

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Investigação citológica, molecular e epidemiológica de micoplasmas hemotrópicos em populações de roedores e marsupiais em regiões dos estados do Rio de Janeiro e Paraná**

**Eduarda de Oliveira Silva Lima Machado**

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**INVESTIGAÇÃO CITOLÓGICA, MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA  
DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM POPULAÇÕES DE  
ROEDORES E MARSUPIAIS EM REGIÕES DOS ESTADOS DO RIO  
DE JANEIRO E PARANÁ**

**EDUARDA DE OLIVEIRA SILVA LIMA MACHADO**

*Sob a orientação do professor*  
**Maristela Peckle Peixoto**

*e Co-orientação dos Doutores*  
**Carlos Luiz Massard**  
**Bernardo Rodrigues Teixeira**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M149i Machado, Eduarda de Oliveira Silva Lima, 1999-  
Investigação citológica, molecular e epidemiológica  
de micoplasmas hemotrópicos em populações de roedores e  
marsupiais em regiões dos estados do Rio de Janeiro e  
Paraná / Eduarda de Oliveira Silva Lima Machado. -  
Vassouras, 2023.  
51 f.

Orientadora: Maristela Peckle Peixoto.  
Coorientador: Carlos Luiz Massard .  
Coorientador: Bernardo Rodrigues Teixeira .  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em  
Ciências Veterinárias, 2023.

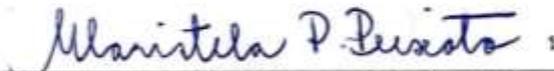
1. Micoplasmas hemotrópicos. 2. Bactérias  
epicelulares. 3. Pequenos mamíferos silvestres. I.  
Peixoto, Maristela Peckle , 1986-, orient. II.  
Massard , Carlos Luiz , 1947-, coorient. III.  
Teixeira , Bernardo Rodrigues, 1977-, coorient. IV  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. V.  
Titulo.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EDUARDA DE OLIVEIRA SILVA LIMA MACHADO**

Tese submetida para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM: 03 / 03 / 23



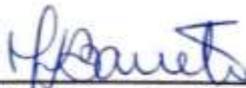
---

Maristela Peckle Peixoto, DSc, UFRRJ  
(Orientador/Presidente da Banca)



---

Huarrisson Azevedo Santos, DSc, UFRRJ



---

Maria Lucia Barreto, DSc, UFF

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta obra à Deus que sempre me guiou e protegeu. Aos familiares, que sempre estiveram comigo, me apoiando e incentivando em todas as etapas desta caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado, me protegendo e me guardando.

Aos meus pais, Juliana de Oliveira Silva e Victor Lima Machado, que sempre me apoiaram, confiaram e torceram para que eu alcançasse meus sonhos, e aos meus irmãos, Ana Carolina, Lorena, Leonora e Lorenzo, por tornarem meus dias mais leves e alegres.

À minha família por toda paciência, amor e apoio durante toda a minha trajetória. Em especial as minhas avós, Mafalda de Oliveira e Alvanira Lima Machado, e às minhas madrinhas Simone Silva e Rosa Braga.

Aos meus amigos de infância e amigos que fiz durante a graduação por todo apoio e incentivo.

À Universidade de Vassouras, onde pude aprender com professores e profissionais incríveis, que foram essenciais para a minha formação como pessoa, tanto na partilha de conhecimento quanto pelos ensinamentos para a vida. Em especial, Ana Paula Martinez e Mário dos Santos Filho, que me inspiraram e incentivaram a seguir a área acadêmica.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por ter me acolhido desde o início.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maristela Peckle Peixoto, que tanto admiro, por toda paciência e dedicação em me ajudar nessa caminhada, e a me motivar a ser uma pessoa melhor na vida pessoal e profissional. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Carlos Luiz Massard, por todo apoio e incentivo. Ao meu coorientador, Dr. Bernardo Rodrigues Teixeira, que teve um papel de grande importância em todas as etapas deste estudo.

Ao Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV-UFRRJ) e a toda equipe que me acolheram com muito carinho. Em especial, Isaac Lira, Thiago Dutra, Tatiana Pádua, Laís Oliveira e Letícia Pereira pela companhia, amizade, apoio e muitas risadas. Ao Walter Flausino por toda disponibilidade e ajuda durante todo o caminho.

Ao Prof. Dr. Huarrisson Azevedo Santos por todas as contribuições para realização deste estudo. À toda equipe do Laboratório de Sanidade Avícola (DESP/IV-LASAVE). Em especial, Patrícia Paulino, Nelson Meirelles, Laís Feliciano, Thamires Resende e Pamella, pela excelente convivência, amizade e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

À toda equipe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios - LABPMR/IOC/FIOCRUZ, pelo auxílio e parceria e por terem concedido as amostras para realização deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

Muito obrigada!

## RESUMO

MACHADO, Eduarda de Oliveira Silva Lima. **Investigação citológica, molecular e epidemiológica de micoplasmas hemotrópicos em populações de roedores e marsupiais em regiões dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.** 2023. 51p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Novas espécies e novos genótipos de micoplasma hemotrópico têm sido descritos, mas há muito o que ser estudado, especialmente em animais silvestres. Este estudo teve por objetivo realizar a análise citológica (morfologia, morfometria e parasitemia), detecção molecular, fatores associados a infecção e a diversidade do fragmento da sequência *16SrDNA* de hemoplasmas em roedores e marsupiais, em regiões dos estados do Rio de Janeiro e Paraná. Um total de 257 pequenos mamíferos foram capturados. A análise citológica foi realizada através de esfregaço sanguíneo corado em solução de Giemsa, em microscopia óptica, e o estudo morfométrico foi realizado através do software CellSens. A detecção molecular dos hemoplasmas foi baseada no gene *16SrDNA*. Os produtos amplificados na reação em cadeia de polimerase (PCR) foram selecionados e purificados para posterior sequenciamento. A análise filogenética foi realizada utilizando um conjunto de dados de 12 sequências de hemoplasmas obtidos neste estudo, 52 sequências disponíveis no Genbank, e *Mycoplasma miroungirhinitis* como outgroup. Dentre as 257 amostras de pequenos mamíferos, 23,3% (n=60) apresentaram estruturas compatíveis com *Mycoplasma* sp. em eritrócitos, através da investigação citológica. As bactérias apresentaram-se dispostas em cocos únicos, diplococos ou agrupadas ao longo da superfície dos eritrócitos. Houve diferença estatística significativa na média de comprimento e largura entre *Mycoplasma* de *Akodon* spp. e o encontrado em *Sooretamys angouya*, sendo os cocos de *S. angouya* considerados maiores. Quanto à localidade, houve diferença estatística significativa entre as médias de largura dos cocos e a parasitemia entre Rio de Janeiro e Paraná, sendo a largura dos cocos e a parasitemia encontrados em animais do Paraná maiores estatisticamente. Na PCR 33,8% (n=87) amplificaram o DNA de hemoplasmas. A região com maior frequência de positividade foi Cruz Machado (46,15%, n= 24/52), seguida por Ponta Grossa (43,10%, n=25/58), Nova Friburgo (30,56%, n= 33/108) e por fim Lidianópolis (12,50%, n=5/40). Comparados aos animais de Lidianópolis, os animais de Nova Friburgo, Cruz Machado e Ponta Grossa apresentaram 2,44 vezes (IC: 1,03 - 5,82), 3,69 vezes (IC: 1,55 - 8,82) e 3,45 vezes (IC: 1,44 - 8,24) mais chances de testar positivo para hemoplasmas, respectivamente. *Oligoryzomys* apresentou maior percentual de positividade para *Mycoplasma* spp. (78,05%, n=32/41), estatisticamente diferente de *Oxymycterus* spp. (42,11%, n=8/19), *Akodon* spp. (27,59%, n=40/145) e *Sooretamys* (9,09%, n=1/11). Animais do gênero *Oligoryzomys* tiveram 8,59 vezes (IC: 1,32 - 56,03) mais chances de apresentar DNA de hemoplasma quando comparados ao gênero *Sooretamys*. Os machos foram mais frequentemente parasitados por *Mycoplasma* spp. e tiveram 4,01 vezes (IC: 2,35 - 6,84) mais chances de amplificarem DNA de hemoplasma do que as fêmeas. As sequências de hemoplasmas amplificadas de roedores silvestres neste estudo, foram agrupadas em ramos bem suportados por altos valores de bootstrap com outras sequências de hemoplasmas previamente detectadas em roedores silvestres e sinantrópicos do Brasil e da Hungria. Animais provenientes dos municípios de Ponta Grossa e Cruz Machado, Paraná, machos, do gênero *Oligoryzomys* apresentam maior risco de serem infectados pelo micoplasma hemotrópico.

**Palavras-chave:** hemoplasma, micoplasmas hemotrópicos, epitelial, bactéria.

## ABSTRACT

MACHADO, Eduarda de Oliveira Silva Lima. **Cytological, molecular and epidemiological investigation of hemotropic mycoplasmas in rodent and marsupial populations in regions of the states of Rio de Janeiro and Paraná.** 2023. 51p. Dissertation. (Master in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2023

New species and new genotypes of hemotropic mycoplasma have been described, but they have long been trained, especially in wild animals. This study aimed to perform cytological analysis (morphology, morphometry and parasitemia), molecular detection, factors associated with infection and the diversity of the *16SrDNA* sequence fragment of hemoplasmas in rodents and marsupials, in the regions of the states of Rio de Janeiro and Paraná. A total of 257 small mammals were captured. Cytologic analysis was performed on Giemsa-stained blood smears under light microscopy, and morphometric study was performed using CellSens software. The molecular detection of hemoplasmas was based on the *16SrDNA* gene. The products amplified by polymerase chain reaction (PCR) were selected and purified for subsequent sequencing. Phylogenetic analysis was performed using a data set of 12 hemoplasma sequences obtained in this study, 52 sequences available in Genbank, and *Mycoplasma miroungirhinis* as an outgroup. Of the 257 samples from small mammals, 23.3% (n=60) showed structures compatible with *Mycoplasma* sp. in erythrocytes by cytological examination. The bacteria were arranged as single cocci, diplococci or grouped along the surface of the erythrocytes. There was a statistically significant difference in mean length and width between *Mycoplasma* de *Akodon* spp. and those found in *Sooretamys angouya*, with the cocci of *S. angouya* being considered larger. Regarding locality, there was a statistically significant difference between the mean width of cocci and parasitemia between Rio de Janeiro and Paraná, with the width of cocci and parasitemia found in animals from Paraná being statistically greater. In PCR, 33.8% (n=87) amplified hemoplasma DNA. The region with the highest frequency of positivity was Cruz Machado (46.15%, n= 24/52), followed by Ponta Grossa (43.10%, n=25/58), Nova Friburgo (30.56%, n= 33/108) and finally Lidianópolis (12.50%, n=5/40). Compared to animals from Lidianópolis, animals from Nova Friburgo, Cruz Machado and Ponta Grossa were 2.44 times (CI: 1.03 - 5.82), 3.69 times (CI: 1.55 - 8.82) and 3.45 times (CI: 1.44 - 8.24) more likely to test positive for hemoplasma, respectively. *Oligoryzomys* showed a higher percentage of positivity for *Mycoplasma* spp. (78.05%, n=32/41), statistically different from *Oxymycterus* spp. (42.11%, n=8/19), *Akodon* spp. (27.59%, n=40/145) and *Sooretamys* (9.09%, n=1/11). Animals of the genus *Oligoryzomys* were 8.59 times (CI: 1.32 - 56.03) more likely to present hemoplasma DNA than animals of the genus *Sooretamys*. Males were more frequently parasitized by *Mycoplasma* spp. and were 4.01 times (CI: 2.35 - 6.84) more likely to amplify hemoplasma DNA than females. The hemoplasma sequences amplified from wild rodents in this study were grouped into branches that were well supported by high bootstrap values with other hemoplasma sequences previously detected in wild and synanthropic rodents from Brazil and Hungary. Males of the genus *Oligoryzomys* from the municipalities of Ponta Grossa and Cruz Machado, Paraná, are at higher risk of being infected with hemotropic mycoplasma.

**Keywords:** hemoplasma, hemotropic mycoplasmas, epicellular, bacteria.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Primers, sequências, tamanho do amplicon e gene alvo utilizados em ensaios de PCR convencional e Touchdown PCR para detecção de micoplasmas hemotrópicos em pequenos mamíferos silvestres.....	17
<b>Tabela 2.</b>	Identificação de amostras de roedores capturadas nas regiões do Rio de Janeiro e Paraná, identificação da sequência no GenBank, hospedeiro, localização da amostra e tamanho do “contig” após sequenciamento.....	18
<b>Tabela 3.</b>	Concordância entre os testes citológico e molecular no diagnóstico de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres coletados em regiões do estado do Paraná e Rio de Janeiro.....	20
<b>Tabela 4.</b>	Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados por localidade e espécie, e frequência de positividade para bactérias sugestivas de micoplasma hemotrópico, através de análise citológica e PCR baseada no <i>16SrDNA</i> .....	21
<b>Tabela 5.</b>	Análise bivariada e razão de prevalência de <i>Mycoplasma</i> spp. em pequenos mamíferos selvagens por PCR com base no <i>16SrDNA</i> em função da área de estudo, táxon superior do hospedeiro, gênero do hospedeiro, gênero do hospedeiro e presença de ectoparasitas.....	23
<b>Tabela 6.</b>	Dados morfométricos de comprimento médio e largura média dos cocos sugestivos de micoplasma hemotrópico em <i>Akodon</i> spp., <i>Oligoryzomys nigripes</i> e <i>Sooretamys angouya</i> . Dados de <i>Oxymycterus nasutus</i> e <i>Rattus rattus</i> não fizeram parte da análise devido ao baixo N amostrado.....	25
<b>Tabela 7.</b>	Dados morfométricos de comprimento médio e largura média dos cocos sugestivos de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres coletados nos estados do Rio de Janeiro e Paraná.....	25
<b>Tabela 8.</b>	Número de animais cuja parasitemia foi considerada baixa ou moderada a alta por estado e espécie, comparados em análise bivariada por teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher a 5% de significância.....	26
<b>Tabela 9.</b>	Percentual de similaridade blast do sequenciamento baseado no <i>16SrDNA</i> de amostras positivas para micoplasma hemotrópico de roedores silvestres dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.....	27

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Várias inclusões cocóides de <i>Haemobartonella muris</i> (= <i>Mycoplasma haemomuris</i> ) encontradas no sangue periférico de ratos. Fonte: Imagens de microscopia de transmissão de Tanaka et al. (1965).....	6
<b>Figura 2.</b>	Esfregaço sanguíneo de cão. A) Eritrócitos nucleados (pontas de seta) e um corpúsculo de Howell-Jolly (seta). B) Pontilhado basofílico (seta pequena). C): Corpúsculo de Howell-Jolly (seta). Coloração de Wright. Fonte: Thrall, 2014.....	7
<b>Figura 3.</b>	Esfregaços sanguíneos de roedores. (A) As formas de <i>Bartonella grahamii</i> do rato-do-banco <i>Clethrionomys glareolus</i> da Polônia (seta preta). (B) Os tipos de <i>Candidatus Bartonella fadhilae</i> n. sp. de jird de cauda espessa <i>Sekeetamys calurus</i> do Egito (seta preta). (C) As formas de <i>Candidatus Bartonella sanaae</i> n. sp. do gerbil <i>Dipodillus dasyurus</i> do Egito (seta preta). Fonte: Alsarraf et al. (2017).....	8
<b>Figura 4.</b>	Áreas de captura de pequenos mamíferos não voadores em regiões com diferentes fitofisionomias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.....	12
<b>Figura 5.</b>	Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Nova Friburgo, região serrana do estado do Rio de Janeiro.....	12
<b>Figura 6.</b>	Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Ponta Grossa, estado do Paraná.....	13
<b>Figura 7.</b>	Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Cruz Machado, estado Paraná.....	13
<b>Figura 8.</b>	Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Lidianópolis, estado do Paraná.....	13
<b>Figura 9.</b>	Bactérias dispostas em diplococos e em cadeia. A) <i>Oligoryzomys nigripes</i> B) <i>Akodon montensis</i> C) <i>Euryoryzomys</i> sp. D) <i>Oligoryzomys nigripes</i> . Coloração Giemsa. Barra de escala: 10 µm.....	24
<b>Figura 10.</b>	Árvore filogenética de micoplasmas hemotrópicos com a probabilidade mais alta, inferida usando o método de Máxima Verossimilhança. Esta análise envolveu 64 sequências de nucleotídeos, com um dataset final de 971 posições. As análises evolutivas foram realizadas no MEGAX. Somente bootstraps acima de 50% estão demonstrados na imagem.....	28

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1	Pequenos mamíferos não voadores (Didelphimorphia e Rodentia) .....	2
2.2	Família Mycoplasmataceae .....	2
2.2.1	Micoplasma hemotrópico em animais domésticos no Brasil .....	4
2.2.2	Micoplasma hemotrópico em animais silvestres no Brasil .....	4
2.2.2.1	Hemoplasmas em roedores e marsupiais no Brasil .....	5
2.3	Diagnóstico citológico de micoplasma hemotrópico.....	5
2.4	Detecção molecular de micoplasma hemotrópico .....	8
2.5	Fatores associados à positividade por micoplasma hemotrópico .....	9
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
3.1	Aspectos éticos de pesquisa envolvendo mamíferos hospedeiros.....	11
3.2	Áreas de estudo.....	11
3.3	Tamanho da amostragem, coleta e procedimentos nos animais .....	14
3.4	Diagnóstico direto e cálculo de parasitemia em lâmina de esfregaço sanguíneo .....	15
3.5	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	15
3.5.1	Extração de DNA de amostras de tecido .....	15
3.5.2	Reação em cadeia da polimerase para o <i>16SrDNA</i> de micoplasma hemotrópico .....	16
3.5.3	Eletroforese em gel de agarose .....	17
3.6	Purificação e Sequenciamento .....	17
3.7	Caracterização molecular e análise filogenética.....	17
3.8	Análise estatística .....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
4.1	Detecção de micoplasma hemotrópico por exame citológico e molecular em pequenos mamíferos silvestres .....	20
4.2	Fatores associados à positividade por micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres, através da PCR baseada no <i>16SrDNA</i> .....	22
4.3	Análise morfológica e morfométrica de bactérias sugestivas de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres .....	23
4.4	Parasitemia de bactérias sugestivas de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres através da citologia .....	25
4.5	Análise filogenética de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres..	26
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>

<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>50</b>
----------	---------------------	-----------

# 1 INTRODUÇÃO

Dado o envolvimento de animais silvestres como hospedeiros de patógenos, os pequenos mamíferos silvestres surgem podendo atuar como reservatórios de agentes infecciosos e levar a exposição humana a alguns agentes etiológicos zoonóticos que circulam normalmente no ecossistema natural (MEERBURG et al., 2009).

