



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

HUGO LUCA ABATE

**PIROPLASMOSE E HEMOPLASMOSE EM OVINOS
DO NORTE DO PARANÁ**

Londrina - PR
2022

HUGO LUCA ABATE

**PIROPLASMOSE E HEMOPLASMOSE EM OVINOS
DO NORTE DO PARANÁ**

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

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina - PR
2022

Luca Abate, Hugo.
PIROPLASMOSE E HEMOPLASMOSE EM OVINOS DO NORTE DO PARANÁ /
Hugo Luca Abate. - Londrina, 2022.
33 f.

Orientador: João Luis Garcia.

Coorientador: Rafael Felipe da Costa Vieira.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Piroplasmas - Tese. 2. Diagnóstico - Tese. 3. Pequenos Ruminantes - Tese. 4.

Anaplasma

marginale - Tese. I. Luis Garcia, João. II. Felipe da Costa Vieira, Rafael. III.

Universidade

Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. IV. Título

HUGO LUCA ABATE

**PIROPLASMOSE E HEMOPLASMOSE EM OVINOS
DO NORTE DO PARANÁ**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa Vieira
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Richard de Campos Pacheco
Universidade Federal de Mato Grosso

Prof. Dr. Fernando de Souza Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 05 de maio de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Luis Garcia não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela disposição de atender de prontidão sempre que solicitado.

Ao professor Rafael Vieira e todos do Laboratório de Doenças Transmitidas por Vetores da UFPR, estes foram peças essenciais do trabalho.

Aos colegas de laboratório pela companhia, principalmente ao colega Nelson Jessé Rodrigues dos Santos.

A minha namorada Vitória por me aguentar.

E, por fim, aos meus pais, sem eles não estaria aqui.

1 ABATE, Hugo Luca. **PIROPLASMOSE E HEMOPLASMOSE EM OVINOS DO**
2 **NORTE DO PARANÁ.** 2022. Número total de folhas 33. Tese (Doutorado em Ciência
3 Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.
4

6 RESUMO

7
8 As hemoparasitoses ovinas são causadas por vários microrganismos, entre eles estão os
9 micoplasmas hemotrópicos e os piroplasmas. Poucos relatos quanto a presença de
10 micoplasma em ovinos existem no Brasil e no caso dos piroplasmas a sua descrição em
11 ovinos no Brasil é inexistente na literatura. Apesar da presença de uma grande quantidade de
12 animais no rebanho de ovinos brasileiro pouco se sabe sobre a prevalência e transmissão de
13 hemoparasitoses de ovinos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência
14 molecular de hemoparasitas em ovinos oriundos da região Norte do Estado do Paraná, Brasil.
15 Identificar piroplasmas e *Mycoplasma* hemotrópicos em Ovinos do Norte do Paraná. Determinar
16 as espécies de hemoparasitas encontradas nos Ovinos do Norte do Paraná. Foram coletadas
17 347 amostras de sangue por venopunção em ovinos das cidades de Londrina, Cambé, Ibiporã,
18 Apucarana, Sertãozinho, Jaguapitã e Guaraci, todas localizadas no Norte do Paraná, Brasil.
19 Destes animais foram coletados também os carrapatos aderidos aos animais quando presente.
20 Para os piroplasmas o alvo foi o gene ribossomal 18S e para micoplasmas hemotrópicos um
21 fragmento do gene 16S rRNA. Das 347 amostras analisadas 92 (26%) foram positivas, dentre
22 estas positivas duas foram selecionadas para sequenciamento e após análise apresentaram uma
23 semelhança de 99% com isolados de *Mycoplasma ovis*. Para o gene 18S de piroplasmas uma
24 amostra se apresentou positiva, após seu envio para sequenciamento e análise, foi demonstrado
25 uma semelhança de 100% com isolados de *Babesia caballi* previamente depositados no
26 GenBank. Com bases nos resultados se obteve como considerações finais: Uma espécie de
27 *Babesia* próxima a *Babesia caballi* está presente em ovinos no estado do Paraná, Sul do Brasil;
28 Uma espécie de *Mycoplasma* hemotrópico próximo a *Mycoplasma ovis* está presente em ovinos
29 no estado do Paraná, Sul do Brasil; A criação de múltiplas espécies em associação, com ênfase
30 entre as espécies ovina e equina, situação encontrada neste trabalho, demonstra o potencial de
31 infecção por hemoparasitas encontrados em outros hospedeiros na mesma região; Estudos para
32 identificar e quantificar os ectoparasitas e o potencial de transmissão de hemoparasitas para os
33 ovinos são necessários para elucidar aspectos epidemiológicos destas moléstias incidentes na
34 região.
35

36 **Palavras-chave:** Piroplasma. *Mycoplasma*. Diagnóstico. Ovinos.

1 ABATE, Hugo Luca. **PIROPLASMOSIS AND HEMOPLASMOSIS OF OVINE OF**
2 **NORTH PARANÁ STATE.** 2022. Total number of sheets 33. Thesis (Doctorate Degree in
3 Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

6 **ABSTRACT**

7
8 Sheep hemoparasitoses are caused by several microorganisms, including hemotropic
9 mycoplasmas and piroplasms. Few reports on the presence of mycoplasmosis in sheep exist in
10 Brazil and in the case of piroplasm their description in sheep in Brazil is lacking in the
11 literature. Despite the presence of a large number of animals in the Brazilian sheep herd, little
12 is known about the prevalence and transmission of hemoparasitosis in sheep. The present
13 study aimed to evaluate the molecular prevalence of hemoparasites in sheep from the northern
14 region of the State of Paraná, Brazil. To identify hemotropic piroplasmas and Mycoplasmas in
15 sheep from Northern Paraná. To determine the species of hemoparasites found in sheep from
16 Northern Paraná. A total of 347 blood samples were collected by venipuncture in sheep from
17 the cities of Londrina, Cambé, Ibiporã, Apucarana, Sertanópolis, Jaguapitã, and Guaraci, all
18 located in the North of Paraná, Brazil. From these animals, ticks attached to the animals were
19 also collected when present. For piroplasms, the target was the 18S ribosomal gene and for
20 hemotropic mycoplasmas a fragment of the 16S rRNA gene. Of the 347 samples analyzed, 92
21 (26%) were positive, among these positive two were selected for sequencing and after
22 analysis showed a similarity of 99% with *Mycoplasma ovis* isolates. For the 18S gene of
23 piroplasm, a sample was positive, after sending it for sequencing and analysis, a 100%
24 similarity with *Babesia caballi* isolates previously deposited in GenBank was demonstrated.
25 Based on the results, final considerations were obtained: A species of Babesia close to
26 *Babesia caballi* is present in sheep in the state of Paraná, southern Brazil; A hemotropic
27 Mycoplasma species close to *Mycoplasma ovis* is present in sheep in the state of Paraná,
28 southern Brazil; The creation of multiple species in association, with emphasis on the sheep
29 and equine species, a situation found in this work, demonstrates the potential for infection by
30 hemoparasites found in other hosts in the same region; Studies to identify and quantify
31 ectoparasites and the potential for transmission of hemoparasites to sheep are necessary to
32 elucidate epidemiological aspects of these diseases that occur in the region.

