Monica T.A. Kakimori^{1,2}, Luiz D. Barros², Flávia C.M. Collere¹, Larissa D.R. Ferrari¹,
567 Aldair de Matos², Juliana I. Lucas³, Anna C.B. Mongruel⁴, Daniel M. Aguiar⁵, Rosângela
568 Z. Machado⁴, Marcos R. André⁴, Thállitha S.W.J. Vieira¹, Rafael F.C. Vieira^{1,6,*}

569

570 ¹ Vector-Borne Diseases Laboratory, Department of Veterinary Medicine, Universidade
571 Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

572 ² Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina,
573 Londrina, Brazil

574 ³ Laboratory of Immunoparasitology, Department of Immunology, Microbiology and
575 Parasitology, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

576 ⁴ Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Patologia, Teriogenologia e Saúde
577 Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista
578 (FCAV/UNESP), Jaboticabal, Braz

579 ⁵ Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Universidade Federal do Mato Grosso,
580 Cuiabá, Mato Grosso, Braz

581 ⁶ Global One Health initiative (GOHi), The Ohio State University, Columbus, OH, USA
582

583 Corresponding author at: Departamento de Medicina Veterinária, Campus Agrárias,
584 Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Juvevê, Curitiba, PR,
585 80035-050, Brasil. E-mail: rvieira@ufpr.br

586

587 **Highlights (3-5)**

588 - First report of *Mycoplasma ovis* infection in horses from South America;

589 - *Mycoplasma* sp. was detected in *D. nitens* and *R. microplus* salivary glands;

590 - Co-infection between *T. equi* and *M. ovis* was found in 59,09% horses.

591 **Abstract**

592 Tick-borne pathogens (TBP) are an important group of organisms that can affect
593 animals and humans in South America. Hemoplasma in horses can be considered an
594 accidental or unusual infection. Therefore, this study aimed to determine the
595 occurrence of agents such as *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Ehrlichia* sp., and
596 hemoplasmas in horses from a rural settlement located in southern Brazil, identify the
597 tick species and determine the factors associated with exposure/infection. Blood
598 samples from 22 horses were screened for anti-*T. equi* and anti-*Ehrlichia* spp.
599 antibodies by indirect fluorescent antibody (IFA) assays. The samples were also tested
600 by PCR assays targeting the 18S rRNA gene from *T. equi* and *B. caballi*, and the 16S
601 rRNA gene from hemoplasmas. In addition, PCR assays targeting the 16S rRNA gene,
602 a disulfide bond forming protein (*dsb*) from *Ehrlichia* spp. were also carried out. Ticks
603 were collected from the animals (inspection) and from the environment (flannel
604 trawling and dry ice traps), and they were identified by means of an identification key.
605 Additionally, 28 adult ticks from the animals and 4 nymphs from the environment had
606 their salivary glands extracted and screened for *Ehrlichia* spp. (*dsb* gene) and
607 *Mycoplasma* spp. (16S gene). Antibodies to *T. equi* and *Ehrlichia* spp. were detected
608 in 09/22 (40.91%; 95% CI: 23.26-61.27%) and 07/22 (31.81%; 95% CI: 16.36-52.68%)
609 horses, respectively. DNA from *T. equi*, *B. caballi* and *Mycoplasma* spp. were found
610 in 13/22 (59.09%), 1/22 (4.55%) and 11/22 (50%) horses, respectively, and all were
611 negative for *Ehrlichia* spp. All sequences showed $\geq 99\%$ identity with multiple *T. equi*
612 (18S rRNA), *B. caballi* (*rap-1*) and *Mycoplasma ovis* (16S rRNA) sequences deposited
613 in GenBank. All adult ticks were identified as *Dermacentor nitens* 44/47 (93.62%) and
614 *Rhipicephalus microplus* 3/47 (6.38%). All salivary glands were negative for *Ehrlichia*
615 spp. by *dsb* gene. Two of 28 (7.14%) glands from adult animals were positive by
616 conventional PCR, 11/28 (39.29%) and two of 4 nymphs (50%) from the environment
617 were positive by real time PCR for the gene 16S rRNA for *Mycoplasma* spp. This is
618 the first report of *M. ovis* infection in horses in Brazil, using molecular techniques. Was
619 detected in salivary glands of *D. nitens* and *R. microplus*, and further studies are needed
620 to clarify the vectorial action of these species. It was possible to observe a low
621 occurrence of *Ehrlichia* spp. and absence of positive PCR in region where *Amblyomma*
622 *sculptum* ticks were not found.

623

624 **Keywords:** *Babesia caballi*, hemotropic *Mycoplasma*, *Theileria equi*, *Dermacentor*
625 *nitens*, *Ehrlichia* spp

626

627 **1. Introduction**

628 Tick-borne pathogens (TBP) pathogens are an important group of organisms that
629 may affect animals (Baneth, 2014; Vieira et al., 2013) and human beings in South
630 America (Labruna et al., 2014; Valente et al., 2020). In horses, equine piroplasmiasis (EP),
631 caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*, has a significant impact on the horse
632 industry and is the most important TBP (Friedhoff et al., 1990). Additionally to the equine
633 granulocytic anaplasmosis (EGA), caused by *Anaplasma phagocytophilum* (formerly
634 *Ehrlichia equi*) (Dumler et al., 2001), a potentially novel *Ehrlichia* species has been found
635 infecting horses from Nicaragua and Brazil (O'Nion et al., 2015; Vieira et al., 2016; 2018),
636 although clinical signs and its vector remains unknown.

637 A recent study has suggested that hemotropic *Mycoplasma* spp. (hemoplasmas)
638 infection in horses may be considered accidental or an uncommon infection (Valente et
639 al., 2019). To date, molecular detection of hemoplasmas has only been described in horses
640 from Germany (Dieckmann et al., 2010, 2012), Iran (Kalantari et al., 2020), and Nigeria
641 (Happi and Oluniyi, 2020). However, clinical signs associated with hemotropic
642 *Mycoplasma* spp. infection in horses have not yet been established, and the vectorial
643 transmission of this pathogen remains unknown.

644 In Brazil, horses are of great socioeconomic importance, being used for work as
645 draft horses, sports competitions, leisure, development of medical supplies, and meat
646 production for exportation (Hausberger et al., 2008). Due to their close contact with
647 humans, horses may be used as sentinels for public health (Valente et al., 2019).
648 Therefore, the aims of the present study were i) to determine the prevalence of the TBP
649 pathogens (*T. equi*, *B. caballi*, and *Ehrlichia* spp.), and hemoplasmas in horses and ticks,
650 and ii) to identify the tick species parasitizing the animals and those collected from the
651 environment in a rural settlement in Alvorada do Sul County, Paraná State, southern
652 Brazil.

653

654 **2. Materials and methods**

655 *2.1. Ethics committee*

656 This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation and
657 Animal Welfare at the Universidade Federal do Paraná (UFPR) (protocol number

658 046/2016), Universidade Estadual de Londrina (protocol number no. 97/2020) and was
659 conducted according to the ethical principles of animal experimentation, adopted by the
660 Brazilian College of Animal Experimentation.

661

662 2.2. Study area

663 The study was carried out on a rural settlement in Alvorada do Sul County (22°
664 54' 34.4" S 51° 13' 49.1" W), Paraná State, southern Brazil, from august to september
665 2020. The area presents a temperate climate (Cfa Köppen: Cfa) with rainfall throughout
666 the year especially in the summer months, and an average temperature of 25° C. The rural
667 settlement was selected based on data from previous studies that detected a potentially
668 novel *Ehrlichia* sp. (Vieira et al., 2013; 2016) but failed in detecting hemoplasmas in
669 horses during a blood sampling performed in 2011 (Vieira et al., 2015).

670

671 2.3. Sampling

672 A non-probabilistic convenience sampling was performed in the collection of
673 horses. An epidemiological questionnaire was given to each owner addressing age, sex,
674 history of previous tick exposure, chemical control for ticks, and presence of ticks at the
675 time of sampling. The age of the horses was stratified into groups ≤ 5 yrs and > 5 yrs.

676 Animals were physically restrained, and blood samples (5 mL) were collected by
677 venipuncture of the jugular vein using vacuum tubes containing EDTA (BD Vacutainer®,
678 Franklin Lakes, NJ, EUA) for PCR analysis and kept at -80 °C until testing. In addition,
679 blood samples (up to 5 mL) were collected using vacuum tubes containing a serum
680 separator gel (BD Vacutainer® Franklin Lakes, NJ, EUA) and kept at room temperature
681 (25 °C) until visible clot formation. The samples were then centrifuged at $1500\times g$ for 5
682 min, serum separated, and kept at -20 °C for serological testing.

683 The animals were submitted to a visual inspection for the presence of ticks,
684 beginning at the head and neck and proceeding systematically down the mane until the
685 tail was reached. Thereafter, the tail, perianal region, foreleg, axillary region, ventral
686 region, hindlegs, inguinal region, and external ears were also examined (Duell et al.,
687 2013). Ticks infesting horses were removed using a commercial Hook (O'TOM®/Tick
688 Twister®, Lavancia, FRA) and kept in absolute ethanol labeled tubes for taxonomic
689 identification (Barros-Battesti et al., 2006; Martins et al., 2010).