A influência antrópica, como por exemplo, a expansão de habitações domésticas e animais de estimação em ambientes selvagens, contribui para a redução dos habitats naturais e, além de ameaçar a vida dos pequenos mamíferos, pode aumentar a probabilidade de vetores invertebrados transmitirem patógenos para humanos e animais domésticos, aumentando os riscos à saúde desses indivíduos (ROQUE et al., 2014).

Rodentia e Didelphimorphia compreendem dois importantes grupos de pequenos mamíferos, que desempenham um papel crucial na manutenção do equilíbrio ecológico (WILSON & REEDER, 2005). Por serem extremamente adaptáveis ao meio em que vivem e terem ampla distribuição e capacidade de dispersão, esses animais podem contribuir para a manutenção e a translocação de diversos agentes patogênicos. Entretanto, seu envolvimento como reservatório de algumas doenças não foi totalmente elucidado (MEERBURG et al., 2009).

As bactérias da família Mycoplasmataceae são considerados importantes patógenos, tanto na medicina humana como veterinária. Micoplasmas hemotrópicos são bactérias eritrócíticas epiteliais que se ligam a glóbulos vermelhos de uma grande variedade de animais selvagens e domésticos, incluindo humanos (NEIMARK et al., 2001; TANAKA et al., 1965). Embora a infecção por hemoplasma em animais domésticos tem sido bem documentada, pouco se sabe sobre prevalência, diversidade genética e vias de transmissão, ações entre bactérias-hospedeiros-vetores e o impacto da infecção na saúde de animais selvagens (GONÇALVES et al., 2015).

Abordagens filogenéticas têm mostrado a circulação de um grande e diverso número de genótipos e/ou Candidatus para novas espécies de hemoplasma em animais selvagens, incluindo alguns com zoonóticos potencial (MAGGI et al., 2013). No entanto, o potencial zoonótico de hemoplasmas de roedores e marsupiais ainda não foi estabelecido (HORNOK et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo geral realizar a análise citológica, detecção molecular, fatores associados a infecção e a diversidade do fragmento da sequência *16SrDNA* de micoplasmas hemotrópicos em populações de pequenos mamíferos não voadores, em regiões com diferentes fitofisionomias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.

Em relação aos objetivos específicos, os mesmos foram: realizar a detecção direta de micoplasma hemotrópico em lâmina de esfregaço sanguíneo, calculando a parasitemia e obtendo dados morfológicos e morfométrico; realizar a detecção molecular de micoplasma hemotrópico em amostras de tecido hepático de pequenos mamíferos; realizar a caracterização molecular e determinar as relações filogenéticas de micoplasma hemotrópico tecido hepático de pequenos mamíferos; associar dados relativos à infecção por micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos às variáveis eco-epidemiológicas como localidade de estudo, sexo do animal, espécie do hospedeiro, dentre outras.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Pequenos mamíferos não voadores (Didelphimorphia e Rodentia)

Rodentia e Didelphimorphia compreendem dois importantes grupos de pequenos mamíferos, desempenhando um papel crucial na manutenção do equilíbrio ecológico. Enquanto os roedores (ordem Rodentia) estão amplamente distribuídos em diferentes habitats e representam a maior ordem de mamíferos (mais de 2200 espécies), a família Didelphidae (ordem Didelphimorphia) é encontrada em toda a zona neártica e neotropical e compreende 98 espécies (WILSON & REEDER, 2005; IUCN, 2013).

Os pequenos mamíferos exercem influência importante na dinâmica das florestas Neotropicais e são bons indicadores tanto de alterações locais do habitat como alterações da paisagem. A influência na dinâmica da floresta se dá, principalmente, por atuarem como predadores, presas, consumidores primários e dispersores de sementes (LIMA et al., 2001).

Por serem extremamente adaptáveis ao meio em que vivem e terem ampla distribuição e dispersão, estes animais apresentam alta relevância na disseminação de patógenos emergentes e reemergentes, incluindo agentes com potencial zoonótico, e desempenham um papel crucial no desenvolvimento de estágios vetores hematófagos (LABRUNA, 2009; STUEN et al., 2013; ROQUE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2019).

Em muitos lugares, roedores e marsupiais vivem próximos a áreas urbanas. Esses animais periurbanos podem atuar como reservatórios de agentes infecciosos e levar a exposição humana a algumas zoonoses que circulam normalmente no ecossistema natural (MEERBURG et al., 2009). Esses animais sinantrópicos podem contribuir para a manutenção e a translocação de diversos agentes patogênicos. A transmissão a humanos pode ocorrer por meio de excretas contaminadas de animais infectados ou por intermédio de artrópodes vetores que tiveram contato com amplificadores de patógenos (MEERBURG et al., 2009).

O número de patógenos conhecidos transmitidos por vetores vem crescendo ao longo dos anos. Atualmente, são conhecidas mais de 60 doenças em que há a participação de roedores no ciclo de transmissão dos agentes etiológicos virais, pertencentes às famílias Arenaviridae, Reoviridae, Togaviridae, Picornaviridae e Flaviviridae (MEERBURG et al., 2009; PHAN et al., 2011; OLIVAL et al., 2017). A importância de indivíduos da ordem Rodentia na manutenção de agentes Anaplasmataceae no ambiente também vem sendo estudada, assim como a sua capacidade de atuar como reservatório para esses patógenos (BRAGA et al., 2018). Já os indivíduos da família Didelphidae são conhecidos por atuarem como importantes reservatórios de rickettsioses no Brasil (Milagres et al., 2010; Silveira et al., 2015; Barbieri, 2016). Além disso, há relatos da presença de bactérias da família Anaplasmataceae (GUIMARÃES et al., 2018), protozoários (CARDOSO et al., 2015; HORTA et al., 2016) e diversos vírus (BERNAL et al., 2021; 2021) nesses animais.

### 2.2 Família Mycoplasmataceae

Reino: Bacteria (WOESE et al., 1990)  
Divisão: Firmicutes (GIBBONS & MURRAY, 1978)  
Classe: Mollicutes (EDWARD & FREUNDT, 1967)  
Ordem: Mycoplasmatales (FREUNDT, 1955)  
Família: Mycoplasmataceae (FREUNDT, 1955)  
Gênero: *Mycoplasma* (NOWAK, 1929)

A família Mycoplasmataceae pertence a ordem Mycoplasmatales e é constituída de dois gêneros, *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Nocard e Roux (1898) isolaram micoplasmas pela primeira vez de material pulmonar de bovinos com pleuropneumonia, estes microrganismos passaram a ser conhecidos como “Pleuropneumonia Like Organisms” (PPLo) ou organismos semelhantes aos causadores da Pleuropneumonia, primeira patologia reconhecidamente por tais agentes. Nos anos subsequentes, as bactérias desta família começaram a ser isoladas de outros animais, humanos, plantas e insetos, sendo eles parasitos ou de vida livre (TULLY et al., 1993). *Mycoplasma pulmonis* foi descrita como uma das principais bactérias desta família que acometem os pequenos mamíferos, sendo responsável por causar doença respiratória, especialmente em roedores (LINDSEY et al., 1991; SCHOEB et al., 1996).

Os micoplasmas hemotrópicos, também chamados de hemoplasmas, são bactérias capazes de infectar diversos hospedeiros mamíferos, incluindo animais domésticos, selvagens e humanos, diferindo das demais espécies da família Mycoplasmataceae por apresentarem tropismo por eritrócitos (MILLÁN et al., 2021). Estes microrganismos, foram antigamente classificados como organismos riquetsiais, baseado nas suas propriedades Gram negativas, parasitismo de eritrócitos e possível transmissão através de artrópodes hematófagos, sendo pertencentes aos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales (KREIER & RISTIC, 1984). Entretanto, o tamanho diminuto, a ausência de parede celular e de flagelos, o não crescimento em cultivo e a resistência à penicilina aproximavam estas bactérias das características da família Mycoplasmataceae.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares e mediante a análise filogenética de sequências do gene *16SrDNA* de alguns destes organismos, como *Eperythrozoon suis*, *Eperythrozoon wenyonii*, *Haemobartonella felis* e *Haemobartonella muris*, estas bactérias foram reclassificadas como sendo do gênero *Mycoplasma*, ordem Mycoplasmatales, classe Mollicutes (NEIMARK & KOCAN, 1997, RIKIHISA et al., 1997). Diante disso, Neymark et al. (2001) propõe a mudança das quatro espécies estudadas para o gênero *Mycoplasma* sob as nomeações, “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” e “*Candidatus Mycoplasma wenyonni*”. A nomeação *Candidatus*, de caráter provisório, é proposto para procariotos não cultiváveis cujas características não estejam elucidadas, sendo conhecido pouco de sua biologia além de sua informação genômica (MURRAY & STACKEBRANDT, 1995). Em 2002, Neimark et al., propõe a mudança de nome das quatro espécies para *Mycoplasma haemofelis*, *M. haemomuris*, *M. haemosuis* e *M. wenyonni*.

Os micoplasmas hemotróficos, assim como os demais micoplasmas, são bactérias pequenas (0,3 a 0,8  $\mu$ M) desprovidas de parede celular e detém o menor genoma não viral conhecido (RAZIN, 1992; BERENT & MESSICK, 2003). Acredita-se que durante a evolução, os hemoplasmas tenham perdido algumas vias metabólicas e em consequência, mantiveram apenas os genes essenciais à sobrevivência (replicação, transcrição e síntese proteica), assumindo o parasitismo para o aproveitamento dos mecanismos de síntese da célula hospedeira (WOESE, 1987). Estudos sobre a via metabólica dos hemoplasmas mostram que os organismos incorporam glicose, colesterol, aminoácidos e vitaminas provenientes do exterior, o que os torna dependentes da ligação aos eritrócitos (MILES, 1992).

As rotas de transmissão de hemoplasmas permanecem pouco compreendidas (COHEN et al., 2018; MILLÁN et al., 2021). Tradicionalmente, a evidência tem sido colocada em vetores ectoparasitos como a principal via de transmissão de hemoplasma (GONÇALVES et al., 2015; HORNOCK et al., 2015). Estudos posteriores relatam discordância no status de infecção por micoplasma hemotrópico entre ectoparasitos e suas espécies hospedeiras, desta forma, alguns autores acreditam que os ectoparasitos podem desempenhar um papel limitado, se houver, na transmissão de hemoplasmas (COHEN et al., 2018; DE SOUSA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2020; MILLÁN et al., 2019; SACRISTÁN et al., 2019).

Estudos experimentais e de campo incriminaram piolhos (*Polyplax serrata* e *P. spinulosa*) como vetores de *M. coccoides* e *M. haemomuris* entre roedores (BERKENKAMP et al., 1988; HORNOK et al., 2015).

Entretanto, muitos pesquisadores concordam que existam rotas de transmissão inter e intraespecíficas de hemoplasma (COHEN et al., 2018; MILLÁN et al., 2021), como por exemplo contato direto através de interações sociais ou agressivas entre hospedeiros infectados e não infectados, no qual o micoplasma hemotrópico pode ser transmitido (MILLÁN et al., 2021; RETIEF et al., 2022).

A maioria dos estudos, senão todo o conhecimento sobre a patologia desses patógenos, deriva de animais domésticos. Os hemoplasmas podem causar anemia aguda e crônica, especialmente para hospedeiros imunocomprometidos, entretanto muitos animais desenvolvem infecções inaparentes e são assintomáticos (MESSICK, 2004). Estudos demonstram que os sintomas são geralmente mais graves em hospedeiros imunocomprometidos, esplenectomizados ou quando coinfectados com diferentes hemoplasma e/ou outros patógenos (SYKES & TASKER, 2013).

Diversas espécies de hemoplasmas já foram reportadas em todos os continentes, exceto na Antártica, o que sugere uma ampla distribuição mundial dos agentes infecciosos (BIONDO et al., 2009).

## **2.2.1 Micoplasma hemotrópico em animais domésticos no Brasil**

A expansão de habitações domésticas e animais de estimação em ambientes selvagens resultou em uma maior associação de hospedeiros silvestres reservatórios e vetores invertebrados com humanos e animais de estimação. No Brasil, diversas espécies de hemoplasmas já foram detectadas em animais domésticos.

Estudos detectaram o DNA de *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus M. Haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ em felinos domésticos, e observaram co-infecção destes agentes baseado na confirmação por sequenciamento (ANDRÉ et al., 2014; MARCONDES et al., 2018; MICELI et al., 2013). Espécies de hemoplasma que acometem cães, como *Mycoplasma haemocanis* e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”, já foram descritas no Brasil (ALVES et al., 2014; RAMOS et al., 2010; SILVA-SANTOS et al., 2014; SOARES et al., 2016; VALLE et al., 2014).

*Mycoplasma ovis* foi detectado em ovinos (SOUZA et al., 2019; MONGRUEL et al., 2020) e em caprinos do nordeste do Brasil, sendo o primeiro relato molecular da infecção por *M. ovis* em caprinos da América do Sul (MACHADO et al., 2017). Em relação aos bovinos, já foram detectados molecularmente as espécies ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ e *Mycoplasma wenyonii* (GIROTTO et al., 2012; DE MELLO et al., 2019).

Em populações comerciais de suínos, *Mycoplasma suis* foi identificado e possui alta prevalência, especialmente em porcas (GUIMARÃES et al., 2007).

A detecção molecular de hemoplasmas em cavalos só havia sido descrita na Alemanha (DIECKMANN et al., 2010), Irã (KALANTARI et al., 2020) e Nigéria (HAPPI & OLUNIYI, 2020). Kakimori et al. (2023) relataram pela primeira vez uma alta frequência de *Mycoplasma ovis* em cavalos de um assentamento rural no sul do Brasil.

## **2.2.2 Micoplasma hemotrópico em animais silvestres no Brasil**

Hemoplasmas são frequentemente detectados em várias espécies hospedeiras, sugerindo que podem não ser estritamente específicos de um único hospedeiro. No que diz respeito à vida silvestre, agentes do gênero *Mycoplasma* já foram detectados molecularmente

em todo o mundo (MILLÁN et al., 2021).

No Brasil, esses agentes foram relatados em carnívoros silvestres (ANDRÉ et al., 2011; DE SOUSA et al., 2017; CARNEIRO et al. al., 2020; CUBILLA et al., 2017a; FURTADO et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2007; PERLES et al., 2023), primatas não humanos (BONATO et al., 2015; CUBILLA et al., 2017b; DE MELO et al., 2019; GRAZZIOTIN et al., 2011; RAMALHO et al., 2017), javalis (DIAS et al., 2019; FERNANDES et al., 2022), guaxinins (FAGUNDES-MOREIRA et al., 2023), morcegos (IKEDA et al., 2021) bem como em seus ectoparasitos associados (GONÇALVES et al., 2020).

### 2.2.2.1 Hemoplasmas em roedores e marsupiais no Brasil

Gonçalves e colaboradores (2015) relataram uma ocorrência de 21,9% de hemoplasmas infectando roedores silvestres de cinco diferentes biomas brasileiros. A avaliação filogenética baseada em sequências de *16SrDNA* apoiada por uma porcentagem relativamente baixa de identidade encontrada pela análise Blast sugerem a circulação de novas espécies de hemoplasmas em roedores de diferentes biomas no Brasil.

Um genótipo intimamente relacionado com *M. haemomuris* foi detectado em um roedor selvagem por De Sousa e colaboradores (2017). O mesmo genótipo já foi detectado em roedores silvestres do mesmo bioma, Pantanal (GONÇALVES et al., 2015) e em roedores de vida livre e de laboratório na cidade de Curitiba, no estado do Paraná (CONRADO et al., 2015), sugerindo que *M. haemomuris* seja a principal espécie de micoplasma hemotrópico parasitando roedores nas regiões do Brasil. *Mycoplasma haemomuris* foi separado em dois subgrupos geneticamente distintos: ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. musculi’, detectado em *Apodemus argenteus* no Japão, e ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. ratti’, detectado em *Rattus rattus* (HARASAWA et al., 2015).

Além de *M. haemomuris* em roedores, existe um número crescente de *Candidatus* a novas espécies de *Mycoplasma* proposto para espécies diferentes de mamíferos, incluindo roedores distribuídos ao redor do mundo. Portanto, a diversidade de hemoplasmas que infectam roedores é complexa (GONÇALVES et al., 2015).

Em relação aos marsupiais, ‘*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*’ foi detectado previamente em gambás-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) nas regiões sul (MASSINI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2021; PONTAROLO et al., 2021), centro-oeste (GONÇALVES et al., 2020) e sudeste do Brasil (OROZCO et al., 2022), com base na análise da sequência do gene *16SrDNA*.

## 2.3 Diagnóstico citológico de micoplasma hemotrópico

O diagnóstico citológico corresponde ao estudo de uma população de células na tentativa de definir ou classificar um tecido ou um fluido a partir de suas características microscópicas (STOCKHAM & SCOTT, 2011). A utilização da citologia como meio de diagnóstico possui como vantagens o baixo custo, ser pouco invasivo, apresentar uma alta segurança, permitir ampla amostragem e o curto tempo entre o processo de diagnóstico e o resultado. Em contrapartida, a veracidade dos resultados depende de uma boa coleta, evitando possíveis contaminações e artefatos, e de uma coloração que evidencie tanto características citoplasmáticas quanto nucleares (RASKIN & MEYER, 2009).

Além da sua utilização mais usual no diagnóstico e na classificação de tumores e lesões dermatológicas, a citologia é uma excelente ferramenta para o diagnóstico parasitológico. O diagnóstico de micoplasmoses pode ser realizado através da confecção de

esfregaços sanguíneos constituídos de uma fina camada de eritrócitos, devidamente corados e com ausência de artefatos, objetivando a prevenção da ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos (VIDAL, 2013). Embora seja muito utilizada, a citologia deve ser implementada como um método diagnóstico de triagem, já que possui uma baixa sensibilidade e não é capaz de diferenciar as espécies de micoplasmas infectantes (TASKER et al., 2003).