33
34 **Key words:** Piroplasm. Diagnoses. Ruminants.Ovine.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 2

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 4

2.1 *Babesia* sp.....4

2.2 Micoplasmas hemotropicos.....5

2.3 Referências.....8

3 OBJETIVOS 12

3.1 OBJETIVO GERAL 12

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO..... 12

4 ARTIGOS

4.1 ARTIGO A – Ocorrência de *Mycoplasma ovis* em ovinos do Norte do Paraná.....13

4.2 ARTIGO B – Primeiro relato de infecção por *Babesia caballi* em ovino.....19

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 24

1. INTRODUÇÃO

A produção animal é uma das principais atividades econômicas brasileira, representando aproximadamente 6,7% do PIB do país. Dentre estas atividades se encontra a ovinocultura, sendo que o estado do Paraná é o oitavo maior produtor de ovinos, com aproximadamente 561.712 cabeças no ano de 2017. O desenvolvimento da produção no país enfrenta alguns problemas com o franco aumento da produção, dentre estes problemas está a sanidade dos animais. Com problemas na sanidade dos animais, sua produção pode sofrer um grande impacto (BRASIL, 2017).

As hemoparasitoses são conhecidas a anos, sendo descritas diversas espécies em diferentes períodos dos séculos XIX e XX. Transmitidas por um vetor artrópode, ganharam espaço nos rebanhos da Europa e países do novo mundo. Sua distribuição aproveita de um nicho ecológico amplo, em que a uma grande quantidade de animais homeotérmicos e vetores artrópodes para se alimentar destes animais, e neste ciclo de alimentação do artrópode os microrganismos são transmitidos e se mantêm circulante. As perdas econômicas causadas por hemoparasitoses são amplas, mesmo que sua maioria são de animais assintomáticos, essas perdas podem ser em quantidade de leite produzido, ganho de peso e alguns outros (GHARBI et al., 2006)

. A distribuição destes hemoparasitas no rebanho nacional é ampla, sendo diversas espécies encontradas em todos os estados do Brasil (UILENBERG, 2006).

O gênero *Babesia* pertence ao grupo dos piroplasmas, protozoários que infectam diversas espécies de animais de produção, sejam eles equinos, ovinos, búfalos e bovinos. Ainda no século 19, um protozoário chamou a atenção de babes, ao examinar o sangue de bovinos e associou isto a hemoglobinúria e deu o nome vulgar de febre do Texas. Posteriormente, também Babes encontrou um protozoário semelhante ao dos bovinos em células sanguíneas de ovelhas (BABES, 1888). Em seguida à essa descoberta o agente causador da febre do Texas em gado dos Estados Unidos foi descoberto e classificado como *Pyrosoma bigeminum*, sendo que, neste caso, foi possível comprovar sua transmissão por carrapato, ressaltando que este foi o primeiro relato de uma doença transmitida por um artrópode (SMITH; KILBORNE, 1893). Nesse mesmo ano o gênero foi reclassificado e a esses protozoários foi dado o nome genérico de *Babesia*, com as espécies *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. ovis* até hoje as espécies que afetam ruminantes no Brasil. Esta taxonomia é válida até os dias atuais e junto com o gênero *Theileria* pertencem à ordem Piroplasmida, conhecidos como piroplasmas (DA SILVA et al., 2013; STARCOVICI, 1893; UILENBERG, 2006).

1 Os hemoplasmas são bactérias pleomórficas, sem parede celular e Gram negativas. São
2 encontradas em hemácias de mamíferos aderidas a parede externa do eritrócito. Essa bactéria é
3 causadora da hemoplasmose e conhecida como micoplasma hemotrópico (MESSICK, 2004).

4 Hemoplasmas possuem distribuição mundial, possuem relatos na literatura de sua
5 presença em todos os continentes, isso se deve as suas relações de parasitismo bem definido e
6 por sua forma de disseminação ser feita por vetores hematófagos como carrapatos, moscas,
7 mosquitos e pulgas (MACIEIRA et al., 2008; MESSICK, 2004). Micoplasmas hemotrópicos
8 foram descritos em diversas espécies domésticas e silvestres e até humanos, entretanto as
9 informações sobre o microrganismo em ovinos no Brasil ainda é escasso, sendo assim sua
10 importância no papel sanitário do rebanho ovino ainda necessita de mais informação (BIONDO
11 et al., 2009; DE MORAIS et al., 2007b; DOS SANTOS et al., 2008; VIEIRA et al., 2015).

12
13
14
15
16

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Babesia*

Os hemoparasitas do gênero *Babesia* pertencem ao filo Apicomplexa, Ordem Piroplasmida, família Babesiidae, com invasão exclusiva de eritrócitos, diferente de *Theileria* que infecta inicialmente linfócitos e monócitos. Todas as espécies de *Babesia* são transmitidas pela picada de carrapatos. *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* que parasitam bovinos no Brasil, são transmitidas pelo *Rhipicephalus microplus*. Durante a picada do carrapato, os esporozoítos são injetados no hospedeiro e infectam diretamente os eritrócitos. Este fenômeno diferencia *Babesia* spp. de *Theileria* spp., onde os esporozoítos não infectam inicialmente os glóbulos vermelhos, mas sim penetram antes em linfócitos ou monócitos aonde passam por uma esquizogonia (UILENBERG, 2006).

No hospedeiro, os esporozoítos se desenvolvem em merozoítos dentro do eritrócito infectado resultando em duas ou às vezes quatro células filhas que deixam a célula hospedeira para infectar outros eritrócitos até o hospedeiro morrer ou desenvolver imunidade e controlar a infecção. O baço com seu filtro linfo-reticular tem a função essencial de promover a resistência às infecções primárias de *Babesia* spp., removendo especificamente células infectadas da circulação, provavelmente através de uma combinação de microcirculação e atividade de células fagocíticas imunocompetentes (BOCK et al., 2004).

Os sinais clínicos de babesiose estão relacionados à lise de eritrócitos no desenvolvimento do protozoário. A sintomatologia clínica da doença é ampla e pouco específica (febre, anemia, icterícia e hemoglobinúria), tendo assim que associar presença do vetor e área endêmica (HUNFELD; HILDEBRANDT; GRAY, 2008).