690

691 2.4. Tick sampling

692 Visual search and flannel dragging were used for tick sampling as previously
693 described (Suzin et al., 2020), with modifications. During one hour of active search, five
694 researchers walked for 10 min and one for 20 min, each one dragging a white flannel (1
695 m wide and 1.8 m long), in 13 properties where horses were raised. During the sampling,
696 the flannel was inspected for ticks every 10-15 m of dragging. Additionally, 65 CO₂ traps
697 were installed with a 10 m distance in each area for one hour (Barbieri et al., 2019). The
698 collected ticks were kept in absolute ethanol labeled tubes for identification according to
699 morphological taxonomic keys (Barros-Battesti et al., 2006; Martins et al., 2010; Nava et
700 al., 2017).

701

702 *2.5. Detection of anti-Theileria equi, anti-Babesia caballi and anti-Ehrlichia spp.*
703 *antibodies by indirect immunofluorescent antibody assay (IFA) and ELISA test*

704 Anti-*T. equi* antibodies in horse serum samples were evaluated by IFA and ELISA
705 test, as previously described (Vieira et al., 2015; Baldani et al., 2007). IFA antigen was
706 prepared from the blood of an experimentally infected horse. Samples were considered
707 positive when reacting with dilution $\geq 1:80$ (Baldani et al., 2010). Titers were determined
708 to the highest dilution in which fluorescence was visualized around the parasite (endpoint
709 titers). For ELISA, the cut-off point was calculated based on the average optical density
710 of the negative controls multiplied by 2.5 (constant – correction factor). Samples that had
711 the optical density (O.D.) value greater than or equal to the cut-off point (= 0.347) were
712 considered positive.

713 Anti-*B. caballi* antibodies in horse serum samples were evaluated by ELISA, as
714 previously described (Baldani et al., 2004). The cut-off point was calculated based on the
715 average optical density of the negative controls X 2.5 (constant – correction factor).
716 Samples that had the optical density (O.D.) value greater than or equal to the cut-off point
717 (= 0.317) were considered positive.

718 Anti-*Ehrlichia* spp. antibodies in horse serum samples were tested by IFA using
719 *E. canis* (São Paulo strain) as antigens, with samples considered positive when reacting
720 at a dilution $\geq 1:40$ (Aguiar et al., 2007). Crude antigens were produced by culturing
721 *Ehrlichia* in DH82 cells, as previously described (Aguiar et al., 2007; Souza et al., 2010).
722 Endpoint titers were determined to the highest dilution in which fluorescence was
723 visualized around the bacteria.

724

725 2.6. DNA extraction

726 DNA was extracted from blood samples using a commercial kit (Illustra™ blood
727 genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, Chalfont, St. Giles, UK) according to the
728 manufacturer's instructions. Ultra-pure water was used in parallel to monitor cross-
729 contamination in each batch of all samples.

730 Additionally, adult ticks (n = 28) from horses and nymphs (n = 4) from the
731 environment were randomly selected, dissected for withdrawal of salivary glands samples
732 (Edwards et al., 2009), and DNA was extracted using a commercial kit (QIAamp®DNA
733 Micro Kit, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

734

735 2.7. Molecular detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, *Ehrlichia spp.*, and
736 *hemoplasmas*

737 Conventional PCR (cPCR) assays for the horse housekeeping gene
738 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) (Birkenheuer et al., 2003) on horse
739 DNA samples and the mitochondrial 16S rRNA gene of ticks (Fukunaga et al., 2001) on
740 DNA of ticks' salivary glands were performed to monitor DNA extraction.

741 Horse DNA samples were evaluated using cPCR with previously described
742 species-specific primers targeting a portion of the 18S rRNA gene of *T. equi* (392 bp)
743 (Alhassan et al., 2005) and *rap-1* gene of *B. caballi* (530 bp) (Díaz-Sánchez et al., 2018).
744 Horse samples known to be infected with *T. equi* and *B. caballi*, and nuclease-free water
745 were used as positive and negative controls, respectively.

746 Horse and ticks' salivary glands DNA samples were also screened by a genus-
747 specific cPCR assay targeting a fragment (349 bp) of the *dsb* gene of
748 *Ehrlichia/Anaplasma spp.* (Almeida et al., 2011). Dog samples known to be infected with
749 *E. canis* and nuclease-free water were used as a positive and negative control,
750 respectively.

751 Additionally, horse and tick DNA samples were also screened for hemoplasmas
752 using a universal hemoplasma SYBR green real-time PCR (qPCR) assay, as previously
753 described (Willi et al., 2009). Synthesized gBlock™ (Integrated DNA Technologies
754 IDT™, Coralville, IA, USA) comprising the amplification target of the 16S rRNA gene of
755 hemoplasmas was used as the positive control. Horse and ticks' salivary glands DNA
756 samples that tested positive in the hemoplasma SYBR green qPCR assay were subjected
757 to genus-specific cPCR assays targeting fragments of the 16S rRNA (~900 bp) (Hoelzle
758 et al., 2011, Machado et al., 2016) and the 23S rRNA (~800 pb) gene (Mongruel et al.,

2020) of hemoplasmas. Dog samples known to be infected with *Mycoplasma haemocanis* and nuclease-free water were used as a positive and negative control, respectively.

761

762 2.8. Cloning of amplicons and plasmid DNA extraction

763 The cloning of hemotropic *Mycoplasma* spp. 16S rRNA gene fragments amplified
764 were performed with a commercial Kit (pGEM-T[®] Easy Vector System, Promega,
765 Madison, Wisconsin, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA and
766 vector concentrations used in the binding reaction were determined to obtain an
767 insert:vector ratio of 1:1. The plasmid DNA extraction was performed using a commercial
768 kit (Pure Yield Plasmid Miniprep System, Promega, USA) and the plasmid DNA samples
769 were then submitted to sequencing.

770

771 2.9. Sequencing, phylogenetic and genotype analysis

772 Amplicons obtained from one *B. caballi* positive sample (~530 bp) were
773 sequenced in both directions by Sanger method, with the nucleotide sequence of the *rap-*
774 1 gene of *B. caballi* submitted to GenBank[®] database.

775 Also, the amplicon (841 bp) obtained from one cloning of hemotropic
776 *Mycoplasma* sp.-positive sample was sequenced in both directions by Sanger method,
777 with nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of hemoplasmas submitted to GenBank[®]
778 database.

779 The sequence of the *rap-1* gene of *B. caballi* obtained herein was aligned with
780 other sequences of *B. caballi* group available in GenBank[®] database using MAFFT 7.110
781 (Kato & Standley, 2013) on the Guidance 2 server (Sela, Ashkenazy, Kato, & Pupko,
782 2015). Phylogenetic analysis was performed based on Bayesian Inference (BI) using the
783 Beast 1.8.0 package (Drummond, Suchard, Xie & Rambaut, 2012). Two independent runs
784 of 20,000,000 generations of Monte Carlo Markov Chain (MCMC) were performed, with
785 one sampling per 10,000 generations and a 20% burn-in. The substitution models were
786 estimated as K80+I+G, based on the Akaike information criterion (AIC) using jModeltest
787 2.1.10 (Darriba, Taboada, Doallo & Posada, 2012). Reconstructions were visualized
788 using the FigTree 1.4.4 software (Rambaut, 2014). The *B. caballi* tree was rooted with
789 *Babesia bovis* (FJ588012).

790 Likewise, the partial sequence of the 16S rRNA gene of hemotropic *Mycoplasma*
791 sp. obtained herein was aligned with others *Mycoplasma suis* group and *Mycoplasma*
792 *haemofelis* species available in GenBank[®] database using MAFFT 7.110 (Kato &

793 Standley, 2013) on the Guidance 2 server (Sela, Ashkenazy, Katoh, & Pupko, 2015).
794 Phylogenetic analysis on the 16S rRNA gene was performed based on BI using the Beast
795 1.8.0 package (Drummond, Suchard, Xie & Rambaut, 2012). Two independent runs of
796 20,000,000 generations of MCMC were performed, with one sampling per 10,000
797 generations and a 10% burn-in. The substitution models were estimated as F81+G for the
798 16S rRNA, based on the AIC using jModeltest 2.1.10 (Darriba, Taboada, Doallo &
799 Posada, 2012). Reconstructions were visualized using the FigTree 1.4.4 software
800 (Rambaut, 2014). The 16S rRNA gene tree was rooted with *Mycoplasma pneumoniae*
801 (AF132741). To access genotype diversity, the partial sequence of 16S rRNA of
802 hemoplasma obtained from one horse herein was aligned with fragments of 16S rRNA
803 from *M. ovis* sequences, as described above, and submitted for analysis on DnaSP6
804 software (Librado and Rozas, 2009). Inference and graphic representation were made by
805 TCS Network method (Clement, Posada and Crandall, 2000) on PopART software (Leigh
806 and David, 2015), respectively. Additionally, distance analysis based on a split-network
807 was made using Splitstree v.4.14.6 software (Huson and Bryant, 2006), applying the
808 Neighbor-Joining method with the same alignment from phylogenetic analysis.

809

810 2.10. Statistical analysis

811 The Chi-square or Fisher's exact test was used to determine the difference between
812 whether individual factors were associated with seropositivity to *T. equi* and *Ehrlichia*
813 spp., or with infection by *T. equi* and *B. caballi*. Odds ratio (OR), 95% confidence
814 interval, and p values were calculated for each variable. Results considered significantly
815 different when $p < 0.05$. Data were compiled and analyzed in Epi Info™ software (version
816 7.1.5, CDC).