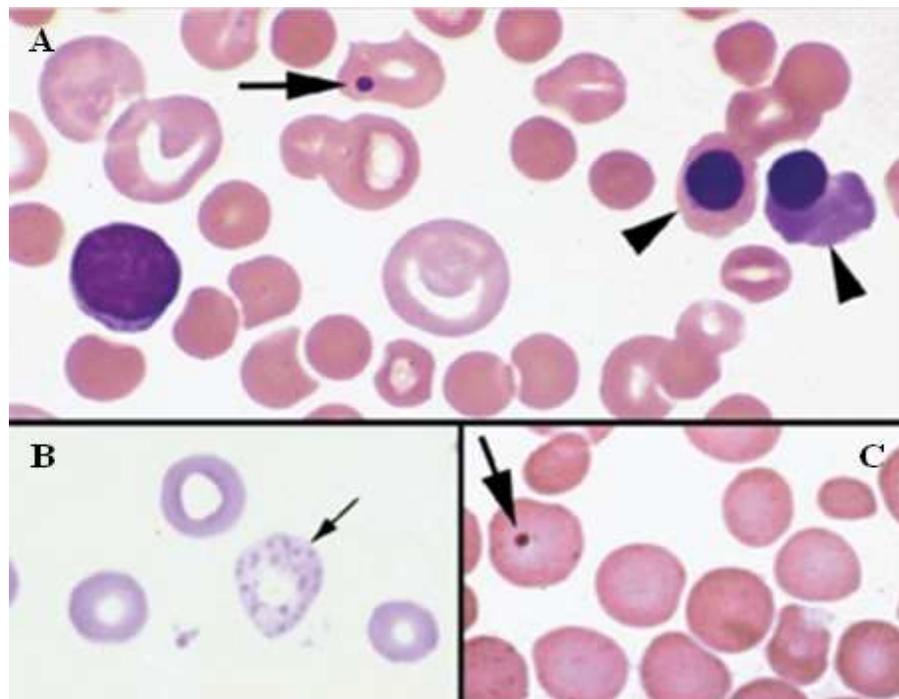
Devido à ausência de uma parede celular, os hemoplasmas são pleomórficos e pequenos (0,3 a 0,8 $\mu$ M) e são observados sob diferentes formas. Podem ser visualizados ao microscópio óptico em esfregaços sanguíneos corados por corantes do tipo Romanowsky, como estruturas basofílicas, de forma cocóide, em bastão ou anel, encontrados individualmente, agrupados, em pares (diplococos) (Figura 1) ou em cadeias ao longo da superfície dos eritrócitos (NEIMARK et al., 2001; TANAKA et al., 1965). Geralmente estão localizados em depressões e invaginações na membrana dos eritrócitos e aderidos a esta por delicadas fibrilas (AIKAWA & NUSSENZWEIG, 1972; DILLBERGER et al., 1994; NEIMARK & KOCAN, 1997; NEIMARK et al., 2004; PETERS et al., 1974; TANAKA et al., 1965; ZACHARY & BASGALL, 1985).



**Figura 1.** Várias inclusões cocóides de *Haemobartonella muris* (= *Mycoplasma haemomuris*) encontradas no sangue periférico de ratos. Fonte: Imagens de microscopia de transmissão de Tanaka et al. (1965).

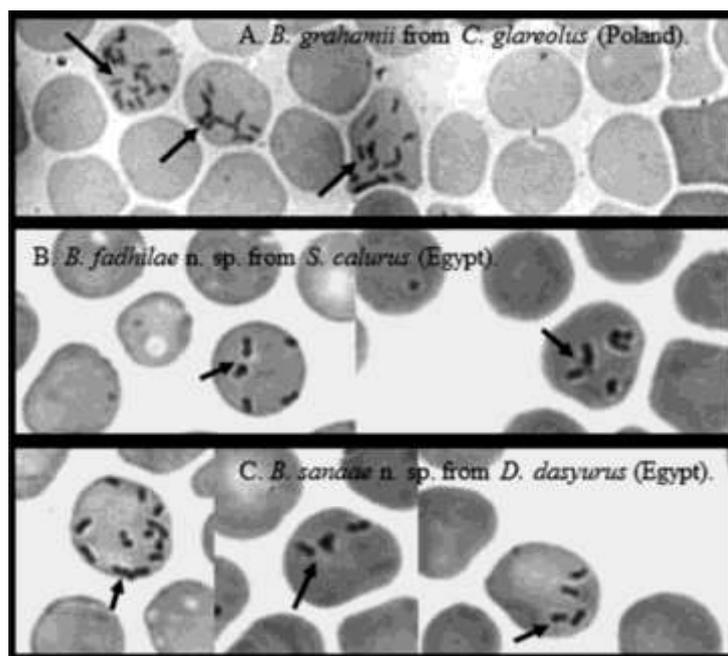
Embora o exame citológico apresente uma alta especificidade pode ser comum o diagnóstico falso positivo de micoplasma devido à similaridade morfológica apresentada por

artefatos e inclusões aos cocos desta bactéria. O corpúsculo de Howell-Jolly (Figura 2), um remanescente nuclear que permanece livre no citoplasma após a mitose de um precursor eritróide, pode ser confundido com o parasitismo de hemácias por cocos únicos de micoplasma. Já o pontilhado basofílico (Figura 2), composto de um agregado de ribossomos e RNA e caracterizado morfológicamente pela disposição de pequenos pontos finos a grosseiros e de coloração variando entre azul e roxo escuro, pode levar a um falso diagnóstico de micoplasmose devido a sua intensa similaridade morfológica, já que estão dispersos dentro do citoplasma de eritrócitos. Ambas as alterações são frequentemente encontradas em animais que apresentam uma anemia regenerativa, alteração hematológica que também é corrente em infecções causadas por espécies de micoplasma, tornando esse falso diagnóstico ainda mais possível (THRALL, 2014; STOCKHAM & SCOTT, 2011).



**Figura 2.** Esfregaço sanguíneo de cão. A) Eritrócitos nucleados (pontas de seta) e um corpúsculo de Howell-Jolly (seta). B) Pontilhado basofílico (seta pequena). C): Corpúsculo de Howell-Jolly (seta). Coloração de Wright. Fonte: Thrall, 2014.

Outras espécies hemotrópicas, como por exemplo as bactérias do gênero *Bartonella*, apresentam características morfológicas semelhantes aos hemoplasmas quando visualizados através da microscopia óptica. Estes agentes apresentam-se como bacilos ou cocobacilos finos, curtos e pleomórficos (Figura 3) (ALSARRAF et al., 2017), podendo ser facilmente confundidos com as formas cocóides, em bastão ou em anel dos micoplasmas hemotrópicos.



**Figura 3.** Esfregaços sanguíneos de roedores. (A) As formas de *Bartonella grahamii* do rato-do-banco *Clethrionomys glareolus* da Polônia (seta preta). (B) Os tipos de *Candidatus Bartonella fadhilae* n. sp. de jird de cauda espessa *Sekeetamys calurus* do Egito (seta preta). (C) As formas de *Candidatus Bartonella sanaae* n. sp. do gerbil *Dipodillus dasyurus* do Egito (seta preta). Fonte: Alsarraf et al. (2017).

Resultados falsos negativos podem ocorrer dependendo do grau de parasitemia no organismo do hospedeiro, e devido a alterações pela ação do anticoagulante etileno-diaminotetracético de sódio ou potássio (EDTA), o qual causa desprendimento do agente dos eritrócitos (TASKER, 2006).

#### 2.4 Detecção molecular de micoplasma hemotrópico

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), começaram a ser utilizadas como métodos alternativos aos métodos fenotípicos e genotípicos tradicionais, a partir da década de 1980. Devido à sua capacidade em detectar pequenas concentrações de ácido nucleico com alta sensibilidade e especificidade, a PCR tornou-se uma ferramenta valiosa e muito confiável para o diagnóstico e monitoramento de doenças dos animais, verificar a autenticidade de alimentos, diagnóstico de doenças genéticas, identificação de novas espécies, entre outras (HOFMANN et al., 2008). Esta técnica se baseia na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de DNA a partir de uma fita molde, gerando diversos clones numa mesma reação (MULLIS & FALOONA, 1987).

O diagnóstico molecular de micoplasmas hemotrópicos pode ser realizado pela amplificação do fragmento do gene *16SrDNA* (HIDALGO-HERMOSO et al., 2022; MAGGI, 2013; SANTOS et al., 2019; PONTAROLO et al., 2021), entretanto o uso de um marcador genético universal solitário, como o gene *16SrDNA*, não pode fornecer uma identificação genética precisa de isolados de *Mycoplasma* filogeneticamente próximos ao nível da espécie (VOLOKHOV et al., 2017). Outros marcadores genéticos (por exemplo, *rpoB*, *rpoC*, *gyrB*, *dnaK*, *23S rRNA* e *RNAse P*) são necessários para diferenciar algumas espécies de hemoplasma intimamente relacionadas (KAMPFER & GLAESER, 2011; VOLOKHOV et al., 2012; VOLOKHOV 2017; DESCLOUX et al. 2020, VALENTE et al. 2020; TASKER et al.,

2010; MONGRUEL et al., 2020).

Apesar da boa sensibilidade dos métodos moleculares, aspectos como a fase da infecção e o tipo de amostra biológica, devem ser levados em consideração. Por exemplo, animais cronicamente infectados podem apresentar resultados falso negativos devido à baixa quantidade de microrganismos circulantes. Já em relação a escolha da amostra biológica utilizada para o ensaio de PCR, esta também deve ser levada em consideração na interpretação dos resultados, uma vez que a mesma pode estar ou não estar relacionada ao curso típico do agente no organismo do hospedeiro (CONRADO et al., 2015; LAPPIN et al., 2008).

## 2.5 Fatores associados à positividade por micoplasma hemotrópico

Poucos estudos reuniram informações suficientes para permitir inferir potenciais fatores de risco para infecção por hemoplasma em animais selvagens. No entanto, alguns fatores ecológicos e evolutivos parecem aumentar o risco de hemoplasma (MILLÁN et al., 2020).

A diferença observada na ocorrência de hemoplasmas tem sido atribuída a fatores biológicos distintos, como grupo de animais analisados, tipos de habitat, espécie hospedeira (hábitos alimentares e comportamento social, por exemplo), idade e sexo. Em relação ao grupo de animais analisados, animais de vida livre apresentam maior prevalência de hemoplasma quando comparados a animais mantidos em cativeiro (VIEIRA et al., 2009; WILLI et al., 2007).

A ocorrência de infecção por hemoplasma também apresentou diferenças significativas quando animais localizados em habitats antropizados foram comparados ao grupo de animais em ambientes não antropizados. Animais em locais não antropizados apresentam maiores chances de infecção por hemoplasma, enquanto animais localizados em ambientes urbanos apresentam frequência de positividade mais baixa (GONÇALVES et al., 2020; SACRISTÁN et al. 2019; VOLOKHOV et al., 2017).

Algumas espécies animais podem ter maior risco de infecção aos hemoplasmas do que outras, por características da própria espécie, como por exemplo, o comportamento social. Em um estudo na Espanha, a prevalência da infecção por *Mycoplasma* foi significativamente maior em texugos do que em raposas, e uma explicação para esta diferença, seria a maior taxa de contatos intraespecíficos devido ao estilo de vida social dos texugos (MILLÁN et al., 2018). O comportamento social também pode explicar a alta prevalência encontrada em guaxinins (VOLOKHOV et al., 2017) e quatis (DE SOUSA et al. 2017). Populações mais densas de morcegos e aquelas com colônias maiores também tiveram maior prevalência (BECKER et al., 2020). No entanto, a alta prevalência de hemoplasmas também foi relatada em espécies solitárias de morcegos (DI CATALDO et al., 2020b).

Os hábitos alimentares, em particular o comportamento predatório, também podem aumentar o risco de infecção por hemoplasma, especialmente em carnívoros. Kellner et al. (2018) mostraram que felinos selvagens podem ser infectados após predação de gatos domésticos. Por outro lado, foi encontrada em diferentes espécies de carnívoros sul-americanos, uma sequência de uma espécie de hemoplasma potencialmente nova, intimamente relacionada a hemoplasmas de roedores, e provavelmente se originou de uma rota de transmissão predador-presa (CABELLO et al., 2013; MILLÁN et al., 2019; SACRISTÁN et al., 2019). A idade também parece ser um fator de risco de infecção. Por exemplo, em onças (FURTADO et al., 2018), raposas (DI CATALDO et al., 2020a) e gatos (PERSICHETTI et al., 2018), a prevalência foi maior em adultos do que em animais jovens.

O sexo também parece ter influência na taxa de infecção por hemoplasma em vários

táxons de mamíferos. Guaxinins machos tiveram maior prevalência de *Mycoplasma* do que fêmeas nos Estados Unidos da América (EUA) (VOLOKHOV et al., 2017). Em uma comunidade diversificada de morcegos neotropicais em Belize, os machos também apresentaram chances consistentemente maiores de infecção (BECKER et al., 2020). No entanto, outros autores não encontraram diferenças entre machos e fêmeas, sugerindo que os vieses sexuais na infecção podem variar entre táxons de mamíferos (CONRADO et al., 2015; COHEN et al., 2018; D CATALDO et al., 2020a; HOELZLE et al., 2010; RETIEF et al., 2022; SACRISTÁN et al., 2019; SASHIDA et al., 2013).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos de pesquisa envolvendo mamíferos hospedeiros**

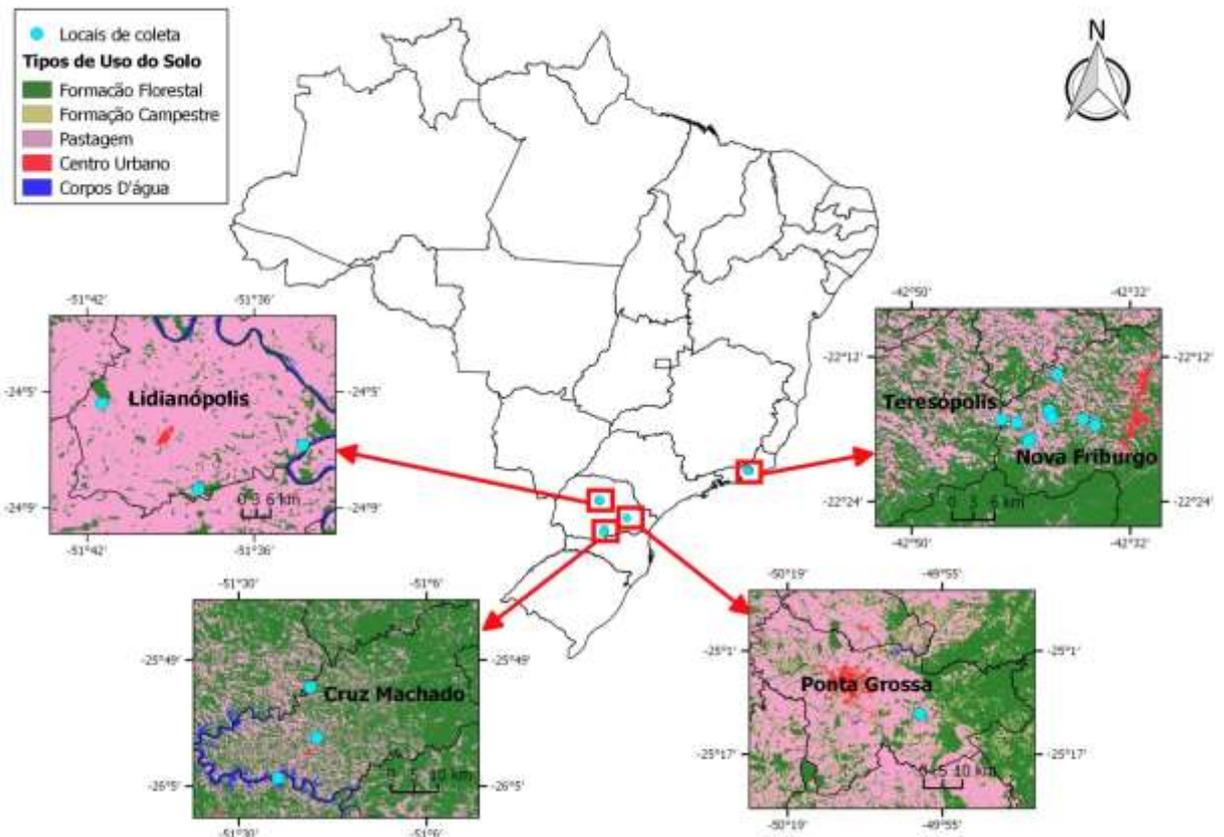
Todos os procedimentos foram realizados com os animais sedados, e seguem protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (L-036/2018).

Todos os procedimentos para eutanásia utilizados seguem a Diretriz da Prática da Eutanásia - CONCEA, Resolução Normativa no 37, de 15 de fevereiro de 2018 e Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados. CFMV, 2013., sendo o manuseio dos animais realizados segundo normas de biossegurança nível 3 (LEMOS & D'ANDREA, 2014).

Todos os animais coletados foram taxidermizados e seus esqueletos preparados, para depósito na coleção científica do LABPMR/IOC-Fiocruz e na coleção do Museu Nacional, UFRJ. Todas as expedições de coleta estão de acordo com as licenças de captura do ICMBIO, número 13373 para todo o território nacional e 63846 para as Unidades de Conservação.

#### **3.2 Áreas de estudo**

Os pequenos mamíferos não voadores foram capturados em regiões com diferentes fitofisionomias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná (Figura 3). As áreas de estudos se concentram no município de Nova Friburgo (22°13'23"S, 42°38'16"W; estado do Rio de Janeiro), região serrana localizada na Floresta Ombrófila Densa do domínio Mata Atlântica, que possui clima tropical de altitude, classificado como Cwa pela Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007). A segunda área de estudo está localizada nos municípios de Ponta Grossa (Figura 5), Cruz Machado (Figura 6) e Lidianópolis (Figura 7) no Estado do Paraná. Os municípios de Ponta Grossa (25°11'58,82"S, 49°57'10,33"W) e Cruz Machado (26°4'25,7"S, 51°25'0,5"W) apresentam clima subtropical temperado mesotérmico, ou Cfb, e Lidianópolis (24°8'15,02"S, 51°38'25,60"W) possui clima subtropical temperado mesotérmico, ou Cfa (KOTTEK et al., 2006). Os locais de amostragem em Ponta Grossa estavam localizados no Parque Nacional e incluíam áreas de campos nativos ("Campos Gerais") e floresta ombrófila mista do domínio Mata Atlântica ("Mata de Araucárias"). Esta área é uma unidade de conservação protegida, mas com muitos ambientes antrópicos de monoculturas e pecuária. Enquanto Cruz Machado está incluída apenas na região da Floresta Ombrófila Mista, e Lidianópolis na Floresta Estacional Semidecidual, também do domínio da Mata Atlântica.