O diagnóstico da doença pode ser realizado através do esfregaço sanguíneo corado com Giemsa, em que pode ser observada a presença do protozoário infectando eritrócitos, sempre mais recomendado a utilização de sangue periférico pela praticidade na execução, mas quando a doença se encontra em fase latente o resultado pode ser um falso negativo devido à baixa parasitemia (BRÜNING, 1996)

. Também podem ser utilizados para diagnóstico os testes sorológicos indiretos como ELISA e Imunofluorescência, estes não são recomendados para diagnóstico clínico e mais utilizados em estudos epidemiológicos. O teste padrão ouro, mais sensível e específico seria a PCR e como principal alvo o gene ribossomal 18S, com ele é possível diferenciar com mais certeza espécie e um diagnóstico mais precoce (BOCK et al., 2004).

1 Quanto à epidemiologia da doença no Brasil em ruminantes, somente o grupo de
2 bovinos e bubalinos possuem relato em literatura, sendo assim dados quanto sua epidemiologia
3 em ovinos é inexistente. A maior parte do território do Brasil é endêmica para o parasita em
4 bovinos com prevalência variando de 10-90%, estes valores sofrem influência da região
5 geográfica e quanto ao teste utilizado no estudo. Estudos com utilização de esfregaços
6 sanguíneos tendem a ter mais animais falsos negativos em relação a outros testes mais sensíveis
7 como ELISA ou PCR (BILHASSI et al., 2014; GIGLIOTI et al., 2016; RUCKSAKEN et al.,
8 2019). Sua distribuição em bubalinos é negligenciada, com poucos estudos realizados. Existem
9 somente quatro estudos relacionando *Babesia* em búfalos no país, e dentre estes estudos, a
10 prevalência varia de 1-19%, valores menores em comparação a situação endêmica do rebanho
11 bovino (DA SILVA et al., 2013; NÉO et al., 2016; SILVA et al., 2013; SILVEIRA et al., 2016).

12 Já os piroplasmas causadores de babesiose em equinos são mais frequentes na literatura
13 em equinos, asininos e muares estão presentes es diversos estudos realizados no Brasil, com a
14 ocorrência variando de níveis baixíssimos a altas taxas de infecção (DE WAAL, 1992; SCOLES
15 et al., 2011; UETI et al., 2005; VIEIRA et al., 2013).

16 17 2.2. Micoplasmas hemotropicos

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

32 Vários artrópodes hematófagos já foram descritos como transmissores. Em pesquisa
33 experimental já foi comprovada a transmissão de *M. haemofelis* e '*Ca M haemominutum* por
34 pulgas da espécie *Ctenocephalides felis* para gatos domésticos (WOODS et al., 2005). Piolhos

1 da espécie *Polyplax serrata* foram evidenciados capazes de transmitir *Eperythrozoon*
2 *coccoides*, para roedores de laboratório também sob condições experimentais, o mesmo
3 trabalho não identificou possibilidade de transmissão do agente para os roedores por ácaros das
4 espécies *Myocoptes musculus*, *Myobia musculi* e *Radfordia affinis* (BERKENKAMP;
5 WESCOTT, 1988). Mosquitos *Aedes aegypti* e moscas *Stomoxys calcitrans* são capazes de
6 transmitir mecanicamente o agente *Eperythrozoon suis* para suínos (PRULLAGE; WILLIAMS;
7 GAAFAR, 1993) e carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* são considerados os principais vetores
8 de *M. haemocanis* para cães domésticos (SENEVIRATNA; WEERASINGHE; ARIYADASA,
9 1973).

10 O diagnóstico da hemoplasmosose baseado na microscopia ótica de esfregaço sanguíneo
11 e pouco confiável, pois depende do grau de parasitemia e da capacidade de distinção visual do
12 técnico responsável pelo exame, que fica sujeito a interpretações errôneas quando existem
13 resíduos de corantes e/ou alterações morfológicas das hemácias, como Howell Jolly Para
14 minimizar potenciais falhas, técnicas moleculares vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas. A
15 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi inicialmente descrita para o diagnóstico de
16 hemoplasmosose em bovídeos para o agente *Eperythrocoon wemoni* (VANDERVOORT et al.,
17 2001). Posteriormente foram descritos primers genéricos capazes de amplificar o gene
18 ribossomal 16S rRNA, um segmento conservado ao grupo dos micoplasmas hemotrópicos,
19 assim proporcionando aplicabilidade para diagnóstico em todos os já confirmados e possíveis
20 hospedeiros (DIECKMANN et al., 2010).

21 Micoplasmas hemotrópicos já foram descritos, através de técnicas moleculares,
22 parasitando espécies de mamíferos em todo mundo (BIONDO et al., 2009; MESSICK, 2004)
23 Em felinos, *M. haemofelis*, 'Candidatus *M. haemominutum*', e 'Candidatus *M. turicensis*' já
24 foram relatados em gatos domésticos anêmicos (DOS SANTOS et al., 2014) e não anêmicos
25 (DE MORAIS et al., 2007a; MICELI et al., 2013) e em doze espécies de felídeos silvestres da
26 África, América do Sul e Europa (WILLI et al., 2007). Em cães expostos aos vetores à
27 carrapatos, *M. haemocanis* e 'Candidatus *M. haematoparvum*' já foram evidenciados (VIEIRA
28 et al., 2015). Suínos podem ser acometidos por *M. parvum* (DOS SANTOS et al., 2014) e *M.*
29 *suis* (HOELZLE et al., 2014), inclusive, este último, capaz de invadir os eritrócitos (GROEBEL
30 et al., 2009). Em cavalos, *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' foram
31 encontrados, contrariando a ideia inicial de espécie-especificidade (DIECKMANN et al.,
32 2010). Nos pequenos ruminantes, um estudo realizado no Norte do Paraná utilizando a técnica
33 de PCR encontrou sete animais positivos para *Mycoplasma ovis* dentre os quarenta e dois
34 animais coletados no estudo (MONGRUEL et al., 2020). Um segundo estudo realizado no Rio

1 Grande do Sul encontrou vinte e seis animais positivos na PCR para *M. ovis* dentre os trinta e
2 três animais coletados, somente estes dois relatos na literatura demonstram a presença de
3 Micoplasmas hemotrópicos no rebanho ovino brasileiro(SOUZA et al., 2019). Outras espécies
4 também possuem achados na literatura quanto a presença da *M. ovis* através de técnicas
5 moleculares foram encontrados animais positivos para o agente tambémem cervídeos silvestres
6 de Foz do Iguaçu e caprinos da Paraíba (GRAZZIOTIN et al., 2011a; GRAZZIOTIN et al.,
7 2011b; MACHADO et al., 2017). Camelídeos também podem ser infectados por '*Candidatus*
8 *Mycoplasma haemobos*', como comprovado em estudo que investigou a morte e adoecimento
9 de alpacas de cativeiro na Suíça (MELI et al., 2010).

10 Os Micoplasmas hemotrópicos possuem um potencial de infecção em humanos, diversos
11 relatos demonstram a presença da bactéria causando doença em pacientes com relatos de
12 anemia, dois deles causado por *Mycoplasma ovis*. O primeiro relato de *M. ovis* infectando
13 humanos foi detectado em veterinário residente do Texas que possuía um quadro de anemia
14 sem diagnostico definido, o profissional também havia estado na África onde realizava
15 necropsias a campo de animais silvestres. Uma PCR com alvo para o 16S rRNA foi realizada e
16 a amostra de sangue coletado dele se mostrou positiva. O segundo relato na literatura foi um
17 estudo de coortes dividido entre grupos de pacientes com contato extensivo com artrópodes e
18 sem contato extensivo com artrópodes e em ambos os grupos as amostras coletadas destes
19 grupos foram positivas para o 16S rRNA de Micoplasmas hemotrópicos e agrupados junto a
20 *Mycoplasma ovis* (MAGGI et al., 2013; SYKES et al., 2010).

21 Outros relatos com relação a infecção por Micoplasmas hemotrópicos relacionados a
22 outras especies de *Mycoplasma* também estão presentes na literatura, demonstrando DNA
23 presente em amostras de humanos das especies '*Candidatus*' *Mycoplasma haemohominis*,
24 *Mycoplasma suis* e *Mycoplasma haemocanis* (DOS SANTOS et al., 2008; HATTORI et al.,
25 2020; YUAN et al., 2009).

26
27
28
29
30
31
32

2.4. Referências

- BABES, V. BabesSur l'hémoglobinuria bacterienne des boeufs. **C.R. Acad. Sci.**, p. 107, 1888.
- 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.
- BILHASSI, T. B. et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 234–238, abr. 2014.
- BIONDO, A. W. et al. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 1–7, 2009.
- BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129 Suppl, n. 5, p. S247–S269, 2004.
- BRASIL. **Vigilância Veterinária**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/vigilancia-veterinaria.pdf/view>>.
- BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 2, p. 139–151, 1 mar. 1996.
- DA SILVA, J. B. et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the north region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 678–681, 2013.
- DE MORAIS, H. A. et al. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in three cats from Brazil. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 9, n. 6, p. 518–520, dez. 2007a.
- DE MORAIS, H. A. et al. Co-infection with *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in three cats from Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, n. 6, p. 518–520, 11 dez. 2007b.
- DE WAAL, D. T. Equine piroplasmiasis: A review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1, p. 6–14, 1 jan. 1992.
- DIECKMANN, S. M. et al. Haemotrophic Mycoplasma infection in horses. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3–4, p. 351–353, 26 out. 2010.
- DOS SANTOS, A. P. et al. Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1922, dez. 2008.
- DOS SANTOS, A. P. et al. Hemoplasma prevalence and hematological abnormalities associated with infection in three different cat populations from Southern Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 23, n. 4, p. 428–434, 1 out. 2014.
- GHARBI, M. et al. Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3–4, p. 231–241, 14 fev. 2006.
- GIGLIOTI, R. et al. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 657–662, jul. 2016.
- GRAZZIOTIN, A. L. et al. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in

- 1 selected free-ranging Brazilian deer populations. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 4, p.
2 1005–1011, 2011a.
- 3 GRAZZIOTIN, A. L. et al. *Mycoplasma ovis* in captive cervids: Prevalence, molecular
4 characterization and phylogeny. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 415–419, 28 set.
5 2011b.
- 6 GROEBEL, K. et al. *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. **Infection and Immunity**,
7 v. 77, n. 2, p. 576–584, fev. 2009.
- 8 HATTORI, N. et al. '*Candidatus*' mycoplasma haemohominis in human, Japan. **Emerging**
9 **Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 11–19, 2020.
- 10 HOELZLE, L. E. et al. Pathobiology of *Mycoplasma suis*. **Veterinary journal (London,**
11 **England : 1997)**, v. 202, n. 1, p. 20–25, 1 out. 2014.
- 12 HUNFELD, K.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J. Babesiosis: Recent insights into an ancient
13 disease. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1219–1237, set. 2008.
- 14 MACHADO, C. A. L. et al. *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern Brazil.
15 **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 55, n. July, p. 1–5,
16 2017.
- 17 MACIEIRA, D. B. et al. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally
18 infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro--
19 Brazil. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 10, n. 2, p. 120–129, abr. 2008.
- 20 MAGGI, R. G. et al. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without
21 extensive arthropod or animal contact. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3237–
22 3241, 2013.
- 23 MELI, M. L. et al. Development and application of a real-time TaqMan® qPCR assay for
24 detection and quantification of '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*' in South American
25 camelids. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 3–4, p. 290–294, 15 dez. 2010.
- 26 MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into
27 pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2–13, 1 mar. 2004.
- 28 MICELI, N. G. et al. Detecção molecular de patógenos transmitidos por artrópodes em gatos
29 de Cuiabá, estado do Mato Grosso, Centro-oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia**
30 **Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 385–390, 2013.
- 31 MONGRUEL, A. C. B. et al. Survey of vector-borne and nematode parasites involved in the
32 etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. **Revista Brasileira de**
33 **Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 1–12, 2020.
- 34 NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and
35 *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of "*Candidatus Mycoplasma*
36 *haemofelis*", "*Candidatus Mycoplasma haemomuris*", "*Candidatus Mycoplasma haemosuis*"
37 and "*Candidatus Mycoplasma wenyonii*". **International journal of systematic and**
38 **evolutionary microbiology**, v. 51, n. Pt 3, p. 891–899, 2001.
- 39 NÉO, T. A. et al. Detection of *Babesia bovis* and *B. bigemina* in Water buffaloes (*Bubalus*
40 *bubalis*) in endemic areas of São Paulo State, Brazil. **Open Journal of Veterinary Medicine**,
41 v. 6, n. May, p. 75–84, 2016.
- 42 PRULLAGE, J. B.; WILLIAMS, R. E.; GAAFAR, S. M. On the transmissibility of

- 1 *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. **Veterinary parasitology**, v. 50,
2 n. 1–2, p. 125–135, 1993.
- 3 RUCKSAKEN, R. et al. Comparison of conventional polymerase chain reaction and routine
4 blood smear for the detection of *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis*, and
5 *Anaplasma platys* in Buriram Province, Thailand. **Veterinary World**, v. 12, n. 5, p. 700–705,
6 2019.
- 7 SCOLES, G. A. et al. Equine Piroplasmosis Associated with *Amblyomma cajennense* Ticks,
8 Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1903, 2011.
- 9 SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE; ARIYADASA, S. Transmission of *Haemobartonella*
10 *canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in veterinary science**, v. 14, n. 1,
11 p. 112–114, 1973.
- 12 SILVA, J. B. et al. Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*
13 em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33,
14 n. 7, p. 847–850, 2013.
- 15 SILVEIRA, J. A. G. et al. Molecular assays reveal the presence of *Theileria* spp. and *Babesia*
16 spp. in Asian water buffaloes (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Amazon region of
17 Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1017–1023, 2016.
- 18 SYKES, J. E. et al. Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic
19 mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48,
20 n. 10, p. 3782–3785, 2010.
- 21 SMITH, T.; KILBORNE, F. L. **Investigations into the nature, causation, and prevention of**
22 **Texas or southern cattle fever, 8th and 9th Repts.** [s.l.] U.S. Dept. Agric., 1893.
- 23 STARCOVICI, C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die
24 durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Haemoglobinurie des Rindes
25 (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). **Zbl. Bakt**, v. 14,
26 p. 1–8, 1893.
- 27 UETI, M. W. et al. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit
28 *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia.
29 **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3755–3759, ago. 2005.
- 30 UILENBERG, G. Babesia-A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1–2, p.
31 3–10, 2006.
- 32 VIEIRA, T. S. W. J. et al. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in
33 horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. **Ticks and Tick-**
34 **borne Diseases**, v. 4, n. 6, p. 537–541, 1 dez. 2013.
- 35 VIEIRA, R. F. C. et al. MOLECULAR INVESTIGATION OF HEMOTROPIC
36 MYCOPLASMAS IN HUMAN BEINGS, DOGS AND HORSES IN A RURAL
37 SETTLEMENT IN SOUTHERN BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de**
38 **São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 353–357, 1 jul. 2015.
- 39 WILLI, B. et al. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species.
40 **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1159–1166, abr. 2007.
- 41 WOODS, J. E. et al. Evaluation of experimental transmission of 'Candidatus' *Mycoplasma*
42 *haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American**

- 1 **journal of veterinary research**, v. 66, n. 6, p. 1008–1012, jun. 2005.
- 2 YUAN, C. L. et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine
- 3 and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, v.
- 4 70, n. 7, p. 890–894, 1 jul. 2009.
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35

1 **3. OBJETIVOS**

2

3 **3.1 OBJETIVO GERAL**

4 Avaliar a ocorrência molecular de hemoparasitas em ovinos oriundos da região Norte do
5 Estado do Paraná, Brasil.

6

7 **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

8 - Identificar piroplasmas e *Mycoplasma* hemotropicos em Ovinos do Norte do Paraná.

9 - Determinar as espécies de hemoparasitas encontradas nos Ovinos do Norte do Paraná.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 4.1 ARTIGO A

2 Prevalência de *Mycoplasma ovis* em ovinos do Norte do Paraná

3

4 **Resumo**

5 Micoplasmas hemotrópicos são causadores de micoplasmose em diversas espécies de
6 mamíferos domésticos ou silvestres, em ovinos os causadores da doença são *Mycoplasma ovis*
7 e ‘*Candidatus Mycoplasma haemovis*’ e sua transmissão ocorre principalmente através de
8 vetores hematófagos. O estudo teve como objetivo a detecção e caracterização de hemoplasmas
9 de ovinos oriundos da região norte do Paraná. As amostras de sangue foram coletadas com
10 EDTA e posteriormente submetidas a extração de DNA, e posteriormente a PCR foi realizada
11 baseada no gene 16S rRNA. A ocorrência determinada foi de 26,5% (92/347) animais
12 positivos. Duas amostras positivas foram escolhidas aleatoriamente e enviadas ao
13 sequenciamento, demonstrando uma identidade 99% com isolados de *Mycoplasma ovis*. Pode
14 se observar a presença do hemoplasma no rebanho ovino da região e o estudo abre portas para
15 novos estudos quanto a situação epidemiológica no rebanho nacional.

16 **Palavras-Chave:** Hemoplasmas, carrapatos, PCR.

17

18 **Introdução**

19 Dentre as atividades econômicas mais importantes do PIB brasileiro se encontra a
20 produção animal, e nesta a criação de ovinos. O estado do Paraná possui mais de meio milhão
21 de ovinos em seu rebanho. Um dos principais fatores de perda econômica na produção de
22 pequenos ruminantes é a anemia, causada principalmente por helmintose ou por doenças
23 transmitidas por vetores (BRASIL, 2000, 2013, 2017).

24 Uma das principais doenças transmitidas por vetores em ovinos é a hemoplasmose,
25 causada pelos *Mycoplasma ovis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemovis*’, causando casos
26 graves de anemia em ovinos (MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018; SUZUKI et al., 2011;
27 TAGAWA et al., 2012). Ambos são bactérias pleomórficas, sem parede celular, gram negativas
28 e pertencentes a classe dos Mollicutes (NEIMARK et al., 2001).

29 Pouco se sabe quanto ao potencial zoonótico dos Micoplasmas hemotrópicos, mas a
30 presença de *Mycoplasma haemofelis* já foi descrita em humanos, também foi descrito um caso
31 em que um veterinário possuía uma infecção por três diferentes microrganismos transmitidos
32 por vetores e dentre estes *Mycoplasma ovis*, causando um quadro de dormência de membros e
33 se desenvolveu em febre, náuseas e posteriormente sinais neurológicos (SYKES et al., 2010).

1 Outro relato existente em literatura apresenta DNA de *M. ovis* presente em amostras de
2 sangue coletadas em um estudo de coortes dividido entre populações com contato extensivo
3 com artrópodes e outra sem contato extensivo com artrópodes, e ambas possuíam amostras
4 positivas para *Mycoplasma ovis* (MAGGI et al., 2013).

5 Apesar de sua ampla distribuição em todos os continentes (AKTAS; OZUBEK, 2017;
6 BYAMUKAMA et al., 2020; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; RJEIBI et al., 2015;
7 TAGAWA et al., 2012; URIE et al., 2019) com exceção da Oceania, os dados quanto a sua
8 presença no Brasil são escassos, porém, podem variar de 16% a 78% em diferentes espécies
9 animais. Devido a essa escassez de informação sobre *Mycoplasma ovis* o estudo teve como
10 objetivo detectar e caracterizar molecularmente os hemoplasmas de ovinos da região Norte do
11 Paraná (GRAZZIOTIN et al., 2011a, 2011b; MACHADO et al., 2017; MONGRUEL et al.,
12 2020; SOUZA et al., 2019).

13 14 **Material e Métodos**

15 O estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da
16 Universidade Estadual de Londrina (protocolo 182/2015).

17 A população estudada era composta por ovinos de raças variadas, ambos os sexos e
18 diferentes faixas etárias. O cálculo amostral foi realizado pelo OpenEpi versão 3.01,
19 considerando uma população total ovina na região norte do Paraná composta pelas cidades de
20 Londrina, Cambé, Ibiporã, Guaraci, Jaguapitã, Apucarana e Sertãoópolis com um total de
21 18.696 ovinos (IPARDES, 2015), uma prevalência de 16,6% (MONGRUEL et al., 2020), com
22 nível de confiança de 99% e eficácia de 5%, o qual revelou um tamanho amostral de 344
23 animais. As amostras de sangue total foram coletadas com EDTA por venopunção de ovinos
24 de sete municípios localizados no norte do estado do Paraná, Brasil durante o período de
25 Novembro de 2016 a Fevereiro de 2017.

26 Destes mesmos animais foram coletados carrapatos quando presente, utilizando um
27 gancho de remoção (O'TOM Tick Twister®, Lavancia, França), após remoção os exemplares
28 estes foram colocados em etanol absoluto para identificação morfológica posterior utilizando
29 chave de identificação previamente relata em literatura (BARROS-BATTESTI; ARZUA;
30 BECHARA, 2006).

31 Foi realizado a extração de DNA das amostras de sangue total dos ovinos utilizando um
32 kit comercial (Biopur® Mini Spin Plus, Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brasil), de acordo
33 com as recomendações do fabricante. Para controle negativo da extração foi utilizada água
34 ultrapura. Para atestar a efetividade da extração foi realizado um PCR utilizando como alvo o

1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) gene endógeno dos mamíferos utilizando
2 um protocolo previamente descrito na literatura (BIRKENHEUER; LEVY;
3 BREITSCHWERDT, 2003). Posteriormente para avaliação da presença de hemoplasmas
4 através da técnica de PCR como descrita em estudo prévio, utilizando como alvo o 16S rRNA
5 de Micoplasmas hemotropicos (HOELZLE et al., 2011; MACHADO et al., 2017).

6 Duas amostras positivas foram selecionadas e o produto da PCR foram selecionados pra
7 sequenciamento utilizando o método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977)
8 utilizando 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A sequência
9 parcial do gene 16S rDNA obtida foi comparada com sequencias depositadas na data base do
10 GenBank utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (ALTSCHUL et al.,
11 1990).

14 **Resultados e Discussões**

15 Dentre as 347 amostras coletadas 92 foram positivas na PCR para hemoplasmas,
16 totalizando assim 26,5% de ovinos positivos para o microrganismo. Duas amostras foram
17 selecionadas para sequenciamento e ambas apresentaram $\geq 99\%$ de identidade com múltiplos
18 isolados de *Mycoplasma ovis* depositados no GenBank (MH615809.1; KF313922.1;
19 JF931135.1; EU828582.1; EU165511.1). Exemplares de *Rhipicephalus microplus* e
20 *Amblyomma sculptum* foram encontrados parasitando os ovinos do estudo.

21 As doenças transmitidas por vetores são historicamente negligenciadas no Brasil apesar
22 de alguns estudos prévios demonstrarem a presença de microrganismos causadores de
23 hemoplasmose no país. Estudos anteriores encontraram uma prevalência de *Mycoplasma ovis*
24 em ovinos 16,6-78,8% (MONGRUEL et al., 2020; SOUZA et al., 2019), em caprinos 39.9%
25 (MACHADO et al., 2017) e em cervídeos 40-87% (GRAZZIOTIN et al., 2011a, 2011b).
26 Apesar destes estudos demonstrando a presença do *Mycoplasma* hemotropico causador de
27 anemia, no rebanho ovino do país, os problemas relacionados a anemia normalmente são
28 associados a helmintos gastrointestinais (ADOGWA et al., 2005; DI LORIA et al., 2009;
29 KAPLAN et al., 2004).

30 Alguns fatores podem ser utilizados para explicar essa divergência de valores entre os
31 estudos que detectaram a presença de hemoplasma no rebanho ovino do Brasil como sanidade
32 do rebanho, manejo dos animais e condições climáticas. Dentre estas, as condições climáticas
33 desempenham um papel crucial no desenvolvimento de vetores hematofagos, estes se
34 desenvolvendo em épocas de maior umidade (OOREBEEK; KLEINDORFER, 2008) e

1 responsáveis pela transmissão de *Mycoplasmas* hemotrópicos (BERKENKAMP; WESCOTT,
2 1988; SENEVIRATNA; WEERASINGHE; ARIYADASA, 1973; WOODS et al., 2005).

4 **Conclusão**

5 Os resultados reforçam a presença de *Mycoplasma ovis* no rebanho ovino nacional, abre
6 caminho para novos estudos que poderiam determinar qual é a realidade epidemiológica quanto
7 deste hemoplasma e seu papel na sanidade destes animais.

9 **Referencias**

10 ADOGWA, A. et al. The effect of gastrointestinal parasitism on blood copper and hemoglobin
11 levels in sheep. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 11, p. 1017, nov. 2005.

12 AKTAS, M.; OZUBEK, S. A molecular survey of small ruminant hemotropic mycoplasmosis
13 in Turkey, including first laboratory confirmed clinical cases caused by *Mycoplasma ovis*.
14 **Veterinary Microbiology**, v. 208, n. July, p. 217–222, 2017.

15 BERKENKAMP, S. D.; WESCOTT, R. B. Arthropod transmission of *Eperythrozoon*
16 *coccoides* in mice. **Laboratory animal science**, v. 38, n. 4, p. 398–401, ago. 1988.

17 BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and
18 evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian
19 genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.
20 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.

21 BRASIL. **Cadernos de Informações de Saúde Paraná**. [s.l: s.n.]. 2017. Disponível em:
22 <<http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/cadernos/pr.htm>>.

23 BRASIL. Parasitas causam prejuízo de 18 bilhões por ano a pecuária brasileira. **Embrapa**, p.
24 1, 16 abr. 2013.

25 BRASIL. **Vigilância Veterinária**. 2017. Disponível em:
26 <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/vigilancia-veterinaria.pdf/view)
27 [das-publicacoes-de-saude-animal/vigilancia-veterinaria.pdf/view](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/vigilancia-veterinaria.pdf/view)>.

28 BYAMUKAMA, B. et al. First molecular detection and characterization of hemotropic
29 mycoplasma species in cattle and goats from Uganda. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1–10, 2020.

30 DI LORIA, A. et al. Evaluation of the FAMACHA system for detecting the severity of anaemia
31 in sheep from southern Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1–2, p. 53–59, 6 abr. 2009.

32 GRAZZIOTIN, A. L. et al. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in
33 selected free-ranging Brazilian deer populations. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 4, p.

- 1 1005–1011, 2011a.
- 2 GRAZZIOTIN, A. L. et al. *Mycoplasma ovis* in captive cervids: Prevalence, molecular
3 characterization and phylogeny. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3–4, p. 415–419, 28 set.
4 2011b.
- 5 HOELZLE, K. et al. Detection of '*Candidatus*' *Mycoplasma haemobos* in cattle with anaemia.
6 **Veterinary Journal**, 2011.
- 7 KAPLAN, R. M. et al. Validation of the FAMACHA© eye color chart for detecting clinical
8 anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v.
9 123, n. 1–2, p. 105–120, 13 ago. 2004.
- 10 MACHADO, C. A. L. et al. *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern Brazil.
11 **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 55, n. July, p. 1–5,
12 2017.
- 13 MAGGI, R. G. et al. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without
14 extensive arthropod or animal contact. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 10, p. 3237–
15 3241, 2013.
- 16 MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. M. et al. Molecular detection of *Mycoplasma ovis* in an
17 outbreak of hemolytic anemia in sheep from Veracruz, Mexico. **Tropical Animal Health and**
18 **Production**, v. 51, n. 1, p. 243–248, 2019.
- 19 MONGRUEL, A. C. B. et al. Survey of vector-borne and nematode parasites involved in the
20 etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. **Revista Brasileira de**
21 **Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 3, p. 1–12, 2020.
- 22 NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and
23 *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus*' *Mycoplasma*
24 *haemofelis*, '*Candidatus*' *Mycoplasma haemomuris*, '*Candidatus*' *Mycoplasma haemosuis* and
25 '*Candidatus*' *Mycoplasma wenyonii*. **International journal of systematic and evolutionary**
26 **microbiology**, v. 51, n. Pt 3, p. 891–899, 2001.
- 27 OOREBEEK, M.; KLEINDORFER, S. Climate or host availability: what determines the
28 seasonal abundance of ticks? **Parasitology research**, v. 103, n. 4, p. 871–875, set. 2008.
- 29 OZUBEK, S.; AKTAS, M. Genetic diversity and prevalence of piroplasm species in equids
30 from Turkey. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 59, p.
31 47–51, 1 ago. 2018.
- 32 RJEIBI, M. R. et al. First molecular isolation of *Mycoplasma ovis* from small ruminants in
33 North Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 82, n. 1, p. 1–5, 2015.

- 1 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating
2 inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467,
3 1977.
- 4 SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE; ARIYADASA, S. Transmission of *Haemobartonella*
5 *canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in veterinary science**, v. 14, n. 1,
6 p. 112–114, 1973.
- 7 SOUZA, U. A. et al. First molecular detection of *Mycoplasma ovis* (Hemotropic mycoplasmas)
8 from sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 28, n. 3, p. 360–366,
9 2019.
- 10 SUZUKI, J. et al. Molecular Identification of 'Candidatus' *Mycoplasma haemovis* in Sheep
11 with Hemolytic Anemia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, n. 8, p. 1104200493–
12 1104200493, 2011.
- 13 SYKES, J. E. et al. Human Coinfection with *Bartonella henselae* and Two Hemotropic
14 *Mycoplasma* Variants Resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48,
15 n. 10, p. 3782–3785, out. 2010.
- 16 TAGAWA, M. et al. A clinical case of severe anemia in a sheep coinfecting with *Mycoplasma*
17 *ovis* and 'Candidatus' *Mycoplasma haemovis* in Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary**
18 **Medical Science**, v. 74, n. 1, p. 99–102, 2012.
- 19 URIE, N. J. et al. *Mycoplasma ovis* infection in domestic sheep (*Ovis aries*) in the United States:
20 Prevalence, distribution, associated risk factors, and associated outcomes. **Preventive**
21 **Veterinary Medicine**, v. 171, n. May, p. 104750, 2019.
- 22 WOODS, J. E. et al. Evaluation of experimental transmission of 'Candidatus' *Mycoplasma*
23 *haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American**
24 **journal of veterinary research**, v. 66, n. 6, p. 1008–1012, jun. 2005.
- 25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 4.2 ARTIGO B

2 Primeiro relato de infecção por *Babesia caballi* em ovino

3

4 **Resumo**

5 Os piroplasmas de equinos têm uma importância enorme na sanidade animal. Ambos os agentes
6 da piroplasmose equina estão amplamente distribuídos no Brasil, causando impacto econômico
7 indesejado na produção animal. O objetivo deste estudo foi investigar utilizando técnicas
8 moleculares a presença de piroplasmas em ovinos do norte do estado Paraná, Brasil. Foram
9 coletados 347 aniais de sete cidades distantes do norte do estado e realizada a PCR como alvo o
10 18S rRNA de piroplasmas e as amostras positivas enviadas para sequenciamento genético. Um
11 entre os 347 (0.28%) dos ovinos foi positivo para piroplasma. O sequenciamento do fragmento
12 obtido do gene 18S rDNA (454 pb) demonstrou uma similaridade com *Babesia caballi*. Baseado
13 em achados prévios da literatura e os resultados do estudo, pode se concluir que a convivência
14 entre os ovinos e equinos quando existe uma situação em que o vetor e o piroplasma responsável
15 pela infecção em cada respectiva espécie estiver presente, uma possível transmissão acidental
16 entre os piroplasmas pode ocorrer. Futuros estudos são necessários quanto a relação do
17 piroplasma equino e ovinos.

18 **Palavras-Chave:** Piroplasmas, ovelha, carrapatos, PCR.

19

20 **Introdução**

21 A piroplasmose equina é uma doença transmitida por carrapatos causada pelos
22 protozoários *Theileria equi* e *Babesia caballi*. Os piroplasmas causadores da doença afetam os
23 equídeos de maneira severa, apresentando sinais clínicos relacionados a hemólise intravascular
24 e associada a doença sistêmica. Apesar de ambos serem piroplasmas *T. equi* e *B. caballi*
25 apresentam diferenças em relação a severidade da doença, ciclo de vida, dinâmica da infecção
26 e susceptibilidade a medicamentos (CHAUVIN et al., 2009; DE WAAL, 1992; RISTIC, 2018).

27 A doença pode causar diversos de sinais clínicos nos equinos, relacionados
28 principalmente a anemia e hemólise causada pelos microrganismos. As principais
29 manifestações clínicas são febre, letargia, anorexia, perda de peso e petéquias. Os sinais clínicos
30 podem variar com fatores como região endêmica ou não endêmica e manifestação aguda ou
31 crônica da doença (CHAUVIN et al., 2009; RISTIC, 2018).

32 A doença é transmitida através da picada do carrapato, as espécies de maior importância
33 na transmissão destes piroplasmas no Brasil são *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*.

1 Alguns países são considerados não endêmicos ou livres da doença, o Brasil apresenta diversos
2 relatos da presença dos microrganismos em trabalhos utilizando sorologia e técnicas
3 moleculares relacionados a piroplasmas de equinos e ruminantes, mas não possui dados quanto
4 a presença destes em pequenos ruminantes (SCOLES et al., 2011; UETI et al., 2005; VIEIRA
5 et al., 2013).

6 Devido a esta falta de dados relacionados a piroplasmas no Brasil, o estudo teve como
7 objetivo a detecção e caracterização molecular de piroplasmas de ovinos do Norte do Paraná.

9 **Material e Métodos**

10 Um total de 347 amostras de sangue total ovinos e seus carrapatos quando presente
11 foram coletados durante o período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017, em sete cidades
12 localizadas no norte do estado do Paraná, sendo estas Londrina, Cambé, Ibiporã, Guaraci,
13 Jaguapitã, Apucarana e Sertanópolis. Estas amostras foram testadas usando a técnica de PCR
14 convencional e usando como alvo o gene 18S rDNA dos piroplasmas utilizando técnica
15 previamente descrita (ALMEIDA et al., 2012). Uma amostra de sangue de cão positivo para *B.*
16 *canis* foi utilizada como controle positivo e água ultrapura como controle negativo
17 respectivamente. Para atestar a viabilidade da extração um PCR já previamente descrito foi
18 utilizado usando como alvo glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) gene
19 endógeno dos mamíferos com um protocolo previamente descrito na literatura
20 (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003).

21 Um fragmento (454 pb) do gene 18S rDNA de uma amostra positiva para piroplasma
22 foi sequenciada, o produto da PCR foi avaliado por espectrofotometria para concentração e
23 pureza (Pico100 Picodrop[®] Spectrophotometer, Picodrop Limited, Hinxton, UK) e sequenciado
24 para ambas as direções através o método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977)
25 utilizando o 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A sequência
26 parcial do gene 18S rDNA obtida foi comparada com sequencias depositadas na data base do
27 GenBank utilizando o Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (ALTSCHUL et al.,
28 1990).

29 Os carrapatos coletados destes animais foram classificados utilizando a chave
30 taxonômica morfológica (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

32 **Resultados e Discussão**

33 As PCRs realizadas mostraram apenas uma amostra positiva (0.35%; 95% CI: X – Y%)
34 das 347 estudadas para o 18S rDNA de piroplasmas, o sequenciamento deste fragmento (454

1 pb) demonstrou que esta região é 100% idêntica a múltiplas sequencias de *Babesia caballi*
2 depositadas no GenBank (MN907450.1; MH651222.1; KY952238.1; MT463343.1;
3 MZ331377.1).

4 No presente estudo, um exemplar de *Babesia* sp. semelhante a *Babesia caballi* foi
5 detectada em amostras de ovinos do estado do Paraná, sul do Brasil. Exemplares de
6 *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma sculptum* foram encontrados parasitando os ovinos do
7 estudo.

8 São inexistentes os relatos na literatura quanto a presença de *B. caballi* presente em
9 pequenos ruminantes no mundo, mas estes são acometidos por *Babesia ovis*, este que não
10 possui nenhum relato na literatura quanto sua presença em ovinos no Brasil (HE et al., 2021).

11 A presença deste piroplasma comumente relacionado a equinos acidentalmente
12 parasitando ovinos pode estar relacionada ao manejo e sanidade da propriedade em que o animal
13 se encontra. A propriedade localizada no município de Ibiporã, possui um sistema de criação
14 compartilhada dos animais. O animal positivo convivia com equinos, suínos, bovinos, canídeos,
15 felinos e aves no mesmo ambiente. Os ovinos da propriedade estavam infestados de carrapatos
16 associados a outros hospedeiros, estes carrapatos vetores competentes de piroplasmose equina
17 como já demonstrado anteriormente na literatura (SCOLES et al., 2011; UETI et al., 2005).

18 Estudos anteriores detectaram a presença de DNA de *Babesia ovis* responsável pela
19 piroplasmose em ovinos presente em hemácias de equinos (CEYLAN et al., 2021; OZUBEK;
20 AKTAS, 2018), estes dados concomitantemente aos resultados do estudo podem sugerir que
21 quando o vetor e o piroplasma de ambos os mamíferos está presente e a convivência deles
22 ocorre mutuamente, a presença acidental em ovinos por *Babesia caballi* e em equinos por
23 *Babesia ovis* pode acontecer com certa facilidade.

24

25 **Conclusão**

26 O estudo demonstra pela primeira vez na literatura *Babesia caballi* presente na espécie
27 ovina no mundo e também o primeiro relato de piroplasma em ovino do Brasil. Com isso uma
28 possibilidade de que piroplasmas entre das espécies equina e ovina podem ter presença
29 acidental frequente quando exista a convivência em mesmo ambiente e a presença de vetor.
30 Futuros estudos quanto a transmissão entre as espécies de piroplasmas e os hospedeiros são
31 necessárias.

32

33 **Referencias**

34 ALMEIDA, A. P. et al. *Coxiella symbiont* in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae).

- 1 **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 203–206, 2012.
- 2 ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.
3 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.
- 4 ANDREOTTI, R. et al. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus*
5 (*Boophilus*) *microplus* through tag-encoded pyrosequencing. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1,
6 p. 6, 6 jan. 2011.
- 7 BARROS-BATTESTI, D.; ARZUA, M.; BECHARA, H. Carrapatos de importância médico-
8 veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. **Universidade**
9 **de São Paulo**, p. 223, 2006.
- 10 BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and
11 evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian
12 genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.
13 41, n. 9, p. 4172–4177, 2003.
- 14 CEYLAN, O. et al. A survey on equine tick-borne diseases: The molecular detection of *Babesia*
15 *ovis* DNA in Turkish racehorses. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 5, p. 101784, 1 set.
16 2021.
- 17 CHAUVIN, A. et al. Babesia and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to
18 achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, mar. 2009.
- 19 DE WAAL, D. T. Equine piroplasmiasis: A review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1,
20 p. 6–14, 1 jan. 1992.
- 21 HE, Y. et al. Molecular detection of *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in yaks
22 (*Bos grunniens*) and Tibetan sheep (*Ovis aries*) on the Qinghai-Tibetan Plateau, China.
23 **Parasites and Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2021.
- 24 OZUBEK, S.; AKTAS, M. Genetic diversity and prevalence of piroplasm species in equids
25 from Turkey. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 59, p.
26 47–51, 1 ago. 2018.
- 27 RISTIC, M. Babesiosis of domestic animals and man. **Babesiosis of Domestic Animals and**
28 **Man**, p. 1–255, 2018.
- 29 SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating

1 inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467,
2 1977.

3 UETI, M. W. et al. Ability of the vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit
4 *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia.
5 **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3755–3759, ago. 2005.

6 VIEIRA, T. S. W. J. et al. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in
7 horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. **Ticks and Tick-**
8 **borne Diseases**, v. 4, n. 6, p. 537–541, 1 dez. 2013.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2 1. Uma espécie de *Babesia* próxima a *Babesia caballi* está presente em ovinos no
3 estado do Paraná, Sul do Brasil;

4 2. Uma espécie de *Mycoplasma hemotropicum* próximo a *Mycoplasma ovis* está presente
5 em ovinos no estado do Paraná, Sul do Brasil;

6 3. A criação de múltiplas espécies em associação, com ênfase entre as espécies ovina
7 e equina, situação encontrada neste trabalho, demonstra o potencial de infecção por hemoparasitas
8 encontrados em outros hospedeiros na mesma região;

9 4. Estudos para identificar e quantificar os ectoparasitas e o potencial de transmissão de
10 hemoparasitas para os ovinos são necessários para elucidar aspectos epidemiológicos destas
11 moléstias incidentes na região.

12

13