817

818 3. Results

819 A total of 22 horses (14 males and 8 females) were collected with voluntary
820 acceptance by their owners.

821 A total of 47 ticks, 31 (65.95%) male and 16 (34.04%) female, were collected
822 from 8/22 (36.36%; 95% CI: 19.73-57.05%) horses with a mean of 2.74 (\pm 4.45) ticks per
823 animal. Adult ticks were identified as *Dermacentor nitens* 44/47 (93.62%) and
824 *Rhipicephalus microplus* 3/47 (6.38%). A total of 706 larvae and 4 nymphs were collected
825 on the environment and identified as *R. microplus*.

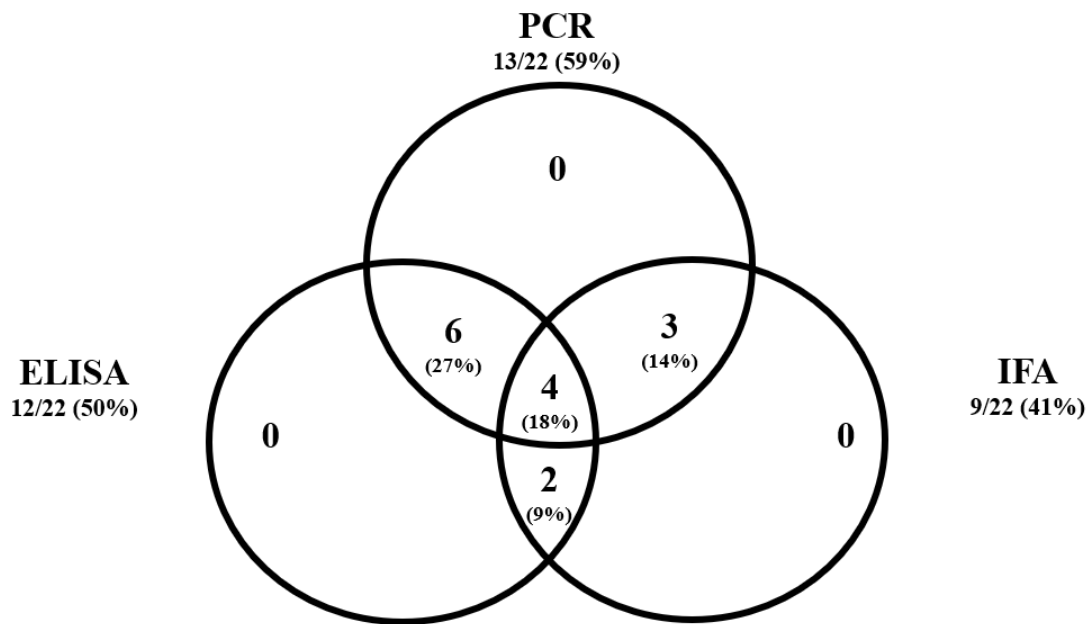
826 Anti-*T. equi* antibodies were detected in 9/22 (40.91%; 95% CI: 23.26-61.27%)
827 horses by IFA, with reciprocal antibody titer rating from 80 to 1,280 and in 11/22 (50%;
828 95% CI: 30.72-69.28%) animals by ELISA. Furthermore, 7/22 (31.81%; 95% CI: 16.36-
829 52.68%) horses sero reacted to *E. canis* antigens by IFA with reciprocal antibodies titers
830 ranging from 80 to 320. Anti-*B. caballi* antibodies were detected in 6/22 (27.27%; 95%
831 CI: 13.15-48.15) horses by ELISA. Two out of 22 (9.09%; 95% CI: 2.53-27.81%) horses
832 were seropositive for *T. equi* and *Ehrlichia* spp., 4/22 (18.18%; 95% CI: 7.31-38.52%)
833 for *B. caballi* and *T. equi*, and 2/22 (9.09%; 95% CI: 2.53-27.81%) for *T. equi*, *B. caballi*
834 and *Ehrlichia* spp.

835 The mitochondrial 16S rRNA gene of ticks was successfully amplified in all ticks'
836 salivary glands. All ticks' salivary glands tested negative for *Ehrlichia* spp. *dsb* gene.
837 Two out of 28 (7.14%; 95% CI:1.98-22.65) and 9/28 (39.29%; 95% CI: 23.57-57.59%)
838 adult ticks' salivary glands tested positive for hemoplasmas by cPCR and qPCR,
839 respectively. Moreover, 2/4 (50%; 95% CI: 15-85%) nymphs' salivary glands tested
840 positive for hemoplasmas by qPCR. Among the nine ticks' salivary glands PCR-positive
841 for hemotropic *Mycoplasma* sp., eight (88.89%; 95% CI: 56.50-98.01%) were from *D.*
842 *nitens* infesting horses and one (11.11%; 95% CI:1.62-37.74%) *R. microplus* from the
843 horses.

844 The *gapdh* gene was consistently amplified in all horse samples. A total of 13/22
845 (59.09%; 95% CI: 38.73-76.74%) and 1/22 (4.55%; 95% CI:0.81-21.80%) horses tested
846 positive for *T. equi* and *B. caballi* by cPCR, respectively. A total of 17/22 (77.27%; 95%
847 CI: 56.56-89.88%) horses were positive for at least one EP agent when combining IFA,
848 cPCR, and ELISA. Eleven out of 22 (50%; 95% CI: 30.72-69.28%) and 22/22 (100%;
849 95% CI: 85.13-100%) horses tested positive for hemotropic *Mycoplasma* spp. by cPCR
850 and qPCR, respectively. All animals tested negative for *Ehrlichia/Anaplasma* spp. by
851 cPCR. One out of 22 horses tested positive for *B. caballi* and hemotropic *Mycoplasma*
852 spp. (4.55%; 95% CI:0.81-21.80%), and all samples PCR-positive for *T. equi* have also
853 tested positive for hemotropic *Mycoplasma* spp. After many attempts at PCR of the 23S
854 gene for hemotropic *Mycoplasma* spp, it was possible to observe that the gene does not
855 have adequate amplification in samples positive for *M. ovis*.

856 The prevalence of *T. equi*, *B. caballi* and *Ehrlichia* spp. in horses according to
857 different variables evaluated are summarized in Table 1. Overlapping results for *T. equi*
858 occurrence by IFA, ELISA, and PCR are shown in Figure 1. Horses >5 yrs were 26.6
859 times more likely to be seropositive for *T. equi* ($p = 0.002$). No significant association

860 was found between sex, history of previous tick exposure, presence of ticks at the time of
 861 sampling, or chemical control for ticks and positivity by PCR for *T. equi* or *B. caballi*,
 862 IFA for *T. equi* or *Ehrlichia* spp. or ELISA for *T. equi* or *B. caballi*.



863

864 **Fig. 1.** Proportional Venn diagram showing IFA, ELISA and PCR results for *Theileria equi* in horses from
 865 Alvorada do Sul, Parana state, southern Brazil. The diagram was generated by a program available at:
 866 <https://www.biovenn.nl/>

867

868

869 **Table 1.**
 870 Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Ehrlichia* spp. in horses within each variable studied,
 871 Alvorada do Sul County, Parana state, southern Brazil, 2020.

	Variable	Age		Sex		History of tick bite		Presence of ticks		Acaricide Treatment		
		≤5	>5	Male	Female	Yes	No	Yes	No	Yes	No	
<i>Theileria equi</i>	PCR	+n	5/11	8/11	8/14	5/8	8/15	5/7	5/8	8/14	7/13	6/9
		(%)	45.45	72.73	57.14	62.50	53.33	61.91	62.5	57.14	53.85	66.67
		OR	3.200		0.800		0.457		1.25		0.583	
		95% CI	0.539-18.98		0.134-4.745		0.66-3.144		0,21-7.41		0.10-3.40	
		p-value	0.193		0.583		0.372		0.583		0.438	
	IFA	+n	1/11	8/11	5/14	4/8	5/15	4/7	2/8	7/14	4/13	5/9
		(%)	9.09	72.73	35.71	50.00	33.33	57.14	25.00	50.00	30.77	55.56
		OR	26.666		0.555		0.375		0.333		0.3556	
		95% CI	2.308-308.014		0.09-3.24		0.05-2.36		0.04-2.25		0.06-2.07	
		p-value	0.0024		0.416		0.275		0.245		0.235	
	ELISA	+n	6/11	5/11	7/14	4/8	7/15	4/7	5/8	6/14	7/13	4/9
		(%)	54.55	45.45	50.00	50.00	46.67	57.14	65.50	42.86	53.85	44.44
OR		1.440		1.000		0.656		2.222		1.458		
95% CI		0.268-7.714		0.176-5.682		0.107-4.003		0.374-13.180		0.264-8.048		
p-value		0.669		1.000		0.647		0.375		0.664		
<i>Babesia caballi</i>	PCR	+n	0/11	1/11	0/14	1/7	1/15	7/7	1/8	14/14	0/13	1/9
		(%)	0.00	9.09	0.00	87.5	6.67	100.00	12.5	100.00	0.00	11.11
		OR	-		-		-		-		-	
		95% CI	-		-		-		-		-	
		p-value	0.500		0.363		0.681		0.363		0.409	
	ELISA	+n	1/11	5/11	3/14	3/8	3/15	3/7	1/8	5/14	3/13	9/9
		(%)	9.09	45.45	21.43	37.50	20.00	42.86	12.5	35.71	23.08	33.33
		OR	0.120		0.454		0.333		0.257		0.600	
		95% CI	0.11-1.288		0.066-3,094		0.047-2.366		0.024-2.732		0.090-3.985	
		p-value	0.055		0.415		0.262		0.239		0.595	
<i>Ehrlichia</i> spp.	IFA	+n	3/11	4/11	4/14	3/8	6/15	1/7	4/8	3/14	5/13	2/9
		(%)	27.27	36.36	28.57	37.50	40.00	14.29	50.00	21.43	38.46	22.22
		OR	0.653		0.666		4.000		3.666		2.187	
		95% CI	0.107-4.003		0.10-4.20		0.37-42.17		0.55-24.13		0.31-15.04	
		p-value	0.647		0.510		0.243		0.181		0.372	