**Figura 4.** Áreas de captura de pequenos mamíferos não voadores em regiões com diferentes fitofisionomias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.



**Figura 5.** Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Nova Friburgo, região serrana do estado do Rio de Janeiro.



**Figura 6.** Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Ponta Grossa, estado do Paraná.



**Figura 7.** Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Cruz Machado, estado do Paraná.



**Figura 8.** Área de coleta de pequenos mamíferos silvestres no município de Lidianópolis, estado do Paraná.

### 3.3 Tamanho da amostragem, coleta e procedimentos nos animais

Devido a prevalência desconhecida de micoplasmas hemotrópicos nas populações de roedores e marsupiais do Rio de Janeiro e Paraná, para a fórmula do cálculo de tamanho amostral foi utilizada uma prevalência esperada de 50%, estabelecendo um grau de confiança de 95% e uma precisão de 7% (MEDRONHO et al., 2009). O número da amostra foi definido de acordo com a equação descrita por Sampaio (2002):

$$N = \frac{1,96^2 \times P_{esp}(1-P_{esp})}{d^2}$$

Na qual N representa o tamanho da amostragem;  $P_{esp}$  significa prevalência esperada e  $d^2$  é igual à precisão absoluta desejada.

Por esta equação, deveriam ser coletados um mínimo de 196 animais.

A coleta das amostras foi realizada no período de agosto de 2019 a novembro de 2022 por conveniência não probabilística. O número total de amostras coletadas na região de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, foi de 107, e nas regiões do Paraná foi de 150, distribuídas da seguinte forma: Cruz Machado (n=52), Ponta Grossa (n=58) e Lidianópolis (n=40), totalizando 257 animais amostrados.

As amostras foram recebidas a partir de expedições de campo para coleta de mamíferos hospedeiros e amostras biológicas, realizadas pelo Laboratório de Biologia e Parasitologia de Pequenos Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR/IOC/FIOCRUZ).

As expedições de coleta tiveram duração de cinco noites de captura. Os animais foram capturados em armadilhas modelos Tomahawk® (40,64cm x 12,70cm x 12,70cm) e Sherman® (7,62cm x 9,53cm x 30,48cm), tendo como base um esforço de captura de 150 armadilhas por noite de captura, espaçadas em dez metros nas linhas de captura. Todos os espécimes capturados foram removidos para um laboratório de campo, estabelecido segundo normas de biossegurança de nível 3, onde os animais foram eutanasiados para a coleta de amostras de sangue e órgãos.

Os animais foram pesados para cálculo da dose adequada de sedação. Após assepsia com álcool 70%, sob supervisão de médico veterinário responsável, os animais foram anestesiados utilizando-se agulhas tamanho 13x0,38mm acoplada em seringa de 1mL, inoculadas de forma intramuscular (IM) na parte externa do músculo quadríceps femoral dos animais ou intraperitoneal (volume máximo = 0,05mL por membro para pequenos mamíferos com menos de 100g). Após a aplicação da anestesia, o animal permaneceu no saco até o início do efeito da anestesia. O protocolo anestésico para roedores e marsupiais incluiu a associação de 200mg/Kg de Cloridrato de Quetamina à 10% e 20 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina à 2%, na proporção de 2:1. Dose = 0,30mL/100g peso vivo (P.V.). O tempo de duração foi de 20 a 30 minutos, sendo a manutenção da anestesia, quando necessário com metade da dose inicial. O animal foi retirado do saco quando constatado a ausência de consciência, colocado em decúbito dorsal e testados seus reflexos corneal e resposta à estímulo nociceptivo.

Nos roedores e marsupiais, caso não tenha ocorrido a morte pela exsanguinação, foi administrado Tiopental Sódico (Dosagem = 120 mg/Kg) por via intracardíaca. A dose utilizada foi de 0,24mL/100g peso corpóreo de Tiopental Sódico à 5%. Ao final do procedimento foi realizada nova avaliação dos parâmetros cardiopulmonares e repetida a administração de Tiopental caso fosse necessário. Somente após a constatação clínica da morte do animal realizou-se a coleta de amostras biológicas.

Os animais capturados foram identificados ao nível de espécie, através de análises de taxonomia integrativa, incluindo análises morfológicas, citogenéticas e moleculares (DALAPICOLLA & PERCEQUILLO, 2020). Além disso, informações inerentes aos

pequenos mamíferos como sexo e presença de ectoparasitos, e inerentes ao local, como o bioma foram obtidos.

As amostras biológicas coletadas foram um fragmento de fígado, armazenado em solução de RNAlater®. As amostras foram mantidas congeladas até a chegada no laboratório, onde foram estocadas em freezer -80° C até o procedimento de extração de DNA. Para o diagnóstico citológico de infecção por hemoplasmas foram preparados dois esfregaços sanguíneos a partir de amostras de sangue fresco dos pequenos mamíferos coletados.

### **3.4 Diagnóstico direto e cálculo de parasitemia em lâmina de esfregaço sanguíneo**

As amostras de sangue fresco coletadas foram utilizadas para a confecção do esfregaço sanguíneo em lâmina à campo. Em seguida foram fixadas em metanol por dez minutos a campo, secas ao ar e armazenadas em caixas apropriadas. O material foi enviado para o Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da UFRRJ para serem coradas pelo método de Giemsa (1:10) por 45 minutos, e submetidas à microscopia óptica com objetiva de imersão (1000x) para possibilitar a visualização direta de bactérias sugestivas às do gênero *Mycoplasma* em eritrócitos.

O diagnóstico direto em lâmina foi realizado a partir de formas compatíveis com *Mycoplasma* encontradas em exame citológico. As lâminas de esfregaço sanguíneo coradas foram analisadas por dois observadores diferentes. Imagens de eritrócitos com bactérias sugestivas às do gênero *Mycoplasma* em eritrócitos foram obtidas através de fotografia no Laboratório Multiusuário de Bioimagem do Departamento de Parasitologia Animal - LAMBIO (DPA/IV/UFRRJ) no equipamento Olympus BX-51.

Para o estudo morfométrico foi utilizado o software CellSens, onde avaliou-se o comprimento e a largura total de 5 cocos bacterianos sugestivos de *Mycoplasma* em cada eritrócito, no total de 10 eritrócitos por animal infectado, obtendo-se assim a média individual, a média geral, amplitude e desvio padrão dos animais de mesma localidade. Somente animais com parasitemia acima de 10 células parasitadas por  $\mu\text{l}$  foram utilizados para morfometria de bactérias sugestivas às do gênero *Mycoplasma* em eritrócitos.

A parasitemia foi calculada segundo o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária (BRASIL, 2005). O método de avaliação quantitativa pela contagem de 100 campos microscópicos foi adaptado, obedecendo os seguintes critérios: número de campos a examinar igual a 100; aumento de 1000x nas visualizações em microscópio óptico; assumir que nessas condições de leitura 100 campos microscópicos equivalem a 0,2 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de sangue; multiplicar por 5 o número de eritrócitos parasitados encontrados nos 100 campos examinados:

$$P = n \times 5$$

Onde, P=parasitemia; n= número de eritrócitos parasitados. E registrar o número encontrado no cálculo acima como a parasitemia por  $\mu\text{l}$  de sangue.

### **3.5 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

#### **3.5.1 Extração de DNA de amostras de tecido**

A extração de DNA total de fragmento de fígado foi realizada com o “DNeasy Blood and Tissue kit” (Qiagen, Hilden, Alemanha). 25mg das amostras de fígado foram cortados, pesados e colocados em tubos de polipropileno 1,5ml. Foram adicionados 180 $\mu\text{l}$  de “Buffer

ALT” ao tubo. Em seguida, os fragmentos de fígado foram cortados em pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura oftálmica cirúrgica de ponta fina. A fim de evitar contaminação, a tesoura foi higienizada com Hipoclorito de Sódio a 5%, álcool 70% e água destilada e foi flambada em chama fria, entre cada amostra. Após esta etapa, 20µl de Proteinase K foi adicionado, seguido de homogeneização por vortex por 15 segundos. As amostras foram incubadas a 56°C no termobloco por 12 horas. Após este processo, as amostras foram homogeneizadas em vortex por 15 segundos e 200µl de “Buffer AL” e 200µl de etanol absoluto (100%) foram adicionados. Este homogeneizado foi transferido para uma coluna contendo um tubo coletor embaixo. A coluna foi submetida então ao processo de centrifugação a 6000 x g por 1 min. O precipitado foi descartado juntamente com o tubo coletor. A coluna foi introduzida em um novo tubo de 2ml e foi adicionado 500µl de “Buffer AW1” e centrifugado a 6000 x g por 1 min e, novamente, o precipitado foi descartado. A coluna foi inserida em um novo tubo de polipropileno de 2ml e nela foi adicionado 500µl de “Buffer AW2”, que foi centrifugado a 20000 x g por 3 min para secar a membrana da coluna. O precipitado foi descartado e a coluna foi centrifugada a 20000 x g por mais 1 min para eliminar o resíduo do álcool. A coluna foi colocada em um novo tubo de polipropileno de 1,5ml identificado com o número da amostra, e foi pipetado 200µl de “Buffer AE” diretamente na membrana da coluna. A amostra foi incubada por 1 min a temperatura ambiente e, centrifugada a 8000 x g por 1 min para eluir o DNA.

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foi realizada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, EUA). A integridade do DNA também foi conferida em corrida de gel de agarose 1%, com coloração por brometo de etídio. As amostras de DNA foram diluídas e padronizadas na concentração de 60 ng/µL, e utilizadas para a confecção de alíquotas.

### **3.5.2 Reação em cadeia da polimerase para o *16SrDNA* de micoplasma hemotrópico**

Uma alíquota do DNA extraído de fígado de roedores e marsupiais, padronizada a 60ng/µL, foi utilizada para o diagnóstico de micoplasmas hemotrópicos através da amplificação de um fragmento de aproximadamente 620 pares de base (pb) do *16SrDNA* com os primers Myco 322s e Myco 938as (Tabela 1) (VARANAT et al., 2011).

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 µL, sendo 1,5mM de Mg, 0,2 mM de dNTPs, 0,5µM de cada primer, 1,25U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 minutos, 55 ciclos a 94°C por 15 segundos, 68°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, e extensão final a 72°C por 1 minuto.

O controle positivo foi obtido de um felino positivo para *Mycoplasma haemofelis* em lâmina de esfregaço sanguíneo corada e confirmação através de diagnóstico molecular, e a água ultrapura (Nuclease-Free Water, Ambion®) foi usada como controle negativo.

As amostras positivas na PCR convencional foram submetidas a uma Touchdown PCR, visando a amplificação de um fragmento maior, de aproximadamente 1450-1560 pb, com os primers 16SF e 16SR completo (Tabela 1) (BECKER et al., 2020) para posterior sequenciamento e análise filogenética. As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, sendo 2,5mM de Mg, 0,2 mM de dNTPs, 0,4µM de cada primer, 1,5U de Taq DNA Polimerase e 180ng de DNA. As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 minutos, 10 ciclos a 95°C por 30 segundos, 61°C diminuindo 0,5°C a cada ciclo por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos.

**Tabela 1.** Primers, seqüências, tamanho do amplicon e gene alvo utilizados em ensaios de PCR convencional e Touchdown PCR para detecção de micoplasmas hemotrópicos em pequenos mamíferos silvestres

Primer	Seqüência de DNA (5'-3')	Tamanho do fragmento(pb)	Gene	Referência
Myco 322s	GCCCATATTCCTACGGGGAAGCAGCAG	620	<i>16SrDNA</i>	VARANAT et al., 2011
Myco938as	CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC	620		
16SF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1450-1560	<i>16SrDNA</i>	BECKER et al., 2020
16SR	CTCAAACTGAAAGYCATCCGC	1450-1560		

### 3.5.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação da PCR convencional e Touchdown PCR foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi de 45 minutos à 125V (5V/cm) em tampão TAE (Tris, acetato e EDTA). Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100-15.000pb (Invitrogen 1 Kb Plus DNA – ThermoFisher Scientific). Em seguida, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados sob luz UV nos fotodocumentadores E-Gel™ Imager System with UV Light Base (Thermo Fisher Scientific) e L-Pix Touch (Loccus) e posteriormente analisados quanto à presença e ausência de bandas.

### 3.6 Purificação e Sequenciamento

Os produtos amplificados por Touchdown PCR foram purificados utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification e enviados para sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) no Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células Tronco (IB/USP).

Para o sequenciamento da amplificação dos primers 16SF e 16SR foram enviados estes mesmos primers mais dois primers internos, Myco322s e Myco938as. Isso resultou em 4 cromatogramas para cada amostra aumentando a cobertura de sequenciamento.

### 3.7 Caracterização molecular e análise filogenética

O resultado do sequenciamento, os cromatogramas, foram analisados, editados e montados em “contigs” utilizando o programa CLC Main Worbench 23 (CLC Bio-Qiagen, Aarhus, Dinamarca). Em seguida, o algoritmo “Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn) foi utilizado para identificar seqüências similares na base de dados pública “National Center for Biotechnology Information” (ALTSCHUL et al., 1990).

A análise filogenética de micoplasmas hemotrópicos em pequenos roedores foi construída a partir de um banco de dados de 971pb do *16SrDNA* utilizando um total de 64 seqüências de *Mycoplasma* sp.. Doze seqüências foram obtidas neste estudo: *Mycoplasma* sp. em *Akodon cursor* (PP109114), em *Akodon montensis* (PP109112), *Akodon montensis* (PP109113), *Oligoryzomys nigripes* (PP109115), *Oligoryzomys nigripes* (PP109116), *Oligoryzomys nigripes* (PP109117), *Oligoryzomys nigripes* (PP109119), *Akodon paranaensis* (PP109118), *Akodon montensis* (PP109120), em *Akodon montensis* (PP109121), em *Akodon montensis* (PP109122), e em *Akodon montensis* (PP109123) (Tabela 2), e 52 seqüências adicionais de micoplasmas hemotrópicos foram selecionadas da literatura publicada e

pesquisadas usando o GenBank. Dentre as 52 sequências, 20 foram detectados em pequenos roedores silvestres (KT215637.1, KT215638.1, KT215636.1; AB758437.1, AB758436.1, KT215634.1, KT215633.1, KT215632.1, KT215631.1, KT215630.1, KT215623.1, KT215621.1, KT215620.1, KT215624.1, KT215625.1, KT215626.1, KT215629.1, KT215627.1, KT215628.1), oito em roedores sinantrópicos (KJ739312.1, KT215640.1, KT215639.1, KT215635.1, AB758435.1, KM258432.1, MN423261.1), duas em morcegos (KM538691.1, KM538692.1), três em ruminantes (EF616468.1, DQ641256.1, EU828581.1), duas em canídeos (EF416566.1, MK064160.1), cinco em felinos (DQ464424.1, DQ464422.1, MN543637.1, AF548631.1, KM275255.1), duas em humanos (GU562823.1, KF313922.1), uma em quatis (KU554425.1), duas em capivaras (FJ667773.1, FJ667774.1), duas em suínos (NR121759.1, AB610849.1), seis em primatas não humanos (KT314162.1, KT314161.1, KT314160.1, KT314163.1, AF338269.1, KT314165.1). A sequência utilizada como outgroup foi *Mycoplasma miroungirhinis* (NR 181869.1).

**Tabela 2.** Identificação de amostras de roedores capturadas nas regiões do Rio de Janeiro e Paraná, identificação da sequência no GenBank, hospedeiro, localização da amostra e tamanho do “contig” após sequenciamento.

ID Amostra	ID GenBank	Hospedeiro	Local de Origem	"Contig" (pb)
21504	PP109114	<i>Akodon cursor</i>	Nova Friburgo-RJ	1179
21506	PP109112	<i>Akodon montensis</i>	Nova Friburgo-RJ	1119
21514	PP109113	<i>Akodon montensis</i>	Nova Friburgo-RJ	1179
21568	PP109115	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Nova Friburgo-RJ	1061
22255	PP109116	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Nova Friburgo-RJ	938
22259	PP109117	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Nova Friburgo-RJ	1162
687	PP109119	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Ponta Grossa-PR	1179
745	PP109118	<i>Akodon paranaensis</i>	Ponta Grossa-PR	1179
23144	PP109120	<i>Akodon montensis</i>	Cruz Machado-PR	1179
23268	PP109121	<i>Akodon montensis</i>	Lidianópolis-PR	1166
23296	PP109122	<i>Akodon montensis</i>	Lidianópolis-PR	1179
23297	PP109123	<i>Akodon montensis</i>	Lidianópolis-PR	1179

Os contigs gerados neste estudo foram alinhados com amostras de micoplasmas hemotrópicos de várias espécies animais e de todo o mundo usando o método ClustalW. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o método de máxima verossimilhança. O melhor modelo evolutivo para o banco de sequências alinhadas foi Tamura-Nei + G (TAMURA, 1993) selecionado através do software jModelTest\_2.1.4 (DARRIBA et al., 2012). A combinação de grupos filogenéticos foi avaliada testando 1000 réplicas de “Bootstrap”. Um total de 971 posições foram analisadas ao final do conjunto de dados. As análises foram realizadas utilizando o software MEGAX (KUMAR et al., 2018).

A análise para criar a estimativa de divergência evolutiva a partir do alinhamento das sequências *16SrDNA* detectadas em roedores silvestres no presente estudo foi realizada utilizando o modelo de máxima verossimilhança composta (TAMURA et al., 2004). As análises evolutivas foram realizadas no software MEGA X (KUMAR et al., 2018).

### 3.8 Análise estatística

A frequência de positividade para micoplasmas hemotrópicos detectados molecularmente foi associada através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância com as variáveis inerentes ao animal, como gênero do hospedeiro (*Oligoryzomys*, *Oxymycterus*, *Akodon* e *Sooretamys*), sexo (macho e fêmea), presença de ectoparasitos (sim e não), e local de coleta, sendo estes os municípios de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro, e municípios de Ponta Grossa, Cruz Machado e Lidianópolis, estado do Paraná.

O teste de razão de prevalência (RP) foi utilizado para avaliar a probabilidade da presença de DNA de micoplasma hemotrópico em pequenos roedores em relação a variáveis específicas do animal, em nível de 5% de significância.

Os dados morfométricos de comprimento e largura dos cocos e cocobacilos sugestivos de micoplasma hemotrópico foram submetidos à análise descritiva de dados. Em seguida, a distribuição normal de cada parâmetro foi verificada pelo teste de normalidade Lilliefors. Para dados que seguiram distribuição normal, os valores médios obtidos de comprimento e largura dos cocos em relação a *Akodon* spp., *Oligoryzomys nigripes* e *Sooretamys angouya* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativos, foram analisados pelo pós-teste Tukey em nível de 5% de significância. Para os dados considerados não paramétricos, os valores médios obtidos foram submetidos ao teste Mann-Whitney, a 5% de significância, e quando significativo ao pós-teste Dunn. Os dados de média de comprimento e largura dos cocos também foram analisados segundo a região de estudo separada por estado, Rio de Janeiro e Paraná.

O cálculo de parasitemia foi realizado em 60 animais, onde a parasitemia foi considerada baixa quando foram observados entre 5 e 25 células parasitadas por bactérias sugestivas de *Mycoplasma* sp. por  $\mu\text{l}$  de sangue. De 26 a 3500 células parasitadas por  $\mu\text{l}$  de sangue foi classificado como parasitemia moderada a alta. A frequência de animais parasitados em parasitemia baixa ou moderada à alta foi confrontado frente a variável localidade (Rio de Janeiro, Paraná) e frente à identificação do hospedeiro (*Akodon* spp., *Oligoryzomys nigripes* e *Sooretamys angouya*) através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher em nível de 5% de significância.

Todas as análises estatísticas básicas foram realizadas no programa BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Detecção de micoplasma hemotrópico por exame citológico e molecular em pequenos mamíferos silvestres

Dentre as 257 amostras de pequenos mamíferos silvestres analisadas, 22,5% (n=58/257) apresentaram estruturas sugestivas de micoplasma hemotrópico em eritrócitos, através da investigação citológica. Em relação ao diagnóstico molecular, 33,8% (n=87/257) amplificaram o DNA de micoplasma hemotrópico na PCR convencional.

Dentre os 22,5% (n=58/257) animais positivos na citologia, ou seja, animais cuja lâmina continha formas sugestivas de micoplasma hemotrópico em eritrócitos, 60,3% (n=35/58) foram positivos também no ensaio de PCR convencional para micoplasma hemotrópico com alvo no *16srDNA*. Por outro lado, 20,2% (n=52/257) das amostras testaram positivas na PCR, porém foram consideradas negativas em análise citológica (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concordância entre os testes citológico e molecular no diagnóstico de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres coletados em regiões do estado do Paraná e Rio de Janeiro.

Diagnóstico citológico	Diagnóstico molecular		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	35	23	58
Negativo	52	147	200
Total	87	186	257

Em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, foram coletados 107 animais, sendo 33 animais coletados em novembro de 2019, 14 em março e abril de 2022, 53 animais coletados em julho de 2022, e sete em novembro de 2022. Esta foi a única localidade que houve coletas em diferentes meses do ano.

Dos 107 animais coletados em Nova Friburgo, em 23,3% (n=25/107) foi possível observar estruturas compatíveis com micoplasma hemotrópico em eritrócitos no exame citológico, sendo: *Akodon montensis* (n=10/44), *Akodon cursor* (n=8/28), *Oxymycterus quaestor* (n=3/15), *Oligoryzomys nigripes* (n=3/7) e *Sooretamys angouya* (n=1/1) (Tabela 4). Enquanto 30,8% (n=33/107) dos animais foram positivos para hemoplasmas no ensaio molecular, sendo: as espécies de roedores *Akodon montensis* (n=6/44), *Akodon cursor* (n=12/28) *Oxymycterus quaestor* (n=8/15), *Oligoryzomys nigripes* (n=6/7) e a espécie marsupial *Didelphis aurita* (n=1/5) (Tabela 4).

Na localidade de Cruz Machado, Paraná, foram coletados 52 roedores no mês de dezembro de 2021. Em 46,1% (n=24/52) destes foi possível observar estruturas sugestivas de micoplasma hemotrópico em exame citológico, sendo: *Sooretamys angouya* (n=8/11), *Rattus rattus* (n=2/2), *Oligoryzomys nigripes* (n=8/12) e *Akodon montensis* (n=6/26). Em relação a PCR, 46,1% (n=24/52) dos animais amplificaram DNA de micoplasma hemotrópico, sendo: *Akodon montensis* (n=12/26), *Oligoryzomys nigripes* (n=9/12), *Rattus rattus* (n=2/2) e *Sooretamys angouya* (n=1/11) (Tabela 4).

No município de Ponta Grossa, Paraná, dos 58 animais coletados no mês de agosto de 2019, 15,5% (n=9/58) apresentaram estruturas sugestivas de micoplasma hemotrópico em eritrócitos no esfregaço sanguíneo corado, sendo: *Oxymycterus nasutus* (n=2/5), *Oligoryzomys nigripes* (n=5/18), *Akodon paranaensis* (n=1/11) e *Euryoryzomys nasutus* (n=1/1). Enquanto que 46,55% (n=27/58) foram positivos para hemoplasmas no teste molecular, sendo: *Akodon montensis* (n=1/5), *Akodon paranaensis* (n=3/11), *Euryoryzomys*

*russatus* (n=1/4), *Necromys lasiurus* (n=1/2), *Oligoryzomys flavescens* (n=2/4), *Oligoryzomys nigripes* (n=16/18), *Oxymycterus nasutus* (n=2/5) e *Thaptomys nigrita* (n=1/2) (Tabela 4).

Em Lidianópolis, Paraná, 40 roedores foram capturados no mês de setembro de 2022. Todos os animais apresentaram-se negativos em lâmina de esfregaço sanguíneo corado, não apresentando nenhuma estrutura sugestiva de micoplasma hemotrópico. Entretanto, 12,5% (n=5/40) amplificaram o DNA de micoplasma hemotrópico por meio da técnica molecular, sendo todos identificados como *Akodon montensis* (5/30) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Número de pequenos mamíferos silvestres amostrados por localidade e espécie, e frequência de positividade para bactérias sugestivas de micoplasma hemotrópico, através de análise citológica e PCR baseada no *I6SrDNA*.

Família	Espécie por localidade	N	Positivos por PCR	Positivos por citologia
<b>Nova Friburgo</b>				
Cricetidae	<i>Akodon cursor</i>	28	12 (42,8%)	8 (28,5%)
	<i>Akodon montensis</i>	44	6 (13,6%)	10 (22,7%)
	<i>Delomys sublineatus</i>	1	0	0
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	7	6 (85,7%)	3 (42,8%)
	<i>Oxymycterus quaestor</i>	15	8 (53,3%)	3 (20,0%)
Muridae	<i>Sooretamys angouya</i>	1	0	1 (100,0%)
	<i>Rattus rattus</i>	5	0	0
Didelphidae	<i>Didelphis aurita</i>	5	1 (20,0%)	0
	<i>Monodelphis americana</i>	1	0	0
<b>TOTAL</b>		<b>107</b>	<b>33</b>	<b>25</b>
<b>Cruz Machado</b>				
Cricetidae	<i>Akodon montensis</i>	26	12 (46,1%)	6 (23,0%)
	<i>Sooretamys angouya</i>	11	1 (9,0%)	8 (72,7%)
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	12	9 (75,0%)	8 (66,6%)
Muridae	<i>Mus musculus</i>	1	0	0
	<i>Rattus rattus</i>	2	2 (100,0%)	2 (100,0%)
<b>TOTAL</b>		<b>52</b>	<b>24</b>	<b>24</b>
<b>Lidianópolis</b>				
Cricetidae	<i>Akodon montensis</i>	30	5 (16,6%)	0
	<i>Necromys lasiurus</i>	1	0	0
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	1	0	0
Muridae	<i>Mus musculus</i>	8	0	0
<b>TOTAL</b>		<b>40</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>Ponta Grossa</b>				
Cricetidae	<i>Akodon montensis</i>	5	1 (20,0%)	0
	<i>Akodon paranaensis</i>	11	3 (27,2%)	1 (9,0%)
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	4	1 (25,0%)	1 (25,0%)
	<i>Necromys lasiurus</i>	2	1 (50,0%)	0
	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	4	2 (50,0%)	0

**Tabela 4. Continuação**

	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	18	16 (88,8%)	5 (27,7%)
	<i>Oxymycterus nasutus</i>	5	2 (40,0%)	2 (40,0%)
Cricetidae	<i>Juliomys ossitenuis</i>	1	0	0
	<i>Nectomys squamipes</i>	1	0	0
	<i>Thaptomys nigrita</i>	2	1 (50,0%)	0
Didelphidae	<i>Philander quica</i>	5	0	0
	<b>TOTAL</b>	<b>58</b>	<b>27</b>	<b>9</b>

#### 4.2 Fatores associados à positividade por micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres, através da PCR baseada no *16SrDNA*

Das 230 amostras de roedores silvestres (Cricetidae), 36,52% (n=84) amplificaram DNA de micoplasma hemotrópico e foram a família com maior número de micoplasmas hemotrópicos positivos, seguida por roedores sinantrópicos (Muridae) (12,50%, n= 2/ 16) e marsupiais (Didelphidae) (9,09%, n= 1/11).

As regiões com maior frequência de positividade de pequenos mamíferos infectados com hemoplasmas foram Ponta Grossa (46,55%, n=27/58) e Cruz Machado (46,15%, n= 24/52), seguida por Nova Friburgo (30,84%, n=33/ 107) e Lidianópolis (12,50%, n=5/40) (Tabela 4). Comparados aos pequenos mamíferos de Lidianópolis, os animais capturados em Nova Friburgo tiveram 2,47 vezes (IC: 1,04 - 5,88) mais chances de testar positivo para hemoplasmas. Os animais de Cruz Machado tiveram 3,69 vezes (IC: 1,55 - 8,82) e os animais de Ponta Grossa tiveram 3,72 vezes (IC: 1,57 - 8,85) mais chances de apresentar DNA de micoplasma hemotrópico em comparação aos animais de Lidianópolis, respectivamente (Tabela 5).

Considerando os gêneros dos hospedeiros analisados, *Oligoryzomys* spp. apresentou o maior percentual de positividade para micoplasma hemotrópico (78,57%, n= 33/42), estatisticamente diferente de *Oxymycterus* spp. (40,00%, n=8/20), *Akodon* spp. (27,08%, n=39/144) e *Sooretamys* spp. (8,33%, n=1/12). Comparado aos animais do gênero *Sooretamys*, *Oligoryzomys* spp. tinham 9,43 vezes (IC: 1,43 – 62,99) mais chances de terem DNA de micoplasma hemotrópico (Tabela 5).

Quanto ao sexo dos animais infectados, 48,67% (n= 73/150) eram machos e 12,26% (n= 13/106) eram fêmeas. Foi observada diferença estatística entre o sexo masculino e a infecção por hemoplasma ( $p < 0,001$ ) (Tabela 4). No presente estudo, os homens tiveram 3,97 vezes (IC: 2,32 – 6,78) mais chances de apresentar DNA de micoplasma hemotrópico em comparação às mulheres (Tabela 5).

Quanto à presença ou ausência de ectoparasitas, 38,46% (n= 25/65) apresentavam ectoparasitas e 32,29% (n= 62/192) não apresentavam ectoparasitas. Não houve diferença estatística entre as duas variáveis ( $p=0,36$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise bivariada e razão de prevalência de *Mycoplasma* spp. em pequenos mamíferos selvagens por PCR com base no *16SrDNA* em função da área de estudo, táxon superior do hospedeiro, gênero do hospedeiro, gênero do hospedeiro e presença de ectoparasitas.

Variáveis	N	Positivoss (%)	Análise bivariada		RP	IC 95%	
			$\chi^2$	P			
<b>Área de estudo</b>							
Nova Friburgo-RJ	107	30,84	a	17,44	0,0024	2,47	1,04 - 5,88
Cruz Machado-PR	52	46,15	a				
Ponta Grossa-PR	58	46,55	a				
Lidianópolis-PR	40	12,5	b			a	
<b>Gênero do hospedeiro*</b>							
<i>Oligoryzomys</i> spp.	42	78,57	a	41,99	< 0,0001	9,43	1,43 - 62,99
<i>Oxymycterus</i> spp.	20	40,00	b				
<i>Akodon</i> spp.	144	27,08	b				
<i>Sooretamys</i> sp.	12	8,33	b			a	
<b>Sexo do hospedeiro**</b>							
Male	150	48,67	a	36,80	< 0,0001	3,97	2,32 - 6,78
Female	106	12,26	b			a	
<b>Presença de ectoparasitos</b>							
Sim	65	38,46	a	0,82	0,36	1,19	0,82 - 1,72
Não	192	32,29	a			a	

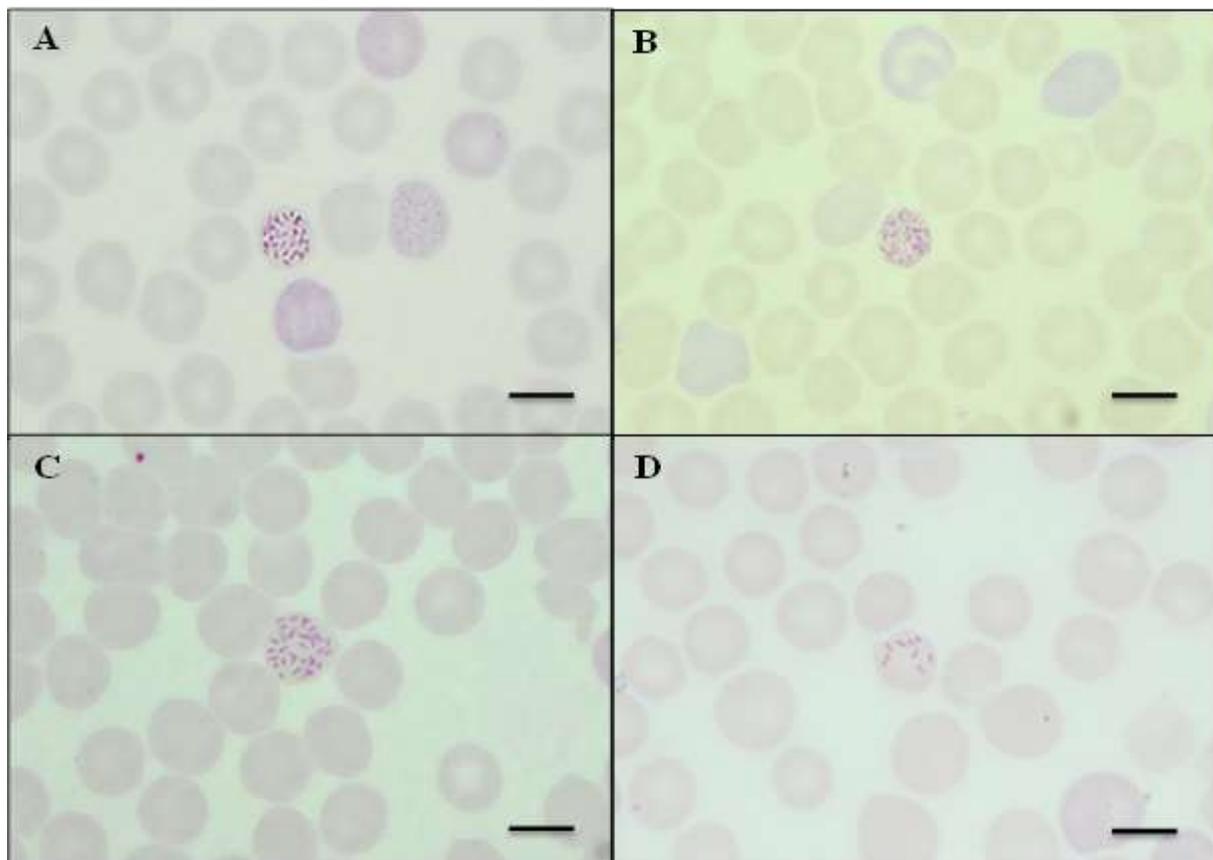
\*Apenas o gênero hospedeiro com amostra maior que 10 foi avaliado.

\*\*Não foi possível atingir o sexo de um pequeno mamífero amostrado.

O teste exato de Fisher foi utilizado nos grupos onde o N da variável resposta total foi menor que 30 ou onde a frequência observada foi menor que cinco. N: número de indivíduos. P: valor p. RP: razão de prevalência. a: Valor de referência para análise.

### 4.3 Análise morfológica e morfométrica de bactérias sugestivas de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres

Foi possível detectar a presença de estruturas basofílicas e cocóides sugestivas de micoplasma hemotrópico nas lâminas de esfregaço sanguíneo dos pequenos mamíferos silvestres. As bactérias apresentaram-se dispostas em cocos únicos, diplococos, agrupadas ou em cadeias (Figura 8) ao longo da superfície dos eritrócitos.



**Figura 9.** Bactérias dispostas em diplococos e em cadeia. A) *Oligoryzomys nigripes* B) *Akodon montensis* C) *Euryoryzomys russatus* D) *Oligoryzomys nigripes*. Coloração Giemsa. Barra de escala: 10 µm.

Com relação aos índices morfométricos avaliados de bactérias sugestivas de micoplasma hemotrópico foi possível realizar as medidas dos cocos em 16 animais do gênero *Akodon*, em 12 *Oligoryzomys nigripes*, em nove *Sooretamys angouya*, em dois *Oxymycterus nasutus*, e em um *Rattus rattus*. Após análise de variância confrontando o tamanho médio de comprimento e largura de cocos de micoplasma hemotrópico entre *Akodon* spp., *O. nigripes* e *S. angouya* foi observado que houve diferença estatística significativa na média de comprimento e largura entre *Mycoplasma* de *Akodon* spp. e o encontrado em *S. angouya*, sendo os cocos de *S. angouya* considerados maiores (Tabela 6).

**Tabela 6.** Dados morfométricos de comprimento médio e largura média dos cocos sugestivos de micoplasma hemotrópico em *Akodon* spp., *Oligoryzomys nigripes* e *Sooretamys angouya*. Dados de *Oxymycterus nasutus* e *Rattus rattus* não fizeram parte da análise devido ao baixo N amostrado.

Espécies	N	Média	DP	Valores limites		
				Mínimo	Máximo	
<b>Comprimento</b>						
<i>Akodon</i> spp.	16	0,404 a	0,015	0,382	0,429	
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	12	0,405 ab	0,021	0,379	0,452	
<i>Sooretamys angouya</i>	9	0,427 b	0,037	0,377	0,479	
<b>Largura</b>						
<i>Akodon</i> spp.	16	0,361 a	0,019	0,338	0,398	
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	12	0,369 ab	0,018	0,344	0,400	
<i>Sooretamys angouya</i>	9	0,392 b	0,035	0,341	0,427	

aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste ANOVA ou Kruskal-Wallis, a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). N: número de animais em que a morfometria foi realizada; DP: desvio padrão.

Comparando as médias de comprimento e largura dos cocos de *Mycoplasma* quanto à localidade, houve diferença estatística significativa entre as médias de largura dos cocos entre Rio de Janeiro e Paraná, sendo a largura dos cocos encontrados em animais do Paraná maiores estatisticamente (Tabela 7).

**Tabela 7.** Dados morfométricos de comprimento médio e largura média dos cocos sugestivos de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres coletados nos estados do Rio de Janeiro e Paraná.

Local	N	Média	DP	Valores limites	
				Mínimo	Máximo
<b>Comprimento</b>					
Rio de Janeiro	12	0,401 a	0,013	0,380	0,429
Paraná	28	0,415 a	0,029	0,377	0,479
<b>Largura</b>					
Rio de Janeiro	12	0,356 a	0,012	0,341	0,379
Paraná	28	0,378 b	0,028	0,338	0,427

aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste ANOVA, a 5% de significância ( $p < 0,05$ ). N: número de animais em que a morfometria foi realizada; DP: desvio padrão.

#### 4.4 Parasitemia de bactérias sugestivas de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres através da citologia

O cálculo de parasitemia foi realizado em 60 animais. Dentre estes, oito animais pertenciam a espécie *Akodon cursor*, 17 a *Akodon montensis*, um a *Akodon paranaensis*; um a *Euryoryzomys nasutus*, 17 a *Oligoryzomys nigripes*; três a *Oxymycterus quaestor*; dois a *Oxymycterus nasutus*; dois a *Rattus rattus* e nove a *Sooretamys angouya*. Espécies como *E. nasutus*, *O. quaestor*, *O. nasutus* e *R. rattus* não foram incluídos na análise estatística devido

ao baixo N amostral. Quando comparado a parasitemia entre *Akodon* spp., *O. nigripes* e *S. angouya*, não houve diferença estatística significativa entre eles. Entretanto, quando feita a associação entre a parasitemia e a localidade, foi possível observar diferença estatística significativa entre Rio de Janeiro e Paraná, sendo a parasitemia dos animais coletados no Paraná maior estatisticamente (Tabela 8).

**Tabela 8.** Número de animais cuja parasitemia foi considerada baixa ou moderada a alta por estado e espécie, comparados em análise bivariada por teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher a 5% de significância.

Variáveis	N	Parasitemia		% moderada a alta	
		Baixa	Moderada a Alta		
<b>Estados</b>					
Rio de Janeiro	25	19	6	24,00	a
Paraná	35	13	22	62,86	b
<b>Espécie</b>					
<i>Akodon</i> spp.	26	17	9	34,62	a
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	17	7	10	58,82	a
<i>Sooretamys angouya</i>	9	3	6	66,67	a

Foram consideradas Baixa parasitemia entre 5 e 25 eritrócitos parasitados por  $\mu$ l de sangue e moderada a alta, entre 26 e 3500. aValores seguidos de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente através do teste Exato de Fisher. N: número de animais em que a parasitemia foi possível ser calculada.

#### 4.5 Análise filogenética de micoplasma hemotrópico em pequenos mamíferos silvestres

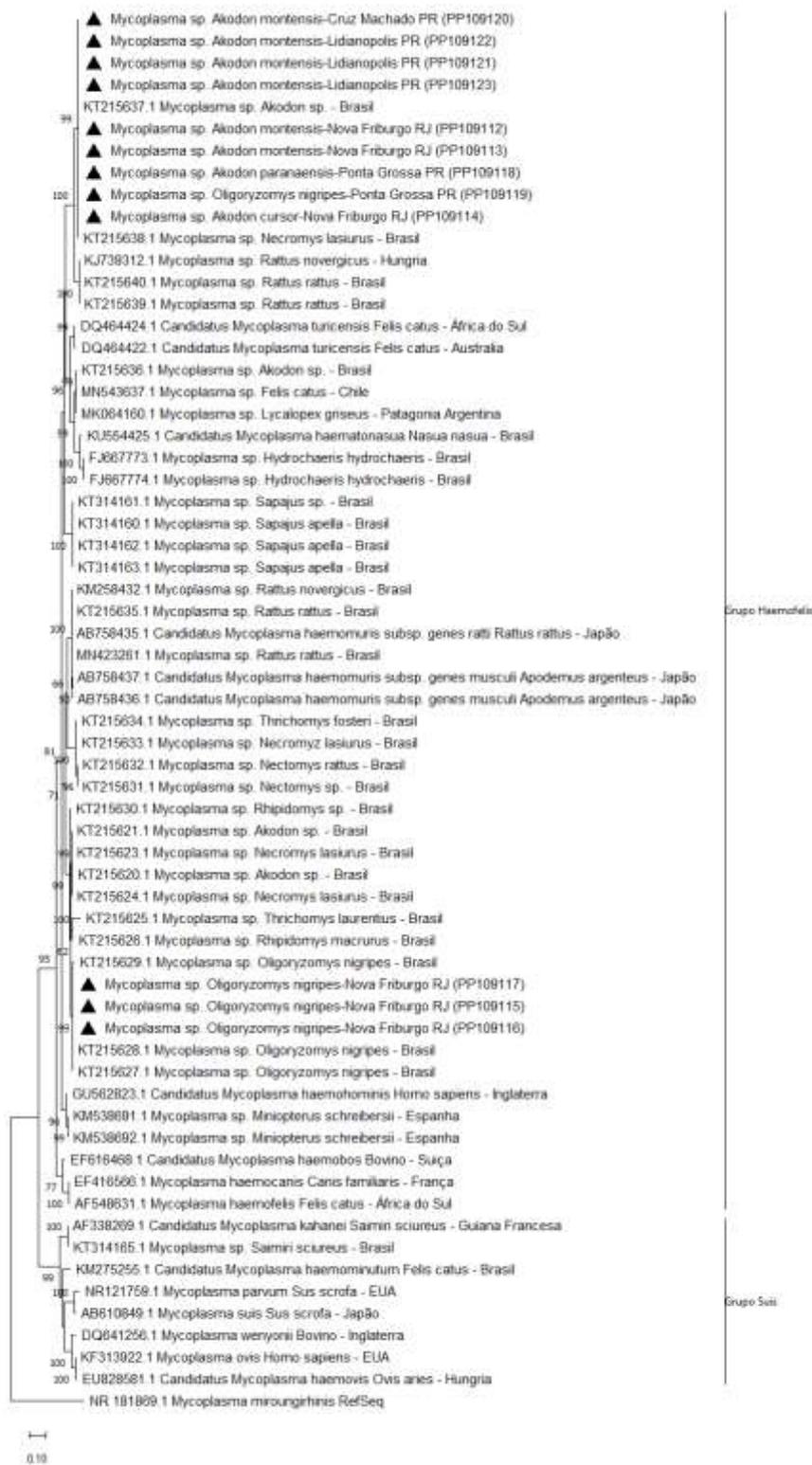
Com relação ao resultado de sequenciamento de fragmento do *16SrDNA* de micoplasma hemotrópico, seis amostras de pequenos roedores capturados em Nova Friburgo-RJ (sendo um da espécie *Akodon cursor* (PP109114), dois *Akodon montensis* (PP109112; PP109113) e três *Oligoryzomys nigripes* (PP109115; PP109116; PP109117)), duas amostras dos animais capturados em Ponta Grossa-PR (sendo um da espécie *Oligoryzomys nigripes* (PP109119) e um *Akodon paranaensis* (PP109118)), uma amostra de roedor capturado em Cruz Machado-PR (*Akodon montensis* (PP109120)), e três amostras de pequenos roedores capturados em Lidianópolis-PR (sendo as três pertencentes a espécie *Akodon montensis* (PP109121; PP109122; PP109123)), tiveram suas sequências com boa leitura no cromatograma. O maior percentual de similaridade Blast para PP109114 foi de 99,91% com amostra de *Necromys lasiurus* (KT215638.1), do Rio de Janeiro, Brasil; para PP109112 foi de 99,91% com amostra de *Akodon* sp. (KT215637.1), do Rio de Janeiro, Brasil; para PP109113 foi de 99,51% com amostra de *Akodon* sp. (KT215637.1), do Rio de Janeiro, Brasil; para PP109115 foi de 100% com amostra de *Oligoryzomys nigripes* (KT215627.1), de São Paulo, Brasil; para PP109116 foi de 100% com amostra de *Oligoryzomys nigripes* (KT215628.1), de Minas Gerais, Brasil; para PP109117 foi de 100% com amostra de *Oligoryzomys nigripes* (KT215627.1), de São Paulo, Brasil; para PP109119 foi de 98,31% com amostra de *Necromys lasiurus* (KT215638.1), do Rio de Janeiro, Brasil; para PP109118 foi de 99,22% com amostra de *Necromys lasiurus* (KT215638.1), do Rio de Janeiro, Brasil; para PP109120 foi de 98,98% com amostra de *Necromys lasiurus* (KT215638.1), do Rio de Janeiro, Brasil; para PP109121 foi de 99,63% com amostra de *Akodon* sp. (KT215637.1), do Rio de Janeiro, Brasil; para PP109122 foi de 98,99% com amostra de *Necromys lasiurus* (KT215638.1), do Rio de

Janeiro, Brasil; para PP109123 foi de 99,39% com amostra de *Akodon* sp. (KT215637.1), do Rio de Janeiro, Brasil (Tabela 9).

**Tabela 9.** Percentual de similaridade blast do sequenciamento baseado no *16SrDNA* de amostras positivas para micoplasma hemotrópico de roedores silvestres dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.

ID Amostra	ID GenBank	Maior similaridade Blast	Local de Origem	Percentual de Identidade	Query Coverage	Referência
21504	PP109114	<i>Necromys lasiurus</i> (KT215638.1)	RJ	99,91%	93%	Gonçalves et al., 2015
21506	PP109112	<i>Akodon</i> sp. (KT215637.1)	RJ	99,91%	96%	Gonçalves et al., 2015
21514	PP109113	<i>Akodon</i> sp. (KT215637.1)	RJ	99,51%	93%	Gonçalves et al., 2015
21568	PP109115	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (KT215627.1)	SP	100%	99%	Gonçalves et al., 2015
22255	PP109116	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (KT215628.1)	MG	100%	100%	Gonçalves et al., 2015
22259	PP109117	<i>Oligoryzomys nigripes</i> (KT215627.1)	SP	100%	99%	Gonçalves et al., 2015
687	PP109119	<i>Necromys lasiurus</i> (KT215638.1)	RJ	98,31%	90%	Gonçalves et al., 2015
745	PP109118	<i>Necromys lasiurus</i> (KT215638.1)	RJ	99,22%	90%	Gonçalves et al., 2015
23144	PP109120	<i>Necromys lasiurus</i> (KT215638.1)	RJ	98,98%	93%	Gonçalves et al., 2015
23268	PP109121	<i>Akodon</i> sp. (KT215637.1)	RJ	99,63%	92%	Gonçalves et al., 2015
23296	PP109122	<i>Necromys lasiurus</i> (KT215638.1)	RJ	98,99%	90%	Gonçalves et al., 2015
23297	PP109123	<i>Akodon</i> sp. (KT215637.1)	RJ	99,39%	92%	Gonçalves et al., 2015

A análise filogenética de um alinhamento de aproximadamente 971pb do gene *16SrDNA* posicionou as 12 sequências oriundas de pequenos roedores obtidas no presente estudo dentro do grande “grupo haemofelis”. Nove sequências (PP109120; PP109122; PP109121; PP109123; PP109112; PP109113; PP109118; PP109119; PP109114) foram posicionadas em um ramo com alto valor de Bootstrap (100%) junto com outras sequências de hemoplasmas detectados previamente em pequenos roedores silvestres (*Akodon* sp., *Necromys lasiurus*) e roedores sinantrópicos (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*) do Brasil e Hungria. As outras três sequências (PP109117; PP109115; PP109116) foram posicionadas em um ramo com alto valor de Bootstrap (99%) junto com outras três sequências de hemoplasmas detectados previamente em pequenos roedores silvestres (*Oligoryzomys nigripes*) do Brasil (Figura 9).



**Figura 10.** Árvore filogenética de micoplasmas hemotrópicos com a probabilidade mais alta, inferida usando o método de Máxima Verossimilhança. Esta análise envolveu 64 sequências de nucleotídeos, com um dataset final de 971 posições. As análises evolutivas foram realizadas no MEGAX. Somente bootstraps acima de 50% estão demonstrados na imagem.

A estimativa de divergência evolutiva demonstrou uma distância de 0,05 à 0,08 entre as 12 sequências deste estudo com as duas sequências de *Mycoplasma haemomuris* detectadas em *Apodemus argenteus* (AB758436.1; AB758437.1) (ANEXO I).

## 5 DISCUSSÃO

Os hemoplasmas são encontrados em diversas espécies animais em todo o mundo (MILLÁN et al., 2021), porém seus registros em pequenos mamíferos não voadores no Brasil são escassos (CONRADO et al., 2015; DE SOUZA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2015; DE SOUZA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2015; GONÇALVES et al., 2020; PONTAROLO et al., 2021). Este estudo descreve a prevalência de positividade e diversidade genética de hemoplasmas e representa o primeiro relato de fatores associados à infecção por micoplasma hemotrópico em roedores silvestres no Brasil.

Esfregaços de sangue corados são considerados uma ferramenta inicial para a detecção citológico de micoplasma hemotrópico. O método mais amplamente aceito e revisado para o diagnóstico citológico de micoplasma hemotrópico é a técnica de coloração com corantes do tipo Romanowsky, como por exemplo o Giemsa (NEIMARK et al., 2001). Embora o exame citológico de microrganismos, por ser simples e acessível, ainda seja amplamente utilizado, sabe-se que ele apresenta baixa sensibilidade diagnóstica, visto que é dependente da parasitemia do agente. Neste estudo foi possível observar um percentual de positividade inferior no diagnóstico citológico em detrimento do molecular, concordando com relatos anteriores que também demonstraram a falta de concordância entre os resultados da microscopia e da PCR, sugerindo que a microscopia tende a resultados mais falso negativos (CONRADO et al., 2015; TASKER et al., 2010). Por outro lado, Méndez et al. (2022) encontraram correlação significativa ( $p < 0,01$ ) entre o diagnóstico por PCR e o exame citológico de micoplasma hemotrópico felino, onde a positividade para *M. haemofelis* através do esfregaço sanguíneo corado com Giemsa foi de 80,7% ( $n=84/104$ ), sendo igual a PCR (80,7%,  $n=84/104$ ), enquanto na coloração de Wright foi de 81,7% (85/104), demonstrando que a investigação citológica é um teste de alto valor diagnóstico. Entretanto, cabe ressaltar que um diagnóstico citológico falso positivo pode surgir devido a problemas metodológicos como a precipitação do corante nas lâminas resultando em manchas ou pontos dispersos no esfregaço sanguíneo; ou devido a erros cometidos pelo observador patologista, como a identificação de *Mycoplasma* spp. em eritrócitos quando na verdade são corpúsculos de Howell-Jolly (fragmentos remanescentes de material nuclear derivados da desintegração do núcleo dos eritroblasto), ou pontilhados basofílicos (pequenas inclusões contendo RNA, os quais apresentam-se arredondados, pequenos e basofílicos no interior dos eritrócitos.) (THRALL, 2014). Ainda, o observador pode confundir *Mycoplasma* spp. com outras espécies infectantes; ou devido às peculiaridades da infecção hemoplasmática (DEMKIN & KAZAKOV, 2021).

Atualmente, a amplificação e sequenciamento do gene *16SrDNA* de patógenos do gênero *Mycoplasma* é o padrão ouro para detecção desses organismos (CONRADO et al., 2015; RETIEF et al., 2022). A utilização da PCR convencional é considerada o método diagnóstico definitivo para detecção e identificação de *Mycoplasma* spp. devido à sua alta sensibilidade quando devidamente padronizado (MESSICK et al., 1998). Porém, na vida selvagem, deve-se considerar a elevada diversidade animal associada à possibilidade de variação genética entre espécies de *Mycoplasma*, o que pode levar a resultados falsos negativos na PCR devido à falta de universalidade dos primers utilizados (VOLOKHOV et al., 2017).

A porcentagem de *Mycoplasma* spp. a positividade entre diferentes espécies de mamíferos amostradas em todo o mundo é altamente variável, variando de 0% a 87,5% (DE SOUZA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2020; GONÇALVES et al., 2015; MASSINI et al., 2019; MILLÁN et al., 2021; PONTAROLO et al., 2020; SOUZA et al., 2019). Neste estudo, 33,8% dos animais, entre pequenos mamíferos não voadores, amplificaram um fragmento de *16SrDNA* de *Mycoplasma* spp. por PCR convencional. Contudo, é importante notar que

apesar da boa sensibilidade dos métodos moleculares, os animais cronicamente infectados podem apresentar resultados falsos negativos devido ao baixo número de microrganismos circulantes. Além disso, a amostra biológica utilizada para o ensaio de PCR também deve ser considerada na interpretação dos resultados, principalmente quando são feitas comparações, por exemplo, entre espécies hospedeiras e habitats (CONRADO et al., 2015; LAPPIN et al., 2009).

Outros estudos que realizaram o diagnóstico de micoplasma hemotrópico por PCR, utilizaram DNA extraído de sangue (CONRADO et al., 2015) ou amostras de baço (GONÇALVES et al., 2015). No entanto, um estudo realizado na província de Gauteng, na África do Sul, utilizou DNA extraído de amostras de rim e swab bucal para o diagnóstico de hemoplasmose em roedores (RETIEF et al., 2022). Este estudo utilizou DNA extraído de amostras de fígado, mesmo tipo de amostra utilizadas por Koneval et al. (2017) para detecção molecular de hemoplasma em raposas. O fígado é um órgão parenquimatoso e apresenta várias funções essenciais para o funcionamento do organismo, como por exemplo a hemocaterese, onde em conjunto com o baço realizam a destruição de hemácias envelhecidas e hemácias parasitadas por fagocitose (TRHALL, 2014). Além disso, ainda pode haver a multiplicação de agentes infecciosos em células hepáticas, induzindo a hepatomegalia, como ocorre no curso típico de *Ehrlichia canis* (SOUZA et al., 2010). Embora a maioria dos estudos voltados para o curso típico da infecção por hemoplasma seja realizado em animais domésticos, especialmente em felinos, sabe-se que flutuações na parasitemia podem acontecer por sequestro e subsequente liberação dos agentes através de órgãos como baço, fígado ou pulmões (TASKER et al., 2010).

Contudo, a eficiência de protocolos de PCR publicados para detecção de hemoplasma não é igual para todos os órgãos ou tecidos, e as cargas de hemoplasma nos tecidos são inversamente associadas ao tempo desde a infecção. Koneval et al. (2017) detectaram DNA de micoplasma hemotrópico em quatro de nove amostras de sangue de raposa, mas apenas em quatro de 49 amostras de fígado e cinco de 242 amostras de baço. Em contraste, Hornok et al. (2018) encontraram maior prevalência de micoplasma hemotrópico em baço de veados em comparação com amostras de sangue. Apesar da amostra poder influenciar a prevalência geral de hemoplasma detectado em uma população, visto que estes agentes são encontrados parasitando exclusivamente eritrócitos, a identificação do agente em diferentes tipos de amostras biológicas, como tecido esplênico e hepático, indica a presença destes hemoplasmas em diferentes órgãos e pode revelar informações sobre a diversidade deste microrganismo nas espécies hospedeiras.

A ocorrência de hemoplasmas tem sido atribuída a diferentes fatores biológicos em estudos utilizando outras espécies, como animais de vida livre *versus* animais em cativeiros cativos, no qual a prevalência de hemoplasma é significativamente maior em animais de vida livre do que em animais cativos (VIEIRA et al., 2009; WILLI et al., 2007); tipos de habitat, por exemplo, locais antropizados *vs* locais não antropizados, no qual animais em locais não antropizados apresentam maiores chances de infecção quando comparado a animais localizados em ambientes urbanos (GONÇALVES et al., 2020; SACRISTÁN et al. 2019; VOLOKHOV et al., 2017); comportamento gregário dos hospedeiros, no qual animais com maiores interações sociais apresentam grande chance de infecção por micoplasma (DE SOUZA et al., 2017); e idade, no qual animais adultos apresentam maiores chances de infecção por hemoplasma (PERSICHETTI et al., 2018). Neste estudo os fatores associados à positividade por hemoplasmas em pequenos mamíferos silvestres foi analisado em função do sexo do hospedeiro, região de estudo, gênero do hospedeiro, e presença de ectoparasitos.

Em relação ao sexo dos pequenos mamíferos, os machos tiveram maior frequência de positividade para hemoplasmas do que as fêmeas ( $p < 0,001$ ). Este achado pode estar relacionado ao comportamento dos machos, que podem apresentar agressividade por

dominância e busca ativa por fêmeas, se locomovendo mais (BONATTO et al., 2013). Acredita-se que durante o contato direto, dentre interações sociais ou agressivas, entre os hospedeiros infectados e não infectados, os hemoplasmas possam ser transmitidos (MILLÁN et al., 2021). Vieses sexuais na infecção por hemoplasma também foram observados em vários táxons de mamíferos. Guaxinins machos tiveram maior prevalência de hemoplasmas do que fêmeas nos EUA (VOLOKHOV et al., 2017). Em uma população diversificada de morcegos neotropicais em Belize, os machos também apresentaram maiores chances de infecção (BECKER et al., 2020). Porém, estes achados diferem dos encontrados em outros estudos realizados com pequenos mamíferos, em que a infecção por hemoplasmas não foi associada ao sexo destes animais (CONRADO et al., 2015; COHEN et al., 2018; RETIEF et al., 2022; SASHIDA et al., 2013). Da mesma forma, Hoelzle et al. (2010), Sacristán et al. (2019) e Di Cataldo et al. (2020) não encontraram diferença na positividade para hemoplasmas entre machos e fêmeas de javalis, felinos selvagens e raposas, respectivamente, sugerindo que a associação do sexo com a positividade por hemoplasma podem variar entre táxons de mamíferos.

A ocorrência de hemoplasmas entre roedores no bioma Mata Atlântica foi relatada por Gonçalves e colaboradores (2015), com percentual de 26,2% (n=38/145). Este dado corrobora com os resultados do presente estudo. Quando as regiões de estudo foram analisadas separadamente, não foi encontrada diferença estatística na ocorrência de *Mycoplasma* spp. em animais capturados nos municípios de Ponta Grossa, Cruz Machado e Nova Friburgo. A área de estudo em Ponta Grossa representa a única área protegida neste estudo, sendo um Parque Nacional. Apesar de ser um Parque Nacional, é uma área protegida não regulamentada que sofre impactos diretos da pecuária, comércio de pinus, plantações de eucalipto e culturas de soja e milho em seu território. A monocultura de cereais nas proximidades do Parque Nacional tem um efeito positivo no crescimento da população de pequenos mamíferos e na taxa de positividade para *Mycoplasma* nesta população. Esta questão é reforçada por estudos anteriores de Gonçalves et al. (2020), Sacristán et al. (2019) e Volokhov et al. (2017), segundo o qual animais de ambientes não afetados pela atividade humana têm maior probabilidade de serem infectados por hemoplasmas do que animais de ambientes antropogênicos devido à reduzida abundância de espécies e ao comportamento menos agressivo como resultado da disponibilidade de alimentos.

O município de Lidianópolis apresenta a menor prevalência de animais com positividade para *Mycoplasma*. Esta região é apresentada por grandes áreas de pastagem e menos áreas remanescentes naturais em comparação com outras localidades (projeto MapBiomias, <http://www.mapbiomas.org/>), o que afeta diretamente a fauna e a flora locais, reduzindo a diversidade e abundância de espécies hospedeiras e vetores, bem como a disponibilidade de alimentos. Isto, por sua vez, pode levar a um baixo níveis de *Mycoplasma* spp. em animais desta região.

Quanto ao táxon do hospedeiro, Cricetidae foi a família em que mais foi detectado micoplasmas hemotrópicos (36,52%, n=84/230) neste estudo. Do ponto de vista epidemiológico, os roedores são considerados um dos grupos de hospedeiros mais importantes quando se considera a possibilidade deles se comportarem como reservatórios de microrganismos transmitidos (BARROS-BATTESTI, 2008). O fato do gênero *Oligoryzomys* apresentar maior percentual de positividade para *Mycoplasma* spp. (78,05%, n= 32/41), justifica a maior prevalência de hemoplasma nesta família de roedores. As espécies do gênero *Oligoryzomys* são as mais abundantes em estudos realizados em áreas associadas ao bioma Mata Atlântica, principalmente por apresentarem comportamento oportunista (REIS, 2020; WEKSLER & BONVICINO, 2015). Graça et al. (2020) relataram alta ocorrência de ectoparasitos associados às espécies deste gênero, e muitos autores acreditam que os ectoparasitos desempenham um importante papel na disseminação de agentes do gênero

*Mycoplasma*, o que pode contribuir para alta frequência de positividade.

As rotas de transmissão de hemoplasma permanecem pouco compreendidas (COHEN et al., 2018; MILLÁN et al., 2021). Tradicionalmente, os vetores ectoparasitos têm sido considerados a principal via de transmissão de hemoplasma (GONÇALVES et al., 2015; HORNOK et al., 2015). Este estudo só obteve informações sobre a presença ou ausência de ectoparasitos nos pequenos mamíferos capturados, não havendo diferença estatística significativa entre estas duas variáveis, sendo este um limitante para uma análise e discussão mais fundamentada. Estudos anteriores relataram divergências na condição de infecção por micoplasma hemotrópico entre ectoparasitos e suas espécies hospedeiras (COHEN et al., 2018; DE SOUSA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2020; MILLÁN et al., 2019; SACRISTÁN et al., 2019).

Durante a análise morfológica, foi possível observar as bactérias dispostas em cocos únicos, diplococos, agrupadas ou em cadeias ao longo da superfície dos eritrócitos, corroborando com a literatura (TANAKA et al., 1965). De acordo com Tasker et al. (2003), não é possível diferenciar as espécies infectantes de micoplasmas através da investigação citológica por microscopia óptica. Entretanto, a partir de dados morfométricos encontrados no atual estudo foi observado diferença estatística significativa na média de comprimento e largura entre *Mycoplasma* de *Akodon* spp. e o encontrado em *S. angouya*, sendo os cocos de *S. angouya* considerados maiores, suscitando a possibilidade de haver parasitismo por diferentes espécies de hemoplasmas entre os roedores. Além disso, a possibilidade da presença de microrganismos morfológicamente semelhantes, como por exemplo, as bactérias do gênero *Bartonella*, não pode ser descartada. Para avançar nos estudos, é preciso confrontar estas informações com os dados filogenéticos oriundos de amostras de sangue desses animais, que ainda não foram realizados.

Os agrupamentos formados na análise filogenética corroboraram os resultados obtidos pelo BLASTn pois as sequências de *Mycoplasma* obtidas de *Akodon paranaensis* (PP109118-Ponta Grossa-PR), *Oligoryzomys nigripes* (PP109119-Ponta Grossa-PR), *Akodon cursor* (PP109114-Nova Friburgo-RJ), *Akodon montensis* (PP109112; PP109113-Nova Friburgo-RJ), *Akodon montensis* (PP109122; PP109121; PP109123-Lidianópolis-PR), *Akodon montensis* (PP109120-Cruz Machado-PR) deste estudo formaram um clado com as sequências de hemoplasma de pequenos roedores previamente depositadas de *Akodon* sp. e *Rattus rattus* do Brasil (GONÇALVES et al., 2015). Enquanto as sequências de *Mycoplasma* de *Oligoryzomys nigripes* (PP109117; PP109115; PP109116-Nova Friburgo-RJ) estiveram agrupadas em mesmo clado que as sequências de hemoplasmas previamente depositadas de *Oligoryzomys nigripes* do Brasil (GONÇALVES et al., 2015). Além disso, estiveram agrupados em clado próximo com *Thrichomys laurentius* e *Rhipidomys macrurus* do Brasil (GONÇALVES et al., 2015). Apesar do alto valor de percentual de identidade encontrada entre as sequências deste estudo com as sequências depositadas por Gonçalves et al. (2015), os pesquisadores não encontraram uma grande identidade (85-96%) entre as sequências amplificadas de amostras de baço de roedores silvestres com as recuperadas do banco de dados GenBank. Isto, aliado à análise de máxima verossimilhança, suportada por alto valor de Bootstrap, e a análise de divergência evolutiva do presente estudo, indicam que há um alto grau de diversidade genética entre os micoplasmas hemotrópicos que infectam roedores silvestres, sugerindo a possível ocorrência de outros hemoplasmas nestes animais do Brasil, mesmo que *Mycoplasma haemomuris* seja a espécie mais relatada no mundo.

Em outros estudos filogenéticos de micoplasmas hemotrópicos é frequente a observação de baixos valores de Bootstrap, resultando em ramos pouco suportados. No entanto, deve-se levar em consideração que as informações genéticas das bactérias estão organizadas no genoma nos chamados operons de *rRNA*, as quais podem apresentar de um a 14 operons de *rRNA* diferentes. Foi relatado que os micoplasmas apresentam um ou dois e,

em alguns casos, até três operons. A presença de mais de um operon de *rRNA* pode resultar em polimorfismos entre os genes *16SrDNA*, e caso o polimorfismo não seja identificado, pequenas diferenças na sequência podem afetar a topologia da árvore filogenética. É necessário que os operons sejam analisados e comparados nas sequências (são reconhecidos como picos duplos no cromatograma) quando as mesmas forem utilizadas para construção de árvore filogenética para espécies intimamente relacionadas (BASCUNANA et al., 1994; JOHANSSON et al., 1998). A clonagem dos produtos de PCR oriundos destas amostras pode ser interessante neste aspecto, e está incluído nas perspectivas futuras e desdobramentos deste estudo.

## 6 CONCLUSÕES

Conclui-se neste estudo que o diagnóstico citológico e o molecular apresentam divergências, sendo o diagnóstico citológico com menor sensibilidade. O presente estudo relata uma prevalência significativa de micoplasma hemotrópico em pequenos roedores não voadores no Rio de Janeiro e no Paraná. Animais provenientes dos municípios de Ponta Grossa e Cruz Machado, Paraná, machos, do gênero *Olygoryzomys* apresentam maior risco de serem infectados por micoplasma hemotrópico. Os índices morfométricos e conformação dos cocos nos eritrócitos podem ser um indicativo de diferentes espécies de *Mycoplasma* parasitando a população de pequenos mamíferos silvestres amostrada. Os sequenciamentos e análise filogenética de *Mycoplasma* dos pequenos roedores silvestres capturados no Rio de Janeiro e no Paraná, indicam a existência de um alto grau de diversidade genética entre micoplasmas hemotrópicos que infectam roedores silvestres, indicando a circulação de novas espécies de hemoplasmas em roedores.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento, este estudo é o primeiro a apresentar dados morfológicos e morfométricos, assim como a parasitemia de estruturas compatíveis com micoplasmas hemotrópicos em pequenos mamíferos não voadores. Durante a análise morfológica, foi possível observar as bactérias dispostas em cocos únicos, diplococos, agrupadas ou em cadeias ao longo da superfície dos eritrócitos. Em relação a morfometria, foi observado diferença estatística significativa na média de comprimento e largura entre *Mycoplasma* de *Akodon* spp. e o encontrado em *S. angouya*, sendo os cocos de *S. angouya* considerados maiores. Curiosamente, isto pode ser um indicativo de parasitismo por diferentes espécies de bactérias epicelulares entre *Akodon* spp. e *S. angouya*, demonstrando a importância do estudo morfométrico de bactérias epicelulares como suporte para identificação taxonômica de hemoparasitos a nível de espécie. Entretanto, essa possibilidade só pode ser comprovada através da análise filogenética de amostras de sangue, o que não foi realizado neste estudo, e do diagnóstico diferencial dessas bactérias observadas com outras, como por exemplo, as do gênero *Bartonella*.

A frequência de positividade para *Mycoplasma* em pequenos mamíferos silvestres nas regiões estudadas esteve muito associada ao sexo, indicando os machos como maior risco de parasitismo por hemoplasmas.

A análise filogenética de *Mycoplasma* dos pequenos roedores silvestres capturados no Rio de Janeiro e no Paraná, indica a circulação de novas espécies e aponta que há muito ainda a ser descoberto sobre as espécies de hemoplasmas hemotrópicos que parasitam pequenos mamíferos silvestres no Brasil.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, M.; NUSSENZWEIG, R. Fine Structure of *Hoemobartonella* sp. in the Squirrel Monkey. **The Journal of Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 628-630, 1972.

ALABÍ, A. S.; MONTI, G.; OTTH, C.; SEPÚLVEDA-GARCIA, P.; SANCHEZ-HIDALGO, M.; DE MELLO, V. V. C.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; BITTENCOURT, P.; MULLER, A. Molecular survey and genetic diversity of hemoplasmas in rodents from Chile. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1493, 2020.

ALSARRAF, M.; MOHALLAL, E.M.E.; MIERZEWSKA, E.J.; BEHNKE-BOROWCZYK, J.; WELC-FALECIAK, R.; BEDNARSKA, M.; DZIEWIT, L.; ZALAT, S.; GILBERT, F.; BEHNKE, J.M.; BAJER, A. Description of *Candidatus Bartonella fadhilae* n. sp. and *Candidatus Bartonella sanaae* n. sp. (Bartonellaceae) from *Dipodillus dasyurus* and *Sekeetamys calurus* (Gerbillinae) from the Sinai Massif (Egypt). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 7, p. 483-494, 2017.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, T. B.; FAGGION, S. A.; SANTOS, E. V.; ROBERTO, P. G.; FRANÇA, S. C.; FACHIN, A. L.; MARINS, M. Real-time PCR-based study of haemotrophic mycoplasmas in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, n. 2, p. 333-336, 2014.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; ALLEGRETTI, S. M.; MACHADO, R. Z. Hemoplasmas in wild canids and felids in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 42, n. 2, p. 342-347, 2011.

ANDRÉ, M. R.; DENARDI, N. C. B.; SOUSA, K. C. M.; GONÇALVES, L. R.; HENRIQUE, P. C.; ONTIVERO, C. R. G. R.; GONZALEZ, I. H. L.; NERY, C. V. C.; CHAGAS, C. R. F.; MONTICELLI, C.; SANTIS, A. C. G. A.; MACHADO, R. Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 545-551, 2014.

AYRES, M.; AYRES, J. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. D. A. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. **Instituto Mamirauá**, Belém, v. 364, 2007.

BARROS-BATTESTI, D. M. Biodiversidade de ectoparasitos de pequenos mamíferos e aves silvestres em biomas preservados e degradados no estado do Paraná. **Relatório para o Instituto Ambiental do Paraná (IAP)**, p. 54, 2008.

BASCUNANA, C. R.; MATTSSON, G. J.; BOLSKE, G.; JOHANSSON, K. E. Characterization of the *16SrRNA* genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 9, p. 2577-2586, 1994.

BRAGA, M.S.C.O.; PEREIRA, J.G.; FERNANDES, S.J.; MARQUES, I.C.L. JESUS, R.P.; FERREIRA, G.S.; XAVIER, D.R. BENEVENUTE, J.L.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.

Molecular detection of Anaplasmataceae agents in *Dasyprocta azarae* in northeastern Brazil. **Braz.J.Vet. Parasitol.**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.98-104, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 112 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos. ISBN 85-334-0974-5.

BECKER, D.; SPEER, K.; BROWN, A.; FENTON, B.; WASHBURNE, A.; ALTIZER, S.; STREICKER, D.; PLOLWRIGHT, R.; CHIZHIKOV, V.; SIMMONS, N.; VOLOKHOV, D. Ecological and evolutionary drivers of haemoplasma infection and bacterial genotype sharing in a Neotropical bat community. **Molecular ecology**, v. 29, n. 8, p. 1534-1549, 2020.

BERNAL, M. K. M.; CHIANG, J. O.; MENDES, F. F.; ANDRADE, S. L. D. S.; SILVA, S. K. S. M. D.; PEREIRA, W. L. A. Study of Arboviruses in *Philander opossum*, *Didelphis marsupialis* and *Nectomys rattus* captured from forest fragments in the municipality of Belém, Pará, Brazil. **Ciência Rural**, v. 51, 2021.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). **Infection and immunity**, v. 71, n. 6, p. 3657-3662, 2003.

BERKENKAMP, S. D.; WESCOTT, R. B. Arthropod transmission of *Eperythrozoon coccoides* in mice. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 398-401, 1988.

BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; VIEIRA, R. F. C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D. B. M.; ALMOSNY, N. R. P.; MOLENTO, M. B.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H. A.; GONÁLEZ, F. H. D.; MESSICK, J. B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 1-7, 2009.

BONATTO, F.; CODA, J.; GOMEZ, D.; PRIOTTO, J.; STEINMANN, A. Inter-male aggression with regard to polygynous mating system in Pampean grassland mouse, *Akodon azarae* (Cricetidae: Sigmodontinae). **Journal of Ethology**, v. 31, p. 223-231, 2013.

BONATO, L.; FIGUEIREDO, M. A. P.; GONÇALVES, L. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Occurrence and molecular characterization of *Bartonella spp.* and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 42, p. 15-20, 2015.

CABELLO, J.; ALTET, L.; NAPOLITANO, C.; SASTRE, N.; HIDALGO, E.; DÁVILA, J. A.; MILLÁN, J. Survey of infectious agents in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*): high prevalence and diversity of hemotrophic mycoplasmas. **Veterinary microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 448-454, 2013.

CARDOSO, R. M.; DE ARA, N. N. S. L.; ROMERO, G. A. S. Expanding the knowledge about *Leishmania* species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2015.

CARNEIRO, F. T.; SCALON, M. C.; AMORIM, G.; SILVA, W. A. C.; HONORATO, S. M.; PEREIRA, F. M. A. M.; SILVA, L. H. R.; AQUINO, L. C.; PALUDO, G. R. Hemoplasma

infection in wild captive carnivores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, p. 293-299, 2020.

COHEN, C.; SHEMESH, M.; GARRIDO, M.; MESSIKA, I.; EINAV, M.; KHOKHLOVA, I.; TASKER, S.; HAWLENA, H. Haemoplasmas in wild rodents: Routes of transmission and infection dynamics. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 18, p. 3714-3726, 2018.

CONRADO, F. D. O.; DO NASCIMENTO, N. C.; DOS SANTOS, A. P.; ZIMPEL, C. K.; MESSICK, J. B.; BIONDO, A. W. Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two Brazilian zoos. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2015.

CUBILLA, M.; SANTOS, L.; DE MORAES, W., CUBAS, Z.; LEUTENEGGER, C.; ESTRADA, M.; BIONDO, A. Microscopic and molecular identification of hemotropic mycoplasmas in South American coatis (*Nasua nasua*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 53, p. 19–25, 2017a.

CUBILLA, M. P.; SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; LEUTENEGGER, C. M.; ESTRADA, M.; VIEIRA, R. F. C.; SOARES, M. J.; LINDSAY, L. L.; SUKES, J. E.; BIONDO, A. W. Occurrence of hemotropic mycoplasmas in non-human primates (*Alouatta caraya*, *Sapajus nigritus* and *Callithrix jacchus*) of southern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 52, p. 6-13, 2017b.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. **Nat Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DESCLOUX, E.; MEDIANNIKOV, O.; GOURINAT, A.C.; COLOT, J.; CHAUVET, M.; MERMOUD, I.; LEVASSEUR, A. Flying fox haemolytic fever, description of a new zoonosis caused by “*Candidatus Mycoplasma haemohominis*.” **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, pág. e1445-e1453, 2020.

VALLE, S. F.; MESSICK, J. B.; SANTOS, A. P.; KREUTZ, L. C.; DUDA, N. C. B.; MACHADO, G.; CORBELLINI, L. G.; BIONDO, A. W.; GONZÁLEZ, F. H. D. Identification, occurrence and clinical findings of canine hemoplasmas in southern Brazil. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 37, n. 4, p. 259-265, 2014.

DALAPICOLLA, J.; PERCEQUILLO, A. R. Species concepts and taxonomic practice in the integrative taxonomy era: an example using South American rodents. **Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia**, v. 88, p. 36-54, 2020.

DEMKIN, V. V.; KAZAKOV, A. A. Prevalence of hemotropic mycoplasmas and coinfection with feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats in the Moscow region, Russia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 190, p. 105339, 2021.

DE MELO, C. M. F.; DANEZE, E. R.; MENDES, N. S.; RAMOS, I. A. S.; MORALES-DONOSO, J. A.; FERNANDES, S. J.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; SOBREIRA, M. F. R. Genetic diversity and hematological and biochemical alterations in *Alouatta* primates naturally infected with hemoplasmas in Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, p. 104-111, 2019.

DE MELLO, V. V. C.; RAMOS, I. A. S.; HERRERA, H. M.; MENDES, N. S.; CALCHI, A. C.; CAMPOS, J. B.; MACEDO, G. C.; ALVES, J. V. A.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.. Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 66, p. 101337, 2019.

DE SOUSA, K. C. M.; HERRERA, H. M.; SECATO, C. .T; OLIVEIRA, A. V.; SANTOS, F. L. M.; ROCHA, F. L.; BARRETO, W. T. G.; MACEDO, G. C.; PINTO, P. C. E. A.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R. Occurrence and molecular characterization of hemoplasmas in domestic dogs and wild mammals in a Brazilian wetland. **Acta tropica**, v. 171, p. 172-181, 2017.

DIAS, G. B.; AMARAL, R. B.; GATTO, I. R. H.; LÁPERA, I. M.; OLIVEIRA, L. G.; HOPPE, E. G. L.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Molecular detection of *Mycoplasma suis* in captive white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 63, p. 94-96, 2019.

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.

DI CATALDO, S.; HIDALGO-HERMOSO, E.; SACRISTÁN, I.; CEVIDANES, A.; NAPOLITANO, C.; HERNÁNDEZ, C.; ESPERÓN, F., MOREIRA-ARCE, D.; CABELLO-STOM, J.; MUMLLER, A.; MILLÁN, J. Hemoplasmas Are Endemic and Cause Asymptomatic Infection in the Endangered Darwin's Fox (*Lycalopex fulvipes*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 12, p. e00779-20, 2020a.

DI CATALDO, S.; KAMANI, J.; CEVIDANES, A.; MSHELIZA, E. G.; MILLÁN, J. Hemotropic mycoplasmas in bats captured near human settlements in Nigeria. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 70, p. 101448, 2020b.

DILLBERGER, J. E.; LOUDY, D. E.; ADLER, R. R.; GASS, J. H. *Hemobartonella*-like parasites in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Veterinary pathology**, v. 31, n.3, p. 301-307, 1994.

SANTOS, H. R. M.; ARGOLO, C. S.; ARGÔLO-FILHO, R. C.; LOGUERCIO, L. L. A *16SrDNA* PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. **BMC microbiology**, v. 19, n.1, p. 1-14, 2019.

FERNANDES, A. J.; ELSHAFIE, N. O.; KMETIUK, L. B.; ULLMANN, L. S.; BRANDÃO, A. P. D.; HAISI, A.; BACH, R. V. W.; BARROS-FILHO, I. R.; JUNIOR, J. P. A.; BARBOSA, D. S.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in wild boars, hunting dogs, and hunters from two Brazilian regions. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 2, p. 908-912, 2022.

FURTADO, M. M.; TANIWAKI, S. A.; METZGER, B.; O'DWYER, L. H.; PADUAN, K. S.; JÁCOMO, A. T. A.; PORFÍRIO, G. E. O.; SILVEIRA, L.; SOLLMAN, R.; TÖRRES, N. M.; NETO, J. S. F. First detection of feline hemoplasmas in free-ranging jaguars (*Panthera onca*). **Veterinary microbiology**, v. 214, p. 75-80, 2018.

GIROTTI, A.; ZANGIRÓLAMO, A. F.; BOGADO, A. L. G.; SOUZA, A. S. L.; SILVA, G. C. F.; GARCIA, J. L.; BOAS, L. A. V.; 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, p. 342-344, 2012.

GONÇALVES, L. R.; HERRERA, H. M.; NANTES, W. A. G.; SANTOS, F. M.; PORFÍRIO, G.; BARRETO, W. T. G.; DE MACEDO, G. C.; ASSIS, W. D. O.; CAMPOS, J. B. V.; DA SILVA, T. M. V. Genetic diversity and lack of molecular evidence for hemoplasma cross-species transmission between wild and synanthropic mammals from Central-Western Brazil. **Acta tropica**, v. 203, p. 105303, 2020.

GONÇALVES, L. R.; ROQUE, A. L. R.; MATOS, C. A.; FERNANDES, S. D. J.; OLMOS, I. D. F.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Diversidade e caracterização molecular de novos hemoplasmas infectando roedores silvestres de diferentes biomas brasileiros. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 43, p. 50-56, 2015.

GRAÇA, M. S. C.; BASTO, P. A. S.; RICO, A.; MARTINEZ, J.; SANCHEZ-ROMAN, I. V.; ALANDIA, E. I.; MOYA, M. I.; REVOLLO-CADIMA, S.; SALAZAR-BRAVO, J. Ocorrência de ectoparasitas no roedor *Oligoryzomys microtis* em regiões ao norte do Departamento de La Paz, Bolívia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 191-198, 2020.

GRAZZIOTIN, A. L.; DUARTE, J. M. B.; SZABÓ, M. P. J.; SANTOS, A. P.; GUIMARÃES, A. M. S.; MOHAMED, A.; VIEIRA, R. F. C.; BARROS-FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer populations. **Journal of wildlife diseases**, v. 47, n. 4, p. 1005-1011, 2011.

GUIMARAES, A. M. S.; BIONDO, A. W.; LARA, A. C.; MESSICK, J. B. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. **Veterinary Record**, v. 160, n. 2, p. 50-53, 2007.

GUIMARÃES, A.; RAIMUNDO, J. M.; SILVA, A. T. D.; CARPINTERO, F. M.; PIRES, J. R.; BENEVENUTE, J. L.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Detection of a putative novel genotype of *Ehrlichia* sp. from opossums (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 140-144, 2018.

GUIMARÃES, A. M. S.; BIONDO, A. W.; LARA, A. C.; MESSICK, J. B. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. **Veterinary Record**, v. 160, n. 2, p. 50-53, 2007.

HAPPI, A. N.; OLUNIYI, P. E. A rare case of equine Haemotropic Mycoplasma infection in Nigeria. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 41, n.3, p. 274-286, 2020.

HARASAWA, R.; FUJITA, H.; KADOSAKA, T.; ANDO, SHUJI, A.; RIKIHISA, Y. Proposal for '*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. *musculi*' in mice, and '*Candidatus Mycoplasma haemomuris* subsp. *ratti*' in rats. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, p. 734-737, 2015.

HIDALGO-HERMOSO, CABELLO, J.; NOVOA-LAZANO, I.; CELIS, S.; ORTIZ, C.; KEMEC, I.; LAGOS, R.; VERASAY, J.; MANSELL-VENEGAS, M.; MOREIRA-ARCE,

D.; VERGARA, P. M.; MILLÁN, J.; ESPERON, F. Molecular detection and characterization of hemoplasmas in the Pudu (*Pudu puda*), a native cervid from Chile. **Journal of wildlife diseases**, v. 58, n.1, p. 8-14, 2022.

HOELZLE, K.; ENGELS, M.; KRAMER, M.; WITTENBRINK, M.; DIECKMAN, S., HOELZLE, L. Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). **Veterinary Microbiology**. v. 143, p. 405–409, 2010.

HOFMANN, M.; GRIOT, C.; CHAIGNAT, V.; PERLER, L.; THÜR, B. Bluetongue disease reached Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, n.150, p.49-56, 2008.

HORNOK, S.; FOLDVARI, G.; RIGO, K.; MELI, M. L.; GONCZI, E.; RÉPÁSI, A.; FARKAS, R. PAPP, I.; KONTSCHÁN, J.; HOFMANN-LEHMANN, R. Synanthropic rodents and their ectoparasites as carriers of a novel haemoplasma and vector-borne, zoonotic pathogens indoors. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2015.

HORNOK, S.; SUGÁR, L.; FERNÁNDEZ DE MERA, I.; DE LA FUENTE, J.; HORVÁTH, G.; KOVÁCS, T.; MICSUTKA, A.; GONCZI, E.; FLAISZ, B.; TAKÁS, N.; FARKAS, R.; MELI, M.; HOFFMANN-LEHMANN, R. Tick-and fly-borne bacteria in ungulates: the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe, Hungary. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2018.

HORTA, M. C.; RAGOZO, A. M. A.; CASAGRANDE, R. A.; REIKO, E.; GENNARI, S. M. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leptospira* spp. antibodies in opossums (*Didelphis* spp.) in São. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 1-9, 2016.

IKEDA, P. **Molecular detection and genetic diversity of arthropod and trematode-borne agents in non-hematophagous bats from midwestern Brazil**. Tese (Doutorado) - aculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, 2021.

IUCN/SSC. Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland: IUCN Species Survival Commission. 2013. – <https://www.iucnredlist.org> – Acessado em fevereiro de 2023).

JOHANSSON, K-E; HELDTANDER, M.U.K.; PETTERSSON, B. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal *16SrDNA* primers. **Mycoplasma protocols**, p. 145-165, 1998.

KAKIMORI, M. T.; BARROS, L. D.; COLLERE, F. C. M.; FERRARI, L. D. R.; MATOS, A.; LUCAS, J. I.; CORADI, V. S.; MONGRUEL, A. C. B.; AGUIAR, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. First molecular detection of *Mycoplasma ovis* in horses from Brazil. **Acta Tropica**, v. 237, p. 106697, 2023.

KALANTARI, M.; SHARIFIYAZDI, H.; GHANE, M.; NAZIFI, S. The occurrence of hemotropic *Mycoplasma ovis*-like species in horses. **Preventive veterinary medicine**, v. 175, p. 104877, 2020.

KELLNER, A.; CARVER, S.; SCORZA, V.; MCKEE, C.D.; LAPPIN, M.; CROOKS, K. R.; VANDEWOUDE, S.; ANTOLIN, M. F. Transmission pathways and spillover of an

erythrocytic bacterial pathogen from domestic cats to wild felids. **Ecology and evolution**, v. 8, n. 19, p. 9779-9792, 2018.

KONEVAL, M.; MITERPÁKOVÁ, M.; HURNÍKOVÁ, Z.; BLANAROVÁ, L.; VÍCHOVÁ, B.. Neglected intravascular pathogens, *Babesia vulpes* and haemotropic *Mycoplasma* spp. in European red fox (*Vulpes vulpes*) population. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 176-182, 2017.

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B.; RUBEL, F. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated, 2006.

KREIER, J. P.; RISTIC, M. Rickettsiales and Chlamydias. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Baltimore, USA: Williams & Wilkins. (1984).

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v 35, p. 1547-1549, 2018.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.

LAVORENTE, F. L. .; MATOS, A. M. R. N.; LORENZETTI, E.; OLIVEIRA, M. V.; PINTO-PEREIRA, F.; MICHELAZZO, M. M. Z.; VIANA, N. E.; LUNARDI, M.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. First detection of Feline morbillivirus infection in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*, Lund, 1840), a non-feline host. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 3, p. 1426-1437, 2022.

LEMOES, E. R. S.; D'ANDREA, P. S. (Ed.). Trabalho de campo com animais: procedimentos, riscos e biossegurança. **SciELO-Editora FIOCRUZ**, 2014.

LINDSEY, J. R.; BOORMAN, G. A; COLLINS, M. J. J.; HSU, C. K.; VAN, HOOSIER, G. L. J.; WAGNER, J. E.; Infectious diseases of mice and rats. **National Academy Press**, Washington DC, 1991.

MACHADO, C. A. L.; VIDOTTO, O.; CONRADO, F. O.; SANTOS, N. J. R.; VALENTE, D. M.; BARBOSA, I. C.; TRINDADE, P. W. S.; GARCIA, J. L.; BIONDO, A. W.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. *Mycoplasma ovis* infection in goat farms from northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 55, p. 1-5, 2017.

MAGGI, R. G.; COMPTON, S. M.; MASCARELLI, P. E.; MOZAYENI, B. R.; BREITSCHWERDT, E. B. Infection with hemotropic *Mycoplasma* species in patients with or without extensive arthropod or animals contact. **Journal of Clinical Microbiology, Washington**, v. 51, n. 10, p. 3237-3241, 2013.

MARCONDES, M.; HIRATA, K. Y.; VIDES, J. P.; SOBRINHO, L. S.; AZEVEDO, J. S.; VIEIRA, T. S.; VIEIRA, R. F. Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-8, 2018.

MASSINI, P. F.; DROZINO, R. N.; OTOMURA, F. H.; MONGRUEL, A. C. B.; VALENTE, J. D. M.; TOLEDO, M. J. O.; MARTINS, T. F.; VIDOTTO, O.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. Detection of Hemotropic *Mycoplasma* sp. in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 797-801, 2019.

MEDRONHO, R. Epidemiologia. 2<sup>a</sup> ed. Atheneu, São Paulo, 676p. 2009.

MEERBURG, Bastiaan G.; SINGLETON, Grant R.; KIJLSTRA, Aize. Rodent-borne diseases and their risks for public health. **Critical reviews in microbiology**, v. 35, n. 3, p. 221-270, 2009.

MÉNDEZ, L. C.; MONTOYA, L. N. F.; MAZO, M. M.; SEPÚLVEDA, J. C.; VALENCIA, E.; PORTILLA, T.; RESTREPO, L. Comparación diagnóstica entre análisis citológico y molecular para la detección de *Mycoplasma haemofelis* en gatos residentes de la ciudad de Pereira, Risaralda, Colombia. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 33, n. 1, 2022.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, p. 2-13, 2004.

MESSICK, J. B.; BERENT, L. M.; COOPER, S. K. Development and evaluation of a PCR-based assay for detection of *Haemobartonella felis* in cats and differentiation of *H. felis* from related bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 462-466, 1998.

MICELI, N. G.; GAVIOLI, F. A.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; SOUSA, V. R. F.; SOUSA, K. C. M. D.; 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, p. 385-390, 2013.

MILES, R. J.; SIU, E. L. T.; CARRINGTON, C.; RICHARDSON, A. C.; SMITH, B. V.; PRICE, R. G. The detection of lipase activity in bacteria using novel chromogenic substrates. **FEMS microbