



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NELSON JESSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOPLASMAS EM BÚFALOS DO MARANHÃO**

Londrina
2017

NELSON JESSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOPLASMAS EM BÚFALOS DO MARANHÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

dos Santos, Nelson Jessé Rodrigues.

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOPLASMAS EM BÚFALOS DO MARANHÃO / Nelson Jessé Rodrigues dos Santos. - Londrina, 2017. 34 f. : il.

Orientador: Odilon Vidotto.

Coorientador: Rafael Felipe da Costa Vieira.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Hemoparasitose em ruminantes - Tese. 2. Infecção por micoplasmas hemotrópicos - Tese. 3. Primeira descrição de espécie de hemoplasmas no Brasil - Tese. I. Vidotto, Odilon. II. Vieira, Rafael Felipe da Costa. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

NELSON JESSÉ RODRIGUES DOS SANTOS

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
HEMOPLASMAS EM BÚFALOS DO MARANHÃO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Andreas Lázarus Chryssafidis
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexander Welker Biondo
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Londrina, 20 de fevereiro de 2017.

DEDICATÓRIA

A todos educadores que me incentivaram e aos meus pais, maiores mestres que poderei ter em toda jornada de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador que proporcionou meu crescimento acadêmico, sempre com tranquilidade e segurança durante estes seis anos de parceria.

Aos professores Dr. Rafael Vieira e Dr. João Garcia pelo apoio fundamental para realização deste trabalho.

Ao colega de grupo de pesquisas Hugo Abate, e todos os demais colegas de trabalho, Aldair Matos, Aline Benitez, Ana Sue Sammi, Ana Flávia Minutti, Beatriz Nino, Carolina Machado, Daniel Barros, Felipe Martins, Jéssica Valente, João Sasse, Jonatas Campos, Leonilda dos Santos, Marcelle Mareze, Thais Agostinho, Thais Monica, Thállitha J. Vieira e Vanessa Holsbach.

Agradeço também àqueles que contribuíram para viabilizar este trabalho, os professores do IFMA Dr. Danilo Brito e Me. Sonália Paixão.

Agradeço especialmente aos meus pais Sr. Nelson Alves dos Santos e Sra. Edna R. de Carvalho dos Santos, e minha namorada Srta. Andresa S. da Silva pelo incentivo pessoal que sempre recebo para desenvolver minha vida profissional.

Epígrafe

“There are two ways to live your life. One is as though nothing is a miracle. The other is as though everything is a miracle”

Albert Einstein

SANTOS, Nelson Jessé Rodrigues dos. Ocorrência e caracterização molecular de hemoplasmas em búfalos do maranhão. 2017. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Hemoplasmas são um grupo de bactérias pleomórficas e incultiváveis *in vitro*, pertencentes ao filo Tenericutes, classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma*. Em exames laboratoriais são visualizados aderidos às hemácias ou livres no plasma do hospedeiro e seu diagnóstico, feito através da microscopia ótica vem sendo substituído pela Reação em Cadeia da Polimerase, teste de maior sensibilidade e especificidade. Já foram identificados infectando diversas espécies de mamíferos, com comprovada interferência na produtividade de ruminantes. O Brasil possui um rebanho bubalino de aproximadamente 1,36 milhões de animais, e o Maranhão é o estado da região nordeste com maior rebanho da região. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência hemoplasmas em búfalos do estado do Maranhão e identificar as espécies presentes. Um total de 314 amostras de sangue de búfalos foram coletadas nos municípios de Arari, Viana e Vitória do Mearim, na baixada maranhense. Inicialmente, para triagem genérica de hemoplasmas, as amostras foram submetidas a uma PCR para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA. As amostras positivas foram submetidas a outra reação com *primers* específicos para *Mycoplasma wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’. Das 314 amostras testadas, 138 (43,95%) foram positivas para hemoplasmas, das quais, 100 (72,46%) estavam coinfectadas, 30 (21,74%) infectadas somente com *M. wenyonii* e 8 (5,80%) somente com ‘*Ca. M. haemobos*’. Esse resultado identifica pela primeira vez a presença de micoplasmas hemotrópicos em búfalos no continente americano, bem como a primeira identificação molecular de *M. wenyonii* nesta espécie e em ruminantes no Brasil.

Palavras-chave: Hemoplasmas. infecção. *Mycoplasma wenyonii*. ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’. PCR.

SANTOS, Nelson Jessé Rodrigues dos Santos. Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in buffaloes from maranhão state. 2017. 34 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Hemoplasmas are a pleomorphic group of bacteria and uncultivable *in vitro* belonging to the filo Tenericutes, class Mollicutes and genus *Mycoplasma*. They are visualized attached on the red blood cells or free in the plasma of the host and its diagnosis made by optical microscopy has been replaced by the Polymerase Chain Reaction, test of higher sensitivity and specificity. They have been identified infecting several species of mammals with proven interference in ruminant productivity. Brazil has a buffalo herd of approximately 1.36 million animals, and Maranhão is the state of the northeast region with the largest herd in the region. The objectives of this work were to evaluate the occurrence of hemoplasmas in buffaloes of the State of Maranhão and to identify the present species. A total of 314 buffalo blood samples were collected in the municipalities of Arari, Viana and Vitória do Mearim, in the Maranhão state. Initially the samples were submitted to PCR with primers that amplified a fragment of the 16S rRNA gene for generic screening of hemoplasmas. The positive samples were submitted to another reaction with specific primers for *Mycoplasma wenyonii* and '*Candidatus Mycoplasma haemobos*'. Of the 314 samples tested, 138 (43.95%) were positive for hemoplasmas, of which 100 (43.95%) were coinfecting, 30 (21.74%) were infected with *M. wenyonii* and 8 (5.80%) only with '*Ca. M. haemobos*'. These results identified for the first time the presence of hemotropic mycoplasmas in buffaloes in the American continent, as well as the first molecular identification of *M. wenyonii* in this species and in ruminants in Brazil.

Key words: Hemoplasmas. Infection. *Mycoplasma wenyonii*. '*Candidatus Mycoplasma haemobos*'. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Mapa do estado do Maranhão, nordeste do Brasil. Em vermelho, Arari, Viana e Vitória do Mearim, três municípios da região da Baixada Maranhense..... 13
- Quadro 1** – Relação entre espécies de mamíferos e micoplasmas hemotrópicos correspondentes já descritos como seus infectantes 16
- Quadro 2** – Relação entre mamíferos da família Bovidae infectados por micoplasmas hemotrópicos e as prevalências/taxas de ocorrência nos países aonde já foram descritos..... 19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
rRNA	<i>Ribossomal Ribonucleic Acid</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3	REFERÊNCIAS	20
4	OBJETIVOS	24
4.1	OBJETIVO GERAL.....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	24
5	ARTIGO – HEMOTROPIC MYCOPLASMAS INFECTION IN WATER BUFFALOES (<i>Bubalus bubalis</i>) FROM NORTHEASTERN BRAZIL	25
	ABSTRACT	26
	INTRODUCTION	27
	MATERIAL AND METHODS.....	27
	RESULTS.....	29
	DISCUSSION.....	29
	CONCLUSION	30
	REFERENCES	30
6	CONCLUSÃO	33
7	ANEXO – PARECER ÉTICO	34

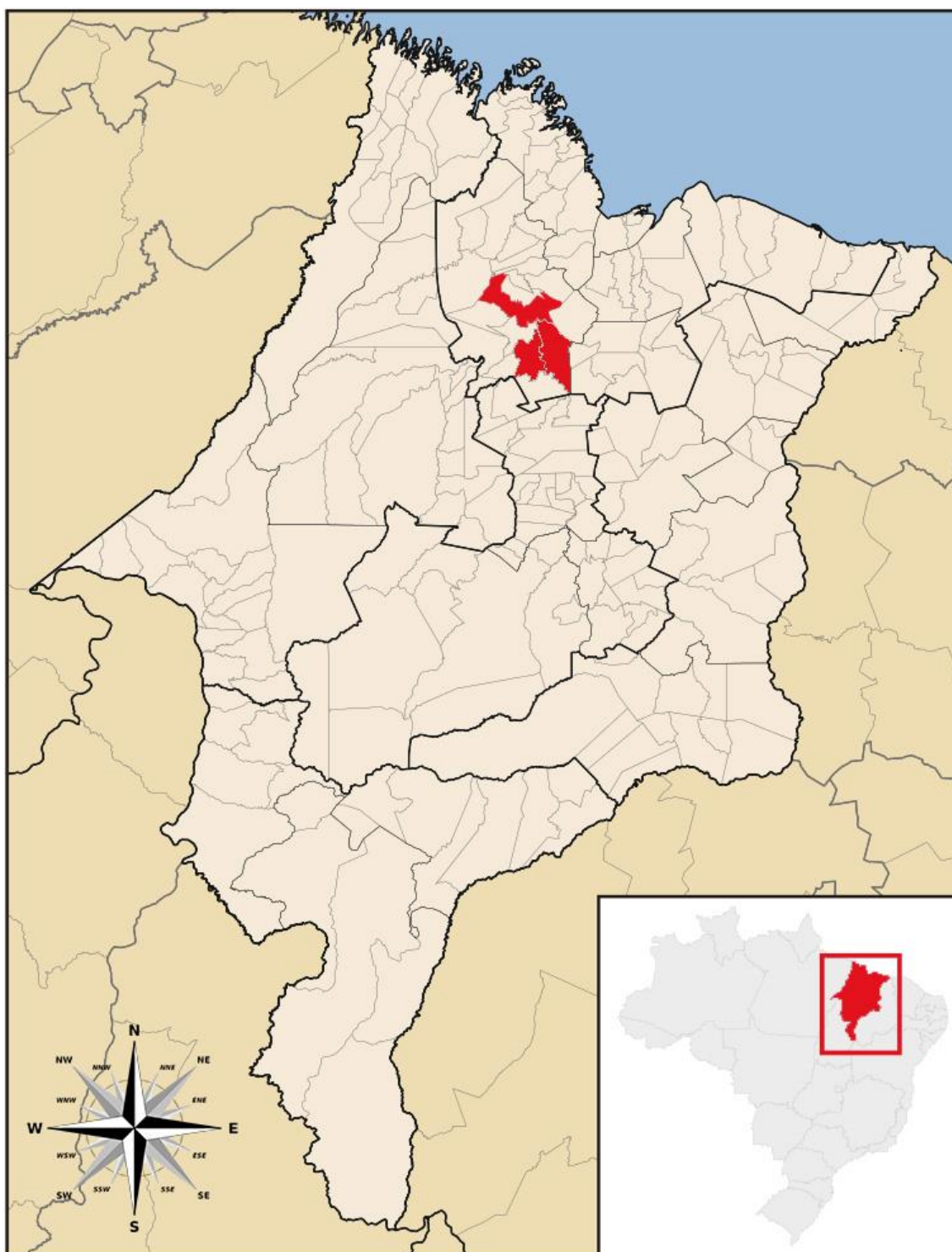
1 INTRODUÇÃO

A bubalinocultura foi difundida pelas características inerentes a espécie, como rusticidade e adaptabilidade às condições encontradas no Brasil. Introduzidos no país no fim do século XIX, o Brasil possui o maior rebanho da espécie no ocidente (BERNARDES, 2007). O país tem atualmente um rebanho bubalino de aproximadamente 1,36 milhões de cabeças. Levantamento feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística apurou que existia no ano de 2015 o número de 904.813 cabeças na região norte, 169.442 na região sudeste, 130.032 na região nordeste, 101.854 na região sul, e 59.495 na região centro-oeste. Destaque para os estados do Pará, Amapá, São Paulo e Maranhão, que representam 38,24%, 20,85%, 6,65% e 6,44% respectivamente. No estado do Maranhão havia 87.896 cabeças, número que o mantém como o maior produtor da região nordeste (67,60%). As cidades de Arari, Viana e Vitória do Mearim (Fig. 1) possuíam no ano de 2015, 4.787, 18.507 e 3.588 búfalos, respectivamente, o que representa 30,58% do rebanho estadual (IBGE, 2015). Essa vocação do país para a agropecuária se deve à vasta extensão do território, a disponibilidade natural de forrageiras e aos climas tropical e subtropical, encontrados em sua maior parte. No entanto, o clima associado a outros fatores ambientais favorecem o desenvolvimento de artrópodes hematófagos, que possuem potencial para agir como transmissores de patógenos.

A hemoplasmose é uma doença provocada por agentes do grupo dos micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas). São bactérias pleomórficas, sem parede celular e Gram negativas. São encontrados no sangue de mamíferos aderidos a membrana dos eritrócitos, observados no esfregaço sanguíneo como pequenos corpúsculos basófilos arredondados (MESSICK, 2004).

Os hemoplasmas possuem ampla distribuição mundial, e acredita-se estarem presentes em todos os continentes, fato possibilitado por relações de parasitismo bem estabelecidas (MESSICK, 2004) e pela forma de disseminação, principalmente, associada a vetores (MACIEIRA et al., 2008). Hemoplasmas já foram descritos parasitando uma grande variedade de mamíferos domésticos e silvestres (MORAIS et al., 2007; BIONDO et al., 2009), até seres humanos (SANTOS et al., 2008; VIEIRA et al., 2015). No entanto, pouco se sabe sobre a situação epidemiológica da hemoplasmose nos bubalinos no país.

Figura 1 – Mapa do estado do Maranhão, nordeste do Brasil. Em vermelho, Arari, Viana e Vitória do Mearim, três municípios da região da Baixada Maranhense.



2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os hemoplasmas estavam anteriormente compreendidos em um grande grupo de micro-organismos da ordem Rickettsiales, que agrupa as famílias Rickettsiaceae, Bartonellaceae e Anaplasmataceae. Os micoplasmas hemotrópicos, eram classificados em dois gêneros, *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*. Foram, então, reagrupados com base nas suas características fenotípicas, resistência a antibióticos e, principalmente, na forte semelhança filogenética do gene 16S rRNA no filo Tenericutes, classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae e unidos como gênero *Mycoplasma* (NEIMARK et al., 2001). Estes agentes caracterizam-se por serem bactérias pleomórficas, desprovidas de parede celular, Gram negativas, com 0,3 a 3 µm de diâmetro e com genoma reduzido, adaptados à vida parasitária. Os micoplasmas hemotrópicos, convencionalmente chamados de hemoplasmas, podem ser encontrados no sangue de mamíferos, evidenciados a microscopia ótica como corpúsculos arredondados extra eritrocitários. Provocam uma doença denominada micoplasmose hemotrópica ou hemoplasmose (anteriormente chamada como hemobartonelose e eperitrozoonose), caracterizada por anemia hemolítica imunomediada (MESSICK, 2004).

Vários artrópodes hematófagos já foram descritos como transmissores. Em pesquisa experimental já foi comprovada a transmissão de *M. haemofelis* e ‘*Ca. M. haemominutum*’ por pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* para gatos domésticos (WOODS et al., 2005). Piolhos da espécie *Polyplax serrata* foram evidenciados capazes de transmitir *Eperythrozoon coccoides*, para roedores de laboratório também sob condições experimentais. O mesmo trabalho não identificou possibilidade de transmissão do agente para os roedores por ácaros das espécies *Myocoptes musculus*, *Myobia musculi* e *Radfordia affinis* (BERKENKAMP; WESCOTT, 1988). Mosquitos *Aedes aegypti* e moscas *Stomoxys calcitrans* são capazes de transmitir mecanicamente o agente *Eperythrozoon suis* para suínos (PRULLAGE; WILLIAMS; GAAFAR, 1993) e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* são considerados os principais vetores de *M. haemocanis* para cães domésticos (SENEVIRATNA; WEERASINGHE; ARIYADASA, 1973). Ademais a transmissão transplacentária também já foi comprovada em bovinos (GIROTTO-SOARES et al., 2016).

O diagnóstico da hemoplasmose baseado na microscopia ótica de esfregaço sanguíneo é pouco confiável, pois depende do grau de parasitemia e da capacidade de distinção visual do técnico responsável pelo exame, que fica sujeito a interpretações errôneas quando existem resíduos de corantes e/ou alterações morfológicas das hemácias, como

Howell-Jolly. Para minimizar potenciais falhas, técnicas moleculares vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi inicialmente descrita para o diagnóstico de hemoplasmoses em bovídeos por (VANDERVOORT et al., 2001) para o agente *Eperythrozoon wenyoni*. Posteriormente Dieckmann et al. (2010) descreveram *primers* genéricos capazes de amplificar o gene ribossomal 16S rRNA, um segmento conservado ao grupo dos micoplasmas hemotrópicos, assim proporcionando aplicabilidade para diagnóstico em todos os já confirmados e possíveis hospedeiros.

Micoplasmas hemotrópicos já foram descritos, através de técnicas moleculares, parasitando espécies de mamíferos em todo mundo (MESSICK, 2004; BIONDO et al., 2009). Em felinos, *M. haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’, e ‘*Candidatus M. turicensis*’ já foram relatados em gatos domésticos anêmicos (SANTIS et al., 2014) e não anêmicos (MORAIS et al., 2007; MICELI et al., 2013) e em doze espécies de felídeos silvestres da África, América do Sul e Europa (WILLI et al., 2007). Em cães expostos aos vetores à carrapatos, *M. haemocanis* (VIEIRA et al., 2015) e ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (VIEIRA et al., 2015) já foram evidenciados. Suínos podem ser acometidos por *M. parvum* (NASCIMENTO et al., 2014) e *M. suis* (HOELZLE et al., 2014), inclusive, este último, capaz de invadir os eritrócitos (GROEBEL et al., 2009). Em cavalos, *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ foram encontrados, contrariando a ideia inicial de espécie-especificidade (DIECKMANN et al., 2010). Nos pequenos ruminantes, *Mycoplasma ovis* são achados em ovinos, caprinos (NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004) e em cervídeos silvestres (GRAZZIOTIN et al., 2011). Camelídeos também podem ser infectados por ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’, como comprovado em estudo que investigou a morte e adoecimento de alpacas de cativeiro na Suíça (MELI et al., 2010).

Quadro 1. Relação entre espécies de mamíferos e micoplasmas hemotrópicos correspondentes já descritos como seus infectantes.

Hospedeiro	Agente	Referência
Felídeos	<i>M. haemofelis</i> ' <i>Ca. M. haemominutum</i> ' ' <i>Ca. M. turicensis</i> '	Miceli et al., 2013 Santos et al., 2008 Willi et al., 2007
Cães	<i>M. haemocanis</i> ' <i>Ca. M. haematoparvum</i> '	Vieira et al., 2015
Suínos	<i>M. parvum</i> ' <i>Ca. M. haemominutum</i> ' <i>M. suis</i>	Nascimento et al., 2014 Hoelzle et al., 2014
Cavalos	<i>M. haemofelis</i> ' <i>Ca. M. haemobos</i> '	Dieckmann et al., 2010
Ovinos	<i>M. ovis</i>	Neimark et al., 2004
Caprinos	<i>M. ovis</i>	Neimark et al., 2004
Cervídeos	<i>M. ovis</i> ' <i>Ca. M. haemocervae</i> ' ' <i>Ca. M. erythroceruae</i> '	Grazziotin et al., 2011 Tagawa et al., 2014
Lhamas	' <i>Ca. M. haemolamae</i> '	Meli et al., 2010
Roedores	<i>M. haemomuris</i> ' <i>Ca. M. turicensis</i> ' <i>M. coccoides</i>	Conrado et al., 2015
Marsupiais	<i>Mycoplasma</i> sp.*	Silva et al., 2007
Humanos	<i>M. haemofelis</i>	Santos et al., 2008

Sinais clínicos já foram correlacionados à hemoplasmosose em bovinos. Todos os trabalhos nesse âmbito de pesquisa apontam a anemia como principal alteração da homeostase, e pode ser apresentada em sua forma grave (VG<15%), com policromasia, anisocitose e ponteados basófilos (HOFMANN-LEHMANN et al., 2004). Investigando um rebanho com 250 vacas Holandesas na Nova Zelândia, McFadden et al. (2016) conseguiram amplificar e sequenciar um fragmento do gene 16S rRNA de ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ de um animal de 5 anos de idade com anemia, classificada com regenerativa (VG 15%), leucocitose ($31,2 \times 10^9/L$) e relato de hemoglobinúria. Sem evidências microscópicas ou moleculares do acometimento por *Theileria orientalis*. Um mês após o episódio amostraram aleatoriamente 12 vacas para comparação do hematócrito com a hemoplasmosose. Onze foram molecularmente positivas, 9 para ‘*Candidatus Mycoplasmas haemobos*’ com hematócrito médio de 30% (mín. 26% e máx. 36%), e 2 para *Mycoplasma wenyonii* com hematócritos de 25% e 28%. Tagawa et al. (2009) para analisar a influência de hemoplasmosose bovina sobre parâmetros hematológicos analisaram 103 animais de Hokaido, Japão, e encontraram correlação entre a infecção por *Mycoplasma wenyonii* com leucocitose e por ‘*Candidatus Mycoplasmas haemobos*’ com redução na contagem de eritrócitos, redução na concentração de hemoglobina e redução na média de volume globular. Adicionalmente, em estudo com alpacas Meli et al. (2010) relataram a morte de animais importados do Peru que viviam em cativeiro na Suíça. Duas fêmeas adultas recém paridas e um neonato foram à óbito sem diagnóstico estabelecido. Sinais de anemia e perda de peso foram apontados e, à necropsia macroscópica, foi evidenciada a palidez generalizada de mucosas.

Há descrições de hemoplasmas em bovinos de diversas regiões do mundo. No Japão, Tagawa et al. (2013) encontraram uma prevalência de 89,2% (n=93), destes, 35,5% somente para *Mycoplasma wenyonii*, 19,4% somente ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ e 34,4% positivo aos dois agentes. Na Alemanha, Baggenstos et al. (2012) pesquisaram, através da PCR, a ocorrência de hemoplasmas em 23 vacas leiteiras com sinais sugestivos da doença e que estavam a sete dias em tratamento. Destas, 4 foram positivas para ‘*Candidatus M. haemobos*’ e 1 para *M. wenyonii*. Na Hungria, Hornok et al. (2011), pesquisaram a transmissão transplacentária, e, em 38 vacas infectadas por pelo menos um dos agentes, encontraram 10,5% de neonatos infectados. Giroto-Soares et al. (2016) também identificaram em bovinos do Brasil a transmissão transplacentária, além da variação de susceptibilidade à infecção entre raças leiteiras. Na China, Yan et al. (2008), utilizando o esfregaço sanguíneo e a PCR, reportaram *Mycoplasma wenyonii* acometendo 13 animais taurinos hospitalizados com sinais sugestivos de hemoplasmosose.

Até então existe apenas uma única pesquisa que descreveu a hemoplasmose em búfalos. Em Guangxi, sul da China, 25 animais magros, sem apetite, com os pêlos opacos e diminuição da produção de leite foram amostrados. Amostras de sangue foram submetidas à PCR com *primers* específicos para '*Candidatus Mycoplasma haemobos*'. Oito foram positivos (32%). Adicionalmente, uma sequência foi depositada no GenBank pelo código EF424082 (SU et al., 2010).

A situação da micoplasmose hemotrópica nos bovídeos ainda é pouco estudada no Brasil. Até o momento há apenas duas pesquisas publicadas avaliando a prevalência dessa infecção em bovinos, e uma que investigou a transmissão transplacentária. Dados levantados mostraram uma prevalência de 61%, em bovinos leiteiros da região de Londrina, norte do Paraná (GIROTTI et al., 2012), e 64,2%, também em bovinos leiteiros, do município de Ji-Paraná, leste de Rondônia (WITTER et al., 2017). Ambos trabalhos apenas identificaram o agente '*Candidatus Mycoplasmas haemobos*' infectando os animais objetos dos estudos.

Quadro 2. Relação entre mamíferos da família Bovidae infectados por micoplasmas hemotrópicos e as prevalências/taxas de ocorrência nos países aonde já foram descritos.

Espécie	País	n	Frequência			Referência
			M.w	C.M.h	Coinfecção	
Bovinos	Japão	93	35,5%	19,4%	34,4%	Tagawa et al., 2013
Bovinos	Japão	343	38,5%	39,1%	12,8	Tagawa et al., 2012
Bovinos	Alemanha	23	4,3%	13,0%	65,2%	Baggenstos et al., 2012
Bovinos	Hungria	38	94,7%	97,4%	100%	Hornok et al, 2011
Bovinos	Suíça	277	73,6%	57,8%	50,2%	Meli et al., 2010
Bovinos	Brasil	433	-	61,0%	-	Giroto et al., 2012
Bovinos	Brasil	320	-	64,2%	-	Witter et al., 2017
Bovinos	China	42	-	14,3%	-	Su et al., 2010
Búfalo	China	32	-	32,0%	-	Su et al., 2010

3 REFERÊNCIAS

- BAGGENSTOS, R.; WENZINGER, B.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; KNUBBEN-SCHWEIZER, G. [Haemoplasma infection in a dairy cow]. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere**, v. 40, n. 6, p. 397–400, 2012.
- BERKENKAMP, S. D.; WESCOTT, R. B. Arthropod Transmission of Eperythrozoon Coccoides in Mice. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 398–401, ago. 1988.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil : situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293–298, 2007.
- BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. dos; GUIMARÃES, A. M. D. S.; VIEIRA, R. F. da C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. D. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H. A. de; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 1–7, 2009.
- DIECKMANN, S. M.; WINKLER, M.; GROEBEL, K.; DIECKMANN, M. P.; HOFMANN-LEHMANN, R.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M. M.; HOELZLE, L. E. Haemotrophic Mycoplasma infection in horses. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3–4, p. 351–353, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.009>>.
- GIROTTO-SOARES, A.; SOARES, J. F.; BOGADO, A. L. G.; MACEDO, C. A. B. de; SANDESKI, L. M.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O. “Candidatus Mycoplasma haemobos”: Transplacental transmission in dairy cows (Bos taurus). **Veterinary Microbiology**, v. 195, p. 22–24, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.020>>.
- GIROTTO, A.; ZANGIRÓLAMO, A. F.; BOGADO, A. L. G.; SOUZA, A. S. L. e; SILVA, G. C. F. da; GARCIA, J. L.; VILAS BOAS, L. A.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Molecular detection and occurrence of “ Candidatus Mycoplasma haemobos ” in dairy cattle of Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 310, p. 342–344, 2012.
- GRAZZIOTIN, A. L.; SANTOS, A. P.; GUIMARAES, A. M. S.; MOHAMED, A.; CUBAS, Z. S.; OLIVEIRA, M. J. De; SANTOS, L. C.; MORAES, W. De; VIEIRA, R. F. da C.; DONATTI, L.; BARROS FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Mycoplasma ovis in captive cervids : Prevalence , molecular characterization and phylogeny. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 415–419, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.001>>.
- GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M. M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, L. E. Mycoplasma suis Invades Porcine Erythrocytes □. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 576–584, 2009.
- HOELZLE, L. E.; ZEDER, M.; FELDER, K. M.; HOELZLE, K. Pathobiology of Mycoplasma suis. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 1, p. 20–25, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.07.023>>.
- HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; DREHER, U. M.; DEPLAZES, P.; BRAUN, U.;

ENGELS, M.; JO, K.; THOMA, R.; GRIOT, C.; WILLI, B.; SCHMIDT, J.; KOCAN, K. M.; LUTZ, H. Concurrent Infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3775–3780, 2004.

HORNOK, S.; MICSUTKA, A.; MELI, M. L.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 411–414, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.031>>.

IBGE. Estados@, Produção da Pecuária Municipal. 2015. <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ma&tema=pecuaria2015>> acessado em 12 de dezembro de 2017.

MACIEIRA, D. B.; MENEZES, R. de C. A. A. de; DAMICO, C. B.; ALMOSNY, N. R. P.; MCLANE, H. L.; DAGGY, J. K.; MESSICK, J. B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro - Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 120–129, 2008.

MCFADDEN, A. M. J.; HA, H. J.; DONALD, J. J.; BUENO, I. M.; VAN ANDEL, M.; THOMPSON, J. C.; TISDALL, D. J.; PULFORD, D. J. Investigation of bovine haemoplasmas and their association with anaemia in New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 64, n. 1, p. 65–68, 2 jan. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2015.1090356>>.

MELI, M. L.; KAUFMANN, C.; ZANOLARI, P.; ROBERT, N.; WILLI, B.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Development and application of a real-time TaqMan qPCR assay for detection and quantification of “Candidatus Mycoplasma haemolamae” in South American camelids. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 3–4, p. 290–294, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.029>>.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2–13, 2004.

MICELI, N. G.; GAVIOLI, F. A.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; SOUSA, V. R. F.; SOUSA, K. C. M. de; MACHADO, R. Z. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 385–390, 2013.

MORAIS, H. A. De; VIDOTTO, O.; BAUMANN, A.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Co-infection with Mycoplasma haemofelis and “Candidatus Mycoplasma haemominutum” in three cats from Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, p. 518–520, 2007.

NASCIMENTO, N. C.; SANTOS, A. P.; CHU, Y.; GUIMARAES, A. M. S.; BAIRD, A. N.; WEIL, A. B.; MESSICK, J. B. Microscopy and genomic analysis of Mycoplasma parvum strain Indiana. **Veterinary Research**, v. 42, n. 86, p. 1–11, 2014.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. Mycoplasma ovis comb. nov. (formerly Eperythrozoon ovis), an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 0, p. 365–

371, 2004.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.-E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Proposal to Transfer Some Members of the Genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the Genus *Mycoplasma* with Descriptions of “*Candidatus Mycoplasma Haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma Haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma Haemosuis*” and “*Candidatus Mycoplasma*”.

International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 51, n. 3, p. 891–899, maio 2001.

PRULLAGE, J. B.; WILLIAMS, R. E.; GAAFAR, S. M. On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary Parasitology**, v. 50, p. 125–135, 1993.

SANTOS, A. P. dos; SANTOS, R. P. dos; BIONDO, A. W.; DORA, J. M.; GOLDANI, L. Z.; OLIVEIRA, S. T. De; GUIMARÃES, A. M. D. S.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H. A. de; GONZÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 2006–2008, 2008.

SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE; ARIYADASA, S. Transmission of *Haemobartonella Canis* by the Dog Tick, *Rhipicephalus Sanguineus*. **Research in Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 112–114, jan. 1973.

SU, Q. L.; SONG, H. Q.; LIN, R. Q.; YUAN, Z. G.; YANG, J. F.; ZHAO, G. H.; HUANG, W. Y.; ZHU, X. Q. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China. **Tropical Animal Health Production**, v. 42, p. 1805–1808, 2010.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; YOKOYAMA, N.; INOKUMA, H. Comparison of the Effect of Two Hemoplasma Species on Hematological Parameters in Cattle. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 72, n. 1, p. 113–115, 2009.

TAGAWA, M.; YAMAKAWA, K.; AOKI, T.; MATSUMOTO, K.; ISHII, M.; INOKUMA, H. Effect of Chronic Hemoplasma Infection on Cattle Productivity. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 75, n. 10, p. 1271–1275, 2013.

VANDERVOORT, J. M.; BOURNE, C.; CARSON, R. L.; HEATH, A. M.; BOUDREAUX, M. K. Use of a Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Infection with *Eperythrozoon Wenyonii* in Cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 10, p. 1432–1434, nov. 2001.

VIEIRA, R. F. da C.; VIDOTTO, O.; VIEIRA, T. S. W. J.; GUIMARÃES, A. M. D. S.; SANTOS, A. P. dos; NASCIMENTO, N. C.; SANTOS, N. J. R. dos; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Molecular investigation of hemotropic mycoplasmas in humans beings, dogs and horses in a rural settlement in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 353–357, 2015.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; CATTORI, V.; MELI, M. L.; VARGAS, A.; MARTÍNEZ, F.; ROELKE, M. E.; RYSER-DEGIORGIS, M.-P.; LEUTENEGGER, C. M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide Occurrence of Feline Hemoplasma Infections in Wild Felid Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159–1166, 2007.

WITTER, R.; MELO, A. L. T.; PACHECO, T. dos A.; MENEGUZZI, M.; VILAS BOAS, R.; NAKAZATO, L.; CHITARRA, C. S.; OLIVEIRA, A. C. S. De; PACHECO, R. C. Prevalence of “Candidatus Mycoplasma haemobos” detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, p. e20160805, 2017.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782017000300451&script=sci_arttext>.

WOODS, J. E.; BREWER, M. M.; HAWLEY, J. R.; WISNEWSKI, N.; LAPPIN, M. R. Evaluation of Experimental Transmission of Candidatus Mycoplasma Haemominutum and Mycoplasma Haemofelis by Ctenocephalides Felis to Cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p. 1008–1012, jun. 2005.

YAN, Z.; LIU, J.; CHEN, T.; CHENG, Z.; GUO, H.; WANG, Z.; WANG, Y. Treatment of Mycoplasma wenyonii Infection in Cows with Imidocarb Dipropionate Injection-acupuncture. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 1, n. 2, p. 143–148, 2008. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2005-2901\(09\)60035-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2005-2901(09)60035-2)>.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de hemoplasmas em bubalinos do Maranhão.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Diagnosticar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em búfalos da região da baixada maranhense;

Caracterizar molecularmente os hemoplasmas de búfalos da região da baixada maranhense.

5 ARTIGO

**INFECÇÃO POR MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM BÚFALOS D'ÁGUA
(*Bubalus bubalis*) DO NORDESTE DO BRASIL**

**HEMOTROPIC MYCOPLASMAS INFECTION IN WATER BUFFALOES (*Bubalus
bubalis*) FROM NORTHEASTERN BRAZIL**

Artigo formatado sob padrões da revista Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.

ABSTRACT

Two species of hemotropic mycoplasmas (HM) are known to infect large domestic ruminants, *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos'. Although HM has been described in cattle worldwide, data in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) remain scarce. Accordingly, the aim was to determine the occurrence of HM in water buffaloes from northeastern Brazil. A total of 138/314 (43.95%) buffaloes were positive for HM (30 *M. wenyonii* alone, 8 'Ca. M. haemobos' alone and 100 both). This was the first report of *M. wenyonii* infection in ruminants from Brazil. Clinical signs of hemoplasmosis in buffaloes remain unknown.

Key-words: hemoplasmas, *Mycoplasma wenyonii*, 'Candidatus Mycoplasma haemobos', ruminants, PCR.

1. Introduction

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) have been described as gram-negative pleomorphic bacteria, that can be found attached to the erythrocytes surface of a variety of mammalian species, and may cause mild to severe anemia [1].

Six species have been described to infect ruminants of the family Bovidae, *Mycoplasma wenyonii* [2], ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ [3], *Mycoplasma ovis* [4], ‘*Candidatus Mycoplasma haemolamae*’ [5], ‘*Candidatus Mycoplasma erythroceruae*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma haemocervae*’ [6]. In Brazil, *M. ovis* [7] and ‘*Ca. M. haemobos*’ [8,9] were detected in deer and cattle, respectively. In buffaloes (*Bubalus bubalis*), a previous study have described ‘*Ca. M. haemobos*’ infecting animals from China [10].

Buffaloes are recognized by their rusticity, ability to adapt to different environmental conditions, and resistance to infectious and parasitic diseases [11]. The buffalo population in Brazil represents 1.36 million animals [12], which concentrates the majority of the South America herd [11]. Considering that the Brazilian climate favors the presence of arthropod vectors, these animals may be at a higher risk of infection by hemoplasmas (HM). Accordingly, this study has aimed to identify the occurrence of hemoplasma species in buffaloes from northeastern Brazil, using PCR-based assays.

2. Material and methods

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use in Education and Research at the Instituto Federal of Maranhão (protocol number 01/2015).

2.1. Sampling

A total of 314 buffaloes blood samples were collected from four rural farms, one located in Arari (3°27'24.6"S 44°46'33.2"W), one in Viana (3°12'51.7"S 45°00'08.4"W), and

two in Vitória do Mearim (3°27'57.4"S 44°52'19.7"W) counties, Maranhão State, northeastern Brazil.

2.2. DNA extraction

The DNA was extracted from 200 µL blood using a commercially available kit (Biopur™ Mini Spin Plus Extraction Kit, Biometrix Diagnostica® Curitiba, Paraná, BRA), according to the manufacturer's instructions. Ultrapure water was used as a negative control in parallel to monitor cross-contamination in each batch of 30 samples.

2.3. PCR assays

All samples were tested using a PCR for the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) to ensure successful DNA extraction, as previously described [13]. Thereafter, samples were initially screened by a previously described pan-hemoplasma PCR assay [14]. A goat-positive blood sample for *M. ovis* and nuclease-free water were used as positive and negative control, respectively. Thereafter, positive samples were then submitted to previously described species-specific PCR assays for detection of *M. wenyonii* and 'Ca. *M. haemobos*' [15]. The amplified products were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel, followed by SYBR safe staining (6 µg/mL; SYBR® Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, CA, USA), and were viewed under UV light.

2.4. Sequencing

Fragments of the 16S rDNA gene from two *M. wenyonii* (862 bp) and two 'Ca. *M. haemobos*' (866 bp) isolates were sequenced using a set of previously described primers [14]. Amplicons were purified from the gel (PureLink®, Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), evaluated by spectrophotometry for concentration and purity (Evolution

60S Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and sequenced from both directions by Sanger method (Sanger, 1977) using 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The nucleotide sequence of the ‘*Ca. M. haemobos*’ and *M. wenyonii* amplified were submitted to the GenBank database (Genbank accession no. KY328834 and KY328836, respectively).

Results

All buffalo’s samples consistently amplified the GAPDH gene. When using the pan-hemoplasma PCR assay, 138/314 (43.95%; 95% CI: 38.57 – 49.48) buffaloes were positive for *Mycoplasma* sp. Among these, 30/138 (21.74%; 95% CI: 15.67 – 29.34) were positive for *M. wenyonii* alone, 8/138 (5.80%; 95% CI: 2.97 – 11.02) for ‘*Ca. M. haemobos*’ alone, and 100/138 (72.46; 95% CI: 64.48 – 79.23) co-infected by both.

Sequencing of 16S rDNA gene from two *M. wenyonii* and two ‘*Ca. M. haemobos*’ isolates analyzed showed $\geq 99\%$ identity to multiple *M. wenyonii* (KX171205.1, AB711156.1, HM538189.1), and ‘*Ca. M. haemobos*’ (EF616468.1, AB740010.1, FN392889.1) genotypes deposited in GenBank.

Discussion

In the present study, *M. wenyonii* and ‘*Ca. M. haemobos*’ were detected in buffaloes from northeastern Brazil. To the authors’ knowledge, this is the first report of a molecular investigation of hemoplasma infection in buffaloes from South America.

Hemoplasma infection in ruminants has been frequently reported. However, to date, only one study have investigated HM in buffaloes, with 8/25 (32%) animals positive for ‘*Ca. M. haemobos*’ in China [10]. Herein, 43.9% buffaloes were positive for *Mycoplasma* sp., with 72.4% co-infected by *M. wenyonii* and ‘*Ca. M. haemobos*’. Unfortunately, neither packed cell

volume nor total plasmatic protein were measured on both studies, and thus, whether hemoplasma infection may cause anemia in buffalo should be further investigated.

In Brazil, previous studies have described ‘*Ca. M. haemobos*’ infecting cattle from Paraná [8] and Rondônia [9] States. Herein, from the total of *Mycoplasma*-infected buffaloes, 94.2% were by *M. wenyonii*. To the best of authors’ knowledge, this is the first report of *M. wenyonii* infection in ruminants from Brazil. However, it is important to note that different from previous studies conducted with cattle from this country, the current study was the first to use *M. wenyonii* species-specific PCR-based assays. Thus, due to the high prevalence rates of ‘*Ca. M. haemobos*’ found in previous studies with cattle [8,9], it is likely that *M. wenyonii* may also infect cattle from Brazil, and this hypothesis should be further evaluated.

Conclusion

A high prevalence of hemoplasmas was found in Buffaloes from Brazil. This was the first report of *M. wenyonii* infection in ruminants from Brazil. Clinical signs of hemoplasmosis in buffaloes remain unknown.

References

- [1] J.B. Messick, Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential., *Vet. Clin. Pathol.* 33 (2004) 2–13. doi:10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x.
- [2] J.A. Smith, M.A. Thrall, J.L. Smith, M.D. Salman, S. V Ching, J.K. Collins, Eperythrozoon wenyonii infection in dairy cattle., *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196 (1990) 1244–1250.
- [3] M. Tagawa, K. Matsumoto, H. Inokuma, Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle in Hokkaido, Japan, *Vet. Microbiol.* 132 (2008) 177–180. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.006.
- [4] H. Neimark, K.E. Johansson, Y. Rikihisa, J.G. Tully, Proposal to transfer some

- members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and ‘*Candidatus Mycopl.*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 (2001) 891–899. doi:10.1099/00207713-51-3-891.
- [5] J.B. Messick, P.G. Walker, W. Raphael, L. Berent, X. Shi, “*Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis*” sp. nov., “*candidatus Mycoplasma haemolamae*” sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): Phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 693–698. doi:10.1099/ijs.0.01861-0.
- [6] Y. Watanabe, M. Fujihara, H. Obara, K. Matsubara, K. Yamauchi, R. Harasawa, Novel *Hemoplasma* Species Detected in Free-Ranging Sika Deer (*Cervus nippon*), *J. Vet. Med. Sci.* 2 (2010) 0–3. doi:10.1292/jvms.10-0229.
- [7] A.L. Grazziotin, A.P. Santos, A.M.S. Guimaraes, A. Mohamed, Z.S. Cubas, M.J. De Oliveira, L.C. Santos, W. De Moraes, R.F. da C. Vieira, L. Donatti, I.R. Barros Filho, A.W. Biondo, J.B. Messick, *Mycoplasma ovis* in captive cervids : Prevalence , molecular characterization and phylogeny, *Vet. Microbiol.* 152 (2011) 415–419. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.001.
- [8] A. Giroto, A.F. Zangirólamo, A.L.G. Bogado, A.S.L. e Souza, G.C.F. da Silva, J.L. Garcia, L.A. Vilas Boas, A.W. Biondo, O. Vidotto, Molecular detection and occurrence of “ *Candidatus Mycoplasma haemobos* ” in dairy cattle of Southern Brazil, *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária.* 21 (2012) 342–344.
- [9] R. Witter, A.L.T. Melo, T. dos A. Pacheco, M. Meneguzzi, R. Vilas Boas, L. Nakazato, C.S. Chitarra, A.C.S. De Oliveira, R.C. Pacheco, Prevalence of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil, *Ciência Rural.* 47 (2017) e20160805. doi:http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160805.
- [10] Q.L. Su, H.Q. Song, R.Q. Lin, Z.G. Yuan, J.F. Yang, G.H. Zhao, W.Y. Huang, X.Q. Zhu, The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China, *Trop. Anim. Heal. Prod.* 42 (2010) 1805–1808. doi:10.1007/s11250-010-9640-0.
- [11] FAO, *Buffalo production and research*, Rome, 2005.
- [12] IBGE, *Estados@, Produção Da Pecuária Munic.* (2015). <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ma&tema=pecuaria2015> (accessed December 12, 2017).
- [13] A.J. Birkenheuer, M.G. Levy, E.B. Breitschwerdt, Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 4172–4177. doi:10.1128/JCM.41.9.4172.
- [14] S.M. Dieckmann, M. Winkler, K. Groebel, M.P. Dieckmann, R. Hofmann-Lehmann, K. Hoelzle, M.M. Wittenbrink, L.E. Hoelzle, Haemotrophic *Mycoplasma* infection in

- horses, *Vet. Microbiol.* 145 (2010) 351–353. doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.009.
- [15] I. Nishizawa, M. Sato, M. Fujihara, S. Sato, R. Harasawa, Differential Detection of Hemotropic Mycoplasma Species in Cattle by Melting Curve Analysis of PCR Products, *J. Vet. Med. Sci.* 72 (2010) 77–79.

6 CONCLUSÃO

Micoplasmas hemotrópicos podem infectar diversas espécies de mamíferos e já foram relatados em muitos países ao redor do mundo. Ainda não são conhecidas cepas cultiváveis ou técnicas que o permitam, dificultando desenvolvimento de técnicas diagnósticas sorológicas e estudos genômicos. E a disparidade entre sensibilidade e especificidade dos testes existentes faz com que técnicas moleculares sejam preferíveis.

O artigo apresentado traz o primeiro relato da hemoplasrose bubalina no continente americano, tal como a identificação de *Mycoplasma wenyonii*, um agente ainda não descrito em ruminantes no Brasil.

Ainda se fazem necessários maiores estudos para apontar diferenças no potencial vetorial de artrópodes, efeitos prejudiciais econômicos e sanitários em bubalinos, fatores associados à infecção, assim como a disseminação destes agentes nos rebanhos.