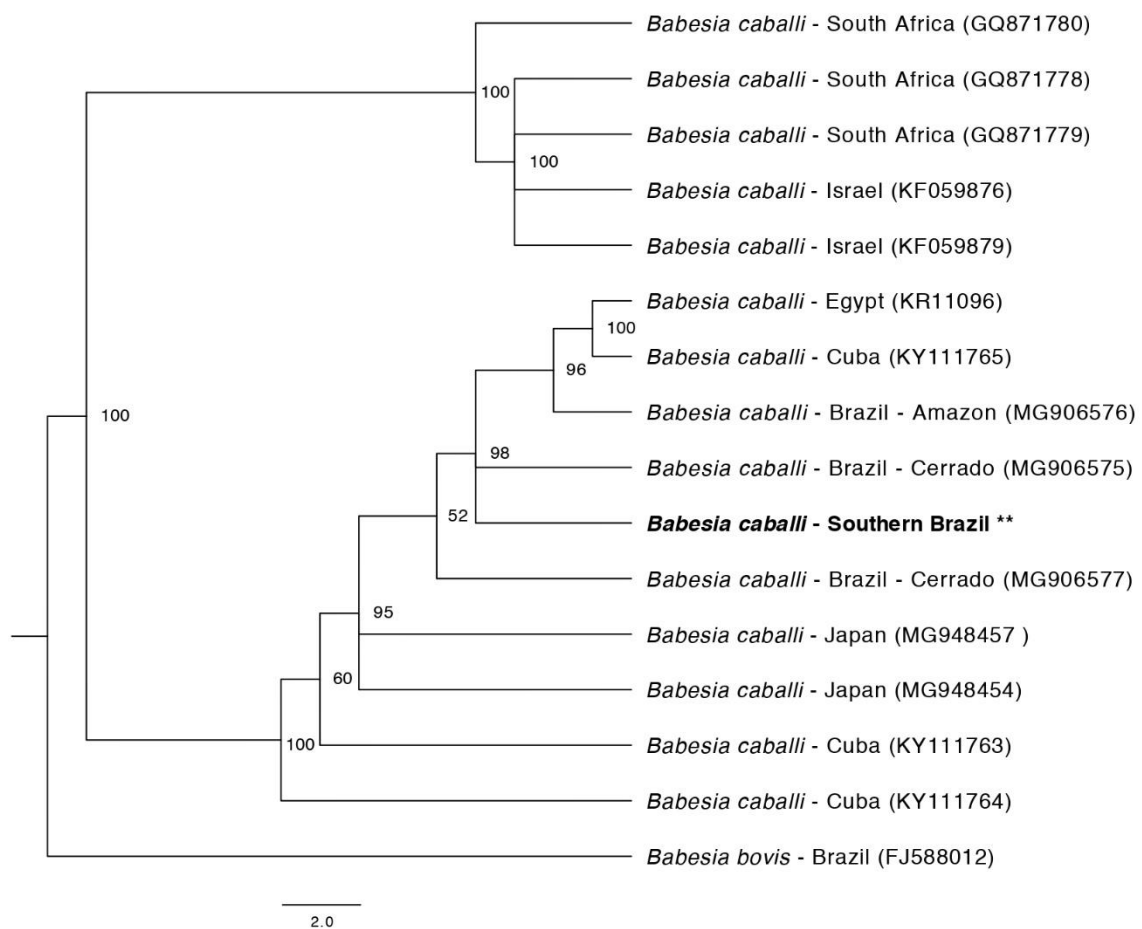
872 +, Number of positive animals; n, number of samples; 95% CI, 95% confidence interval.

873

874

875

876 Sequencing of the *rap-1* gene fragment from *B. caballi*-positive horse (accession
 877 number. MZ802993) revealed 98.88-99.63% identity with *B. caballi* detected in horses
 878 from North (MG906585, MG906584, MG906577, and MG906576) and Midwestern
 879 Brazil (MG906586 and MG906575). The *rap-1* sequences from *B. caballi* obtained from
 880 the horse herein clustered closely with sequences previously detected in horses from the
 881 Brazilian biomes Cerrado (MG906575 and MG906577) and Amazon (MG906576). A
 882 polytomy was created involving the *rap-1* gene sequence isolated herein with sequences
 883 from the Brazilian Cerrado biome (MG906575 and MG906577) and a clade harboring
 884 sequences from Cuba (KY111765), Egypt (KR11096), and Brazilian Amazon
 885 (MG906576) (Figure 2).



886

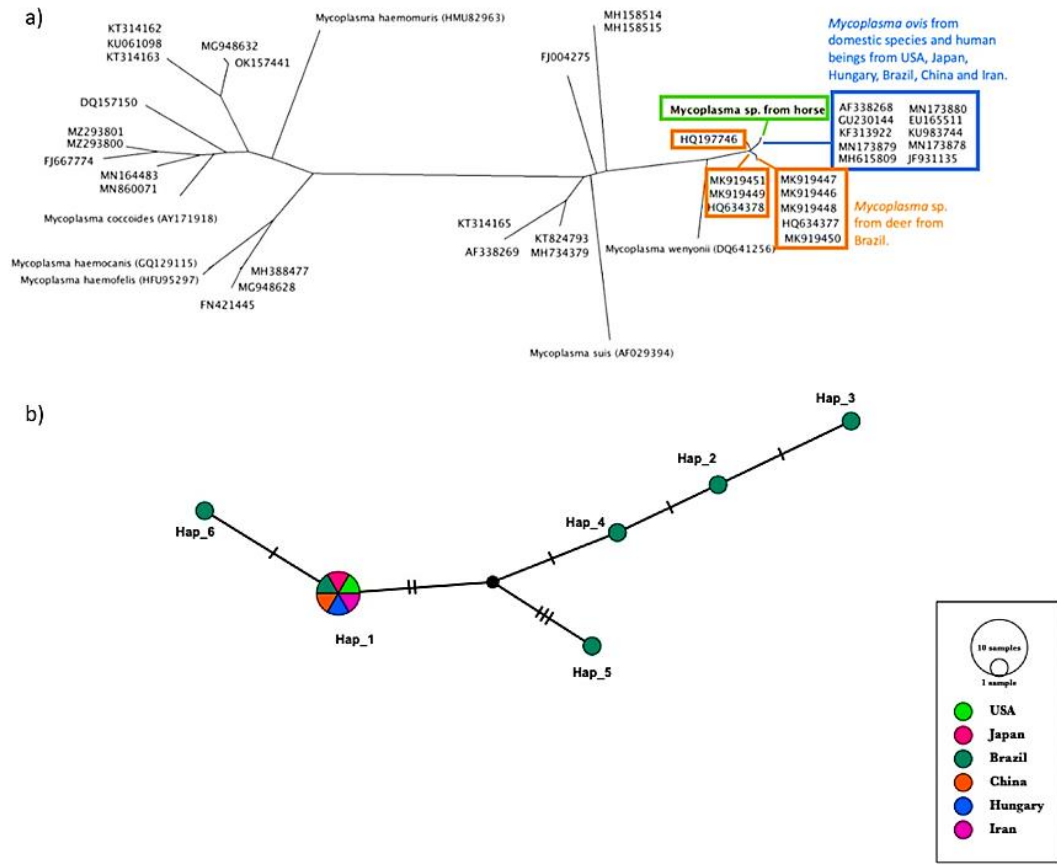
887 **Fig. 2.** The consensus sequences were subjected to multiple sequence alignment with the sequences selected
 888 from GenBank® using MAFFT available on the GUIDANCE2 server (Sela et al., 2015). The best-fit model
 889 of nucleotide substitution was determined using jModeltest v.2.1.10 (Darriba et al., 2012) and was set as
 890 GTR+G for 16S rRNA gene, based on the Akaike Information Criterion (AIC). The Bayesian
 891 reconstruction was performed in Beast 1.10.4 (Drummond et al., 2012) with three independent runs of 100
 892 million MCMC steps sampled at every 10,000 trees, 10% of the burn-in. The phylogenetic tree was
 893 visualized with FigTree software version 1.4.4 (Rambaut, 2014).

894

895 The sequencing of the 16S rRNA gene fragment from the hemoplasma-positive
896 horse (accession number. OK583881) revealed 99.29-99.76% identity with multiple *M.*
897 *ovis* sequences detected in horses from Iran (MH615809), humans from the USA
898 (KF313922, GU230142-GU230144), a serow (*Capricornis crispus*) from Japan
899 (AB571119), goats from China (KU983740-KU983745) and sheep from Japan
900 (JF931134, JF931135, and JF931138), Hungary (EU828582 and EU165511), USA
901 (AF338268), Turkey (MF377458 - MF377462, EU165509, and MF377463) and China
902 (KU983742 and KU983746).

903 Phylogenetic analyses on the 16S rRNA gene of the hemoplasma detected herein
904 clustered together with those from the *M. suis* group (Figure 3a). The hemoplasma
905 sequence obtained from a horse formed a clade together with *M. ovis* sequences
906 previously detected in sheep from Brazil (MN17387, MN173879, and MN17380), USA
907 (AF338268), China (KU983744), Hungary (EU165511), a horse from Iran (MH615809)
908 and humans from USA (GU230144, KF313922) with high support branch (i.e., posterior
909 probabilities) (Figure 3b). The *M. ovis* clade was positioned inside other clades that
910 shelter hemotropic *Mycoplasma* sp. sequences isolated from deer in Brazil (HQ197746,
911 HQ634378, MK919449, MK919451, HQ634377, MK919446, MK919450, MK919448).
912 The genotype diversity analysis revealed the occurrence of six different haplotypes
913 among the evaluated hemoplasma sequences. The hemoplasma 16S rRNA gene sequence
914 obtained in the present study was grouped in Hap_6 (Table 2) and analysis presented
915 values of $S = 9$, $k = 2.44211$, $\Pi = 0.0000003$, and genotype diversity = 0.716. The splitree
916 network corroborates the previous analysis, presenting clearly differentiations between
917 hemotropic *Mycoplasma* sp. sequences grouped in *M. suis* and *M. haemofelis* groups. The
918 hemotropic *Mycoplasma* sp. sequence from the horse is placed closely to other *M. ovis*
919 sequences (Figure 4).

920



921
 922
 923
 924
 925
 926
 927
 928
 929
 930
 931
 932
 933
 934
 935
 936
 937
 938
 939

Fig. 3. Neighbor-Net analysis of 16S rRNA sequences obtained from horses sampled in the present study and compared to related haemoplasmas sequences previously deposited in GenBank.

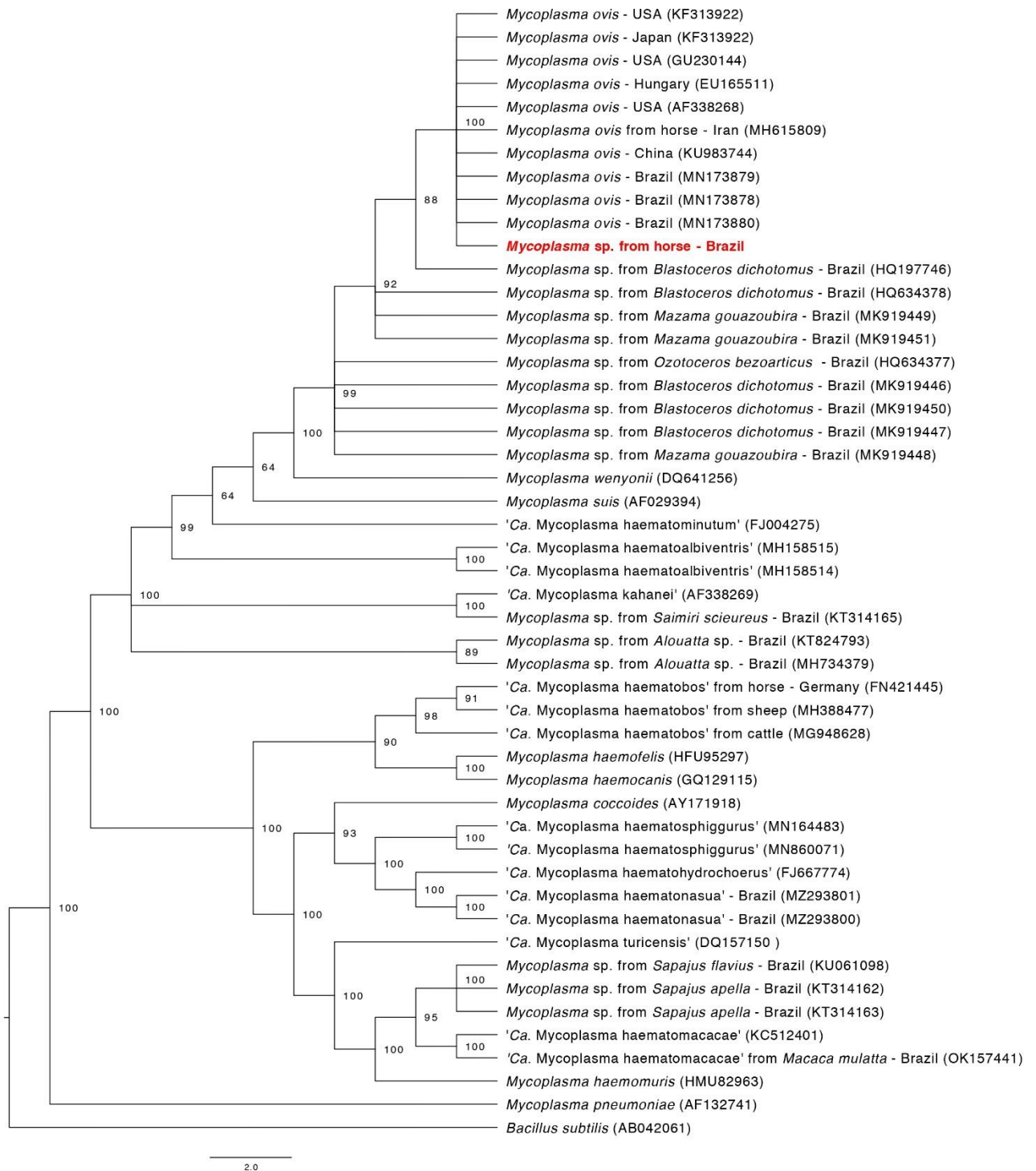
940 **Table 2.**

941 Different genotypes of partial 16S rRNA gene from *Mycoplasma ovis* isolated from different animal species, sequences
 942 from each genotype group, and countries where sequences were reported. Analysis was performed using DnaSP6
 943 software.

Genotype	Sequences	Location
Hap_1	<i>Mycoplasma ovis</i> from human beings (KF313922, GU230144)	USA Japan
	<i>Mycoplasma ovis</i> from sheep (JF931135)	Hungary
	<i>Mycoplasma ovis</i> from sheep (EU165511)	USA
	<i>Mycoplasma ovis</i> from sheep (AF338268)	Iran
	<i>Mycoplasma ovis</i> from horse (MH615809)	China
	<i>Mycoplasma ovis</i> from sheep (KU983744)	Brazil
	<i>Mycoplasma ovis</i> from sheep (MN173879, MN173878, MN 173880)	
Hap_2	<i>Mycoplasma ovis</i> from Pampas deer (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>) (HQ634377)	Brazil Brazil
	<i>Mycoplasma ovis</i> from Wetland deer (<i>Blastocerus dichotomus</i>) (MK919446)	Brazil Brazil
	<i>Mycoplasma ovis</i> from Wetland deer (<i>Blastocerus dichotomus</i>) (MK919450)	
	<i>Mycoplasma ovis</i> from Gray brocket (<i>Mazama gouazoubira</i>) (MK919448)	
Hap_3	<i>Mycoplasma ovis</i> from <i>Mazama gouazoubira</i> (MK919447)	Brazil
Hap_4	<i>Mycoplasma ovis</i> from Wetland deer (<i>Blastocerus dichotomus</i>) (HQ634378)	Brazil Brazil
	<i>Mycoplasma ovis</i> from gray brocket (<i>Mazama gouazoubira</i>) (MK919449)	Brazil
	<i>Mycoplasma ovis</i> from gray brocket (<i>Mazama gouazoubira</i>) (MK919451)	
Hap_5	<i>Mycoplasma ovis</i> from Wetland deer (<i>Blastocerus dichotomus</i>)(HQ197746)	Brazil
Hap_6	<i>Mycoplasma ovis</i> from horse	Brazil

944

945



946

947 **Fig. 4.** Phylogenetic tree of *Mycoplasma* spp. inferred from partial sequences of the 16S rRNA gene found in horses from
 948 Alvorada do Sul, Parana state, southern Brazil. The consensus sequences were subjected to multiple alignment with the
 949 sequences selected from GenBank® using MAFFT available on the GUIDANCE2 server (Sela et al., 2015). The best-fit
 950 model of nucleotide substitution was determined using jModeltest v.2.1.10 (Darriba et al., 2012) and was set as F81+G
 951 for the 16S rRNA gene, based on the AIC using jModeltest 2.1.10 (Darriba, Taboada, Doallo & Posada, 2012) with
 952 two independent runs of 20,000,000 generations of MCMC steps sampled at every 10,000 trees, 10% of the burn-in. The
 953 phylogenetic tree was visualized with FigTree software version 1.4.4 (Rambaut, 2014).

954 **4. Discussion**

955 In the present study, an unexpected high prevalence (100%) of *M. ovis* was found
956 in horses from Alvorada do Sul County, Parana State, southern Brazil. Previous studies
957 on hemoplasmas in horses (clinically healthy, anemic and/or infested by ticks) from
958 different Brazilian biomes have failed to detect this group of bacteria by cPCR assays
959 (Vieira et al., 2015b, c; Ferreira et al., 2016; Valente et al., 2019). Herein, 50% of horses
960 tested hemoplasma-positive by cPCR; however, when the universal hemoplasma SYBR
961 green qPCR was applied, the prevalence rate increased by 100%. The first report of
962 *Haembartonella*-like organisms hemoplasmas in horses was performed by light
963 microscopy in Giemsa-stained blood smears in Nigeria (Gretilat, 1978). However, the
964 first molecular evidence was only performed in Germany in 2010, with horses infected
965 by hemoplasmas closely related to *M. haemofelis* and ‘*Candidatus* Mycoplasma
966 haematobos’ (Dieckmann et al., 2010). They reported that PCR positive horses less than
967 one-year-old had anemia; therefore, clinical infection was more relevant in these animals
968 (Dieckmann et al., 2012). In addition, *M. ovis*-like organisms were detected in horses
969 from Iran (Kalantari et al., 2020) and Nigeria (Happi and Oluniyi, 2020), and only Nigeria
970 was reported infestation by few unidentified ticks on animals.

971 Herein, 8/9 (88.89%) adult tick’s salivary glands of *D. nitens* from horses and 2/4
972 nymphs’ salivary glands of *R. microplus* from the environment tested positive for
973 hemoplasma. Unfortunately, several attempts to sequence the 16S rRNA gene were
974 unsuccessful due to weak bands, making sequencing impossible. However, our data
975 highlight that ticks of *D. nitens* and *R. microplus* may be involved in the transmission of
976 *M. ovis* in horses. More experimental transmission studies are needed to shed some light
977 on the role of *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks in the transmission of *Mycoplasma*
978 spp. to horses.

979 Previous studies Brazil have found that small ruminants may be infested by *R.*
980 *microplus* and different *Amblyomma* spp. ticks, while horses are frequently exposed to *D.*
981 *nitens*, *Amblyomma cajennense* sensu lato (s.l.) and *R. microplus* ticks (Labruna et al.,
982 2001). Herein, 36% of horses were infested by ticks, mainly *D. nitens*. *M. ovis* has been
983 reported in captive and free-living cervids (Grazziotin et al., 2011a; Grazziotin et al.,
984 2011b), goats (Machado et al., 2017), and sheep (Souza et al., 2019; Mongrue et al.,
985 2020). On small farms, for subsistence production, it is common to raise more than one
986 species of grazing systems in the same environment, and the close coexistence of these
987 animals can provide favorable conditions for vector infestation and, consequently, for
988 cross-infection.

989 The 100% infection prevalence in this study supports Kalantari et al. (2020) whom
990 related species of *M. ovis*-like, a member of the hemoplasma found mainly in sheep and
991 goats, infecting horses from Iran, with a prevalence of 6.77%. Moreover, the prevalence
992 of *M. ovis* observed in the present study was also higher than that found in sheep (78.8%)
993 (Souza et al., 2019) and goats (39.30%) (Machado et al., 2017) from Brazil. Once *M. ovis*
994 is a circulating pathogen in Brazil, infecting ruminants (Machado et al., 2017; Souza et
995 al., 2019), more studies are needed to better elucidate the equine hemoplasmosis since
996 these animals are important hosts of ticks in Brazil and have close contact with humans.

997 Phylogenetic analysis of the sequence of hemotropic *Mycoplasma* spp. detected
998 in this study showed $\geq 99\%$ identity with *M. ovis* sequences detected in horses from Iran
999 (MH615809), in humans from the USA (KF313922, GU230144), goats from China
1000 (KU983744), and sheep from Hungary (EU165511) and Brazil (MN173879, MN173878,
1001 MN173880). Corroborating this finding, the Neighbor-Net network analysis evidenced
1002 the genetic similarity among the hemoplasma species circulating in horses from Brazil
1003 and the *M. ovis* from different mammals around the world, including human beings.

1004 In this work, it was possible to detect a low genetic diversity with six haplotypes,
1005 which corroborates previous studies from China and Mexico (Wang et al., 2017;
1006 Martínez-Hernández et al., 2018). The high prevalence (100%) of *M. ovis* in infected
1007 animals is reported in previous studies in sheep, which point out that this bacterium can
1008 be widely spread within a herd with a prevalence of up to 100% (Machado et al., 2017;
1009 Martínez-Hernández et al., 2018).

1010 The occurrence of co-infection of hemoplasmas with agents of equine
1011 piroplasmosis was also found in this study. This may be further evidence for the potential
1012 vector of ticks for hemoplasmas, once the EP agents are transmitted by ticks' bites. Ticks
1013 have been associated with the transmission of hemoplasmas in several species, however
1014 once it is a microorganism until then not cultivable *in vitro*, the data regarding this affinity
1015 are still very scarce (Messick, 2004). Interestingly, in this study *Mycoplasma* spp. was
1016 detected in the salivary gland of *D. nitens* and *R. microplus* ticks, reinforcing the evidence
1017 that ticks may act as vectors of equine hemoplasmas.

1018 Equine piroplasmosis has a significant impact on the horse industry, and it is
1019 caused by *T. equi* and/or *B. caballi*, the most important group of TBP agents in horses. In
1020 this study, 72.73% of horses were positive for at least one EP agent when combining
1021 serological and molecular assays. Previous studies in carthorses from different regions of
1022 Parana State have found 95% positivity for EP agents, which may have been due to

1023 differences between diagnostic tests (IFA vs. cELISA) used (Vieira et al., 2013c). In
1024 Brazil, *T. equi* and *B. caballi* are transmitted mainly by *R. microplus* and *D. nitens* ticks,
1025 respectively (Scoles and Ueti, 2015) and in the present study, 36.36% of horses were
1026 infested with *R. microplus* or *D. nitens* ticks at the time of sampling. However, among
1027 the horses infested, 93.62% was by *D. nitens*, the main vector of *B. caballi*, and in animals
1028 we found a higher occurrence of *T. equi* in this region. What could explain this finding
1029 would be the collection period, which was not conducive to finding large amounts of *R.*
1030 *microplus* (*T. equi* vector) in the animals, due to the cycle of this vector, since in our study
1031 all larvae of ticks found in the environment were identified as *R. microplus*.

1032 In the present study, although all horses were PCR-negative for *Ehrlichia* spp.,
1033 31.81% of animals sera reacted to *E. canis* crude antigens by IFA, whereas 40.91% were
1034 seropositive to *T. equi* by IFA, and 59.09% were PCR-positive. In previous studies in the
1035 same rural settlement, researchers found 50% of horses positive for *Ehrlichia* spp. by IFA
1036 and 84% positive for *T. equi* by IFA. Thus, it is possible to observe over 10 years a
1037 decrease in seropositivity for the pathogens studied. Even in the case of horses highly
1038 exposed to tick bites, one explanation would be the change in the epidemiological
1039 dynamics of tick genera in the region. In the previous study, differing from the present
1040 study, the researchers found ticks of the genus *Amblyomma* sp., where there is a
1041 correlation between the presence of this tick and the high prevalence of *T. equi* and
1042 *Ehrlichia* spp. (Valente et al., 2019; Vieira, et al., 2013a; Vieira et al., 2013c).

1043

1044 **Conclusion**

1045 For the author's knowledge, this is the first report of *M. ovis*-like infection in
1046 horses in Brazil, using molecular techniques to detect hemoplasma infection in horses,
1047 however we do not know what the clinical impacts on the animals. *Mycoplasma* spp. was
1048 detected in salivary glands of *D. nitens* and *R. microplus*, and further studies are needed
1049 to clarify the vectorial action of these species. It was possible to observe a low occurrence
1050 of *Ehrlichia* spp. and absence of positive PCR in a region where *Amblyomma sculptum*
1051 ticks were not found.

1052

1053 **Conflict of interests**

1054 The authors declared no conflict of interest.

1055

1056 **ACKNOWLEDGMENTS**

1057 The authors are grateful to the Brazilian National Council of Scientific and
1058 Technological Development (CNPq) (grant no. 425597/2018-0) for financial aid and
1059 support to carry out this research. This study is part of a Master's degree for Monica
1060 Kakimori at the Universidade Estadual de Londrina. Monica Kakimori was sponsored by
1061 a fellowship from the CNPq. Flavia Collere was sponsored by a fellowship from the
1062 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) at the time of
1063 this study. Anna Mongruel was sponsored by a fellowship from the São Paulo Research
1064 Foundation (FAPESP - 2019/26403-0). The CNPq also provided a Research Productivity
1065 (PQ) fellowship to Drs. Daniel M. Aguiar (CNPq - 303677/2018-0), Marcos André
1066 (CNPq - 309520/2017-7) and Rafael Vieira (CNPq - 313161/2020-8). The authors also
1067 thank Hubert D. Fanien for providing O'TOM[®]/Tick Twister[®].

1068

1069 **Reference**

1070

- 1071 Aguiar, D. M., Cavalcante, G. T., Pinter, A., Gennari, S. M., Camargo, L. M. A., &
1072 Labruna, M. B. (2007). Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales:
1073 Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks
1074 from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, *44*(1), 126–132.
1075 [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[126:POECRA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[126:POECRA]2.0.CO;2)
- 1076 Almeida, A. P., Souza, T. D., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2013). Novel *ehrlichia*
1077 and *hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in
1078 southeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology*, *50*(3), 640–646.
1079 <https://doi.org/10.1603/ME12272>
- 1080 Baldani, C. D., Machado, R. Z., Botteon, P. D. T. L., Takakura, F. S., & Massard, C. L.
1081 (2004). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG
1082 antibodies against *Babesia equi* in horses. *Ciência Rural*, *34*, 1525-1529.
- 1083 Baldani, C. D., Machado, R. Z., Raso, T. F., & Pinto, A. A. (2007). Serodiagnosis of
1084 *Babesia equi* in horses submitted to exercise stress. *Pesquisa Veterinária*
1085 *Brasileira*, *27*, 179-183.
- 1086 Baldani, C. D., Nakaghi, A. C. H., & Machado, R. Z. (2010). Occurrence of *Theileria*
1087 *equi* in horses raised in the Jaboticabal microregion, São Paulo State, Brazil.
1088 *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *19*(4), 228–232.
1089 <https://doi.org/10.1590/S1984-29612010000400007>

- 1090 Baneth, G. (2014). Tick-borne infections of animals and humans: A common ground. In
1091 *International Journal for Parasitology* (Vol. 44, Issue 9, pp. 591–596). Elsevier
1092 Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.011>
- 1093 Barbieri, A. R. M., Szabó, M. P. J., Costa, F. B., Martins, T. F., Soares, H. S., Pascoli,
1094 G., Torga, K., Saraiva, D. G., Ramos, V. N., Osava, C., Gerardi, M., Dias, R. A.,
1095 Moraes, E. A., Ferreira, F., Castro, M. B., & Labruna, M. B. (2019). Species
1096 richness and seasonal dynamics of ticks with notes on rickettsial infection in a
1097 Natural Park of the Cerrado biome in Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *10*(2),
1098 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.010>
- 1099 Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G. H. (2006). *Carrapatos de Importância*
1100 *Médico- Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação*
1101 *de espécies*. Vox/ICTTD-3/Butantan.
- 1102 Díaz-Sánchez, A. A., Pires, M. S., Estrada, C. Y., Cañizares, E. V., del Castillo
1103 Domínguez, S. L., Cabezas-Cruz, A., Rivero, E. L., da Fonseca, A. H., Massard, C.
1104 L., & Corona-González, B. (2018). First molecular evidence of *Babesia caballi*
1105 and *Theileria equi* infections in horses in Cuba. *Parasitology Research*, *117*(10),
1106 3109–3118. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6005-5>
- 1107 Dieckmann, S. M., Hoelzle, K., Dieckmann, M. P., Straube, I., Hofmann-Lehmann, R.,
1108 & Hoelzle, L. E. (2012). Occurrence of hemotrophic *mycoplasmas* in horses with
1109 correlation to hematological findings. *Veterinary Microbiology*, *160*(1–2), 43–52.
1110 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.016>
- 1111 Dieckmann, S. M., Winkler, M., Groebel, K., Dieckmann, M. P., Hofmann-Lehmann,
1112 R., Hoelzle, K., Wittenbrink, M. M., & Hoelzle, L. E. (2010). Haemotrophic
1113 *Mycoplasma* infection in horses. *Veterinary Microbiology*, *145*(3–4), 351–353.
1114 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.009>
- 1115 Dumler, J. S., Barbet, A. F., Bekker, C. P. J., Dasch, G. A., Palmer, G. H., Ray, S. C.,
1116 Rikihisa, Y., & Rurangirwa, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families
1117 Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of
1118 some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia*
1119 with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combi. *International Journal of*
1120 *Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(6), 2145–2165.
1121 <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- 1122 Friedhoff, K. T., Tenter, A. M., & Müller, I. (1990). Haemoparasites of equines: impact
1123 on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique (International*

- 1124 *Office of Epizootics*), 9(4), 1187–1194. <https://doi.org/10.20506/rst.9.4.535>
- 1125 Grazziotin, A. L., Duarte, J. M. B., Szabó, M. P. J., Santos, A. P., Guimarães, A. M. S.,
1126 Mohamed, A., ... & Messick, J. B. (2011). Prevalence and molecular
1127 characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer
1128 populations. *Journal of wildlife diseases*, 47(4), 1005-1011.
- 1129 Grazziotin, A. L., Santos, A. P., Guimaraes, A. M. S., Mohamed, A., Cubas, Z. S., de
1130 Oliveira, M. J., Santos, L. C. dos, de Moraes, W., Vieira, R. F. da C., Donatti, L.,
1131 de Barros Filho, I. R., Biondo, A. W., & Messick, J. B. (2011). *Mycoplasma ovis* in
1132 captive cervids: Prevalence, molecular characterization and phylogeny. *Veterinary
1133 Microbiology*, 152(3–4), 415–419. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.001>
- 1134 Gretillat, S. (1978). *L' hémobartonellose équine Niger*. 351–358.
- 1135 Happi, A. N., & Oluniyi, P. E. (2020). A rare case of equine Haemotropic *Mycoplasma*
1136 infection in Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 41(3), 274-286.
1137 <https://doi.org/10.4314/nvj.v41i3.8>
- 1138 Hausberger, M., Roche, H., Henry, S., & Visser, E. K. (2008). A review of the human–
1139 horse relationship. *Applied animal behaviour science*, 109(1), 1-24.
1140 <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.04.015>
- 1141 Hoelzle, K., Winkler, M., Kramer, M. M., Wittenbrink, M. M., Dieckmann, S. M., &
1142 Hoelzle, L. E. (2011). Detection of *Candidatus Mycoplasma haemobos* in cattle
1143 with anaemia. *Veterinary Journal*, 187(3), 408–410.
1144 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.016>
- 1145 Hornok, S., Meli, M. L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., Lutz, H., &
1146 Hofmann-Lehmann, R. (2010). Molecular investigation of hard ticks (Acari:
1147 Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and
1148 mycoplasmal agents. *Veterinary Microbiology*, 140(1–2), 98–104.
1149 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.013>
- 1150 Kalantari, M., Sharifiyazdi, H., Ghane, M., & Nazifi, S. (2020). The occurrence of
1151 hemotropic *Mycoplasma ovis*-like species in horses. *Preventive Veterinary
1152 Medicine*, 175(December 2019). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104877>
- 1153 Labruna, M. B., Kerber, C. E., Ferreira, F., Faccini, J. L. H., De Waal, D. T., &
1154 Gennari, S. M. (2001). Risk factors to tick infestations and their occurrence on
1155 horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 97(1), 1–14.
1156 [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00387-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00387-9)
- 1157 Labruna, M. B., Santos, F. C. P., Ogrzewalska, M., Nascimento, E. M. M., Colombo, S.,

- 1158 Marcili, A., & Angerami, R. N. (2014). Genetic identification of Rickettsial
1159 isolates from fatal cases of Brazilian spotted fever and comparison with *Rickettsia*
1160 *rickettsii* isolates from the American continents. *Journal of Clinical Microbiology*,
1161 52(10), 3788–3791. <https://doi.org/10.1128/JCM.01914-14>
- 1162 Machado, C. A. L., Vidotto, O., Conrado, F. O., Santos, N. J. R., Valente, J. D. M.,
1163 Barbosa, I. C., Trindade, P. W. S., Garcia, J. L., Biondo, A. W., Vieira, T. S. W. J.,
1164 & Vieira, R. F. C. (2017). *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from
1165 northeastern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious*
1166 *Diseases*, 55(July), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.08.004>
- 1167 Martínez-Hernández, J. M., Ballados-González, G. G., Fernández-Bandala, D.,
1168 Martínez-Soto, S., Velázquez-Osorio, V., Martínez-Rodríguez, P. B., ... &
1169 Sánchez-Montes, S. (2019). Molecular detection of *Mycoplasma ovis* in an
1170 outbreak of hemolytic anemia in sheep from Veracruz, Mexico. *Tropical animal*
1171 *health and production*, 51(1), 243-248.
- 1172 Messick, J. B. (2004). Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new
1173 insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(1), 2–13.
1174 <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x>
- 1175 Mongruel, A. C. B., Spanhol, V. C., Valente, J. D. M., Porto, P. P., Ogawa, L.,
1176 Otomura, F. H., Marquez, E. de S., André, M. R., Vieira, T. S. W. J., Vieira, R. F.
1177 da C., Mongruel, A. C. B., Spanhol, V. C., Valente, J. D. M., Porto, P. P., Ogawa,
1178 L., Otomura, F. H., Marquez, E. de S., André, M. R., Vieira, T. S. W. J., & Vieira,
1179 R. F. da C. (2020). Survey of vector-borne and nematode parasites involved in the
1180 etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. *Revista Brasileira de*
1181 *Parasitologia Veterinária*, 29(3). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020062>
- 1182 Nion, V. L. O., Montilla, H. J., Qurollo, B. A., Maggi, R. G., Hegarty, B. C., Tornquist,
1183 S. J., & Breitschwerdt, E. B. (2015). *Potentially Novel*. 21(2), 335–338.
- 1184 Maggi, R. G., Compton, S. M., Trull, C. L., Mascarelli, P. E., Mozayeni, B. R., &
1185 Breitschwerdt, E. B. (2013). Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in
1186 patients with or without extensive arthropod or animal contact. *Journal of Clinical*
1187 *Microbiology*, 51(10), 3237-3241.
- 1188 Souza, B. M. P. da S., Leal, ; Danielle Custódio, Barboza1, ; Débora Cristina Portela
1189 Medina, ; Uzêda2, R. S., Alcântara1, ; Adriano Costa De, Fernando, F. ; Bahia,
1190 L. ; M., ; Pita, G. L. F., & Roberto, F. ; C. (2010). Prevalence of ehrlichial
1191 infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de*

- 1192 *Parasitologia Veterinária*, 19(02), 89–93. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01902002>
- 1193 Souza, U. A., Oberrather, K., Fagundes-Moreira, R., De Almeida, B. A., Valle, S. D. F.,
1194 Girotto-Soares, A., & Soares, J. F. (2019). First molecular detection of
1195 *Mycoplasma ovis* (Hemotropic mycoplasmas) from sheep in Brazil. *Revista*
1196 *Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 28(3), 360–366.
1197 <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019022>
- 1198 Suzin, A., Vogliotti, A., Nunes, P. H., Barbieri, A. R. M., Labruna, M. B., & Szabó, M.
1199 P. J. (2020). Free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the Iguaçu National Park, Brazil:
1200 Temporal dynamics and questing behavior on vegetation. *Ticks and Tick-Borne*
1201 *Diseases*, 11(5), 101471. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101471>
- 1202 Valente, J. D. M., Mongruel, A. C. B., Machado, C. A. L., Chiyo, L., Leandro, A. S.,
1203 Britto, A. S., Martins, T. F., Barros-Filho, I. R., Biondo, A. W., Perotta, J. H.,
1204 Campos, A. N. S., Vidotto, O., Labruna, M. B., Aguiar, D. M., Vieira, T. S. W. J.,
1205 & Vieira, R. F. C. (2019). Tick-borne pathogens in carthorses from Foz do Iguaçu
1206 City, Paraná State, southern Brazil: A tri-border area of Brazil, Paraguay and
1207 Argentina. *Veterinary Parasitology*, 273, 71–79.
1208 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.008>
- 1209 Vieira, R. F. da C., Vieira, T. S. W. J., Nascimento, D. D. A. G., Martins, T. F.,
1210 Krawczak, F. S., Labruna, M. B., Chandrashekar, R., Marcondes, M., Biondo, A.
1211 W., & Vidotto, O. (2013). Investigação sorológica de espécies de *Ehrlichia* em
1212 cães, equinos e humanos de um assentamento rural do sul do Brasil. *Revista Do*
1213 *Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 55(5), 335–340.
1214 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500007>
- 1215 Vieira, R. F. da C., Vieira, T. S. W. J., Nascimento, D. do A. G., Martins, T. F.,
1216 Krawczak, F. S., Labruna, M. B., Chandrashekar, R., Marcondes, M., Biondo, A.
1217 W., Vidotto, O., Vieira, R. F. da C., Vieira, T. S. W. J., Nascimento, D. do A. G.,
1218 Martins, T. F., Krawczak, F. S., Labruna, M. B., Chandrashekar, R., Marcondes,
1219 M., Biondo, A. W., & Vidotto, O. (2013). Serological survey of *Ehrlichia* species
1220 in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern
1221 Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(5), 335–340.
1222 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500007>
- 1223 Vieira, T. S., Vieira, R. F., Krawczak, F. S., Soares, H. S., Guimarães, A. M., Barros-
1224 Filho, I. R., Marcondes, M., Labruna, M. B., Biondo, A. W., & Vidotto, O. (2016).
1225 *Ehrlichia* sp. infection in carthorses of low-income owners, Southern Brazil.

- 1226 *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 48, 1–5.
1227 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.07.002>
- 1228 Vieira, Thállitha S.W.J., Quorollo, B. A., Mongruel, A. C. B., Baggio, R. A., Vidotto, O.,
1229 Breitschwerdt, E. B., & Vieira, R. F. C. (2018). Potentially same novel *Ehrlichia*
1230 species in horses in Nicaragua and Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 24(5),
1231 953. <https://doi.org/10.3201/eid2405.172076>
- 1232 Vieira, Thállitha S.W.J., Vieira, R. F. C., Finger, M. A. P., Nascimento, D. A. G.,
1233 Sicupira, P. M. L., Dutra, L. H., Deconto, I., Barros-Filho, I. R., Dornbusch, P. T.,
1234 Biondo, A. W., & Vidotto, O. (2013). Seroepidemiological survey of *Theileria*
1235 *equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná
1236 State, southern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(6), 537–541.
1237 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.005>
- 1238 Vieira, T. S. W. J., Valente, J. D. M., Silva, N. B., Sicupira, P. M. L., Barros-Filho, I.
1239 R., Biondo, A. W., ... & Vidotto, O. (2015). Comparative study of two serological
1240 tests for detection of anti-*Theileria equi* antibodies in horses. *Semina: Ciências*
1241 *Agrárias*, 36(2), 4361-4364. [https://doi.org/10.5433/1679-](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4361)
1242 [0359.2015v36n6Supl2p4361](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4361)
- 1243 Wang, X., Cui, Y., Zhang, Y., Shi, K., Yan, Y., Jian, F., ... & Ning, C. (2017).
1244 Molecular characterization of hemotropic mycoplasmas (*Mycoplasma ovis* and
1245 ‘*Candidatus Mycoplasma haemovis*’) in sheep and goats in China. *BMC veterinary*
1246 *research*, 13(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1062-z>
- 1247 Willi, B., Meli, M. L., Lüthy, R., Honegger, H., Wengi, N., Hoelzle, L. E., Reusch, C.
1248 E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Development and application of a
1249 universal hemoplasma screening assay based on the SYBR green PCR principle.
1250 *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 4049–4054.
1251 <https://doi.org/10.1128/JCM.01478-09>
- 1252
- 1253
- 1254
- 1255
- 1256
- 1257

1258 Considerações finais

1259 Este é o primeiro relato de infecção por *M. ovis* em equinos na América e
1260 no Brasil utilizando técnicas moleculares para detectar infecção por hemoplasma
1261 em equinos, porém não se sabem quais podem ser os impactos clínicos nos
1262 animais. *Mycoplasma* spp. foi detectada em glândulas salivares de *D. nitens* e
1263 *R. microplus*, sendo necessários mais estudos para esclarecer a ação vetorial
1264 dessas espécies. Novos estudos devem ser realizados a fim de fornecer
1265 subsídios para padronização de métodos diagnósticos, identificação de
1266 potenciais vetores, bem como adoção de medidas de prevenção e controle.

1267 Foi possível observar uma baixa ocorrência de *Ehrlichia* spp. e ausência
1268 de PCR positivo em região onde não foram encontrados carrapatos *Amblyomma*
1269 *sculptum*. Além disso, a maior parte dos animais foi positiva para ao menos um
1270 agente causador da PE, sinalizando alta ocorrência na região.

1271

1272

1273

1274

1275

1276

1277

1278

1279

1280

1281


1282

1283

1284

1285

1286 ANEXO 1. AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
1287 (CEUA) – UEL



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 97/2020 Londrina, 5 de agosto de 2020.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: “Epidemiologia de patógenos transmitidos por carrapatos e leishmaniose em cães, equinos e humanos de assentamentos rurais e áreas urbanas da Região Norte do Estado do Paraná” protocolo CEUA nº 029.2020 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 da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia **05/08/2020**.

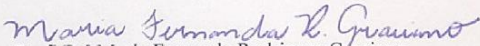
Este projeto tem por objetivo estudar a epidemiologia de doenças transmitidas por carrapato e leishmaniose em cães, equinos e humanos de assentamentos rurais e áreas urbanas da Região Norte do estado do Paraná utilizando métodos sorológicos e moleculares. **Grau de invasividade: 1.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/10/2020 a 30/02/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Cães; equídeos
Nº de animais	434, sendo Cães: 384 Equídeos: 50
Peso/ Idade	Variados
Sexo	Machos ou fêmeas
Origem	Assentamentos rurais e residências em áreas urbanas na Região Norte do estado do Paraná.
Amostras a serem coletadas	Sangue.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.



Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Profª Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Rafael Felipe da Costa Vieira
Responsável pelo projeto
C/C para a Chefia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/ CCA
C/C para a Direção do Centro de Ciências Agrárias/ CCA

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

1289 ANEXO 2. QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

PROJETO ASSENTAMENTO

Laboratório de Protozoologia Veterinária – CCA/DMVP – UEL

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO - EQUINOS

Cidade: _____ Propriedade nº _____

Data: ____/____/____

Proprietário: _____ Fone: _____

1) Quanto tempo mora no assentamento? _____

2) Visita área de mata ciliar: () Sim () Não

3) Presença carrapatos: () Sim () Não

4) Época do ano que aparecem: () primavera – () verão – () outono – () inverno
() ano todo

5) Controle de carrapatos: () Sim () Não 5.1) Qual produto? _____

6) Frequência controle carrapatos: () Semestral () Anual

Animal

Nº _____ Nome: _____ Idade: _____ Sexo: () M () F

Nº _____ Nome: _____ Idade: _____ Sexo: () M () F

Nº _____ Nome: _____ Idade: _____ Sexo: () M () F

Nº _____ Nome: _____ Idade: _____ Sexo: () M () F

Nº _____ Nome: _____ Idade: _____ Sexo: () M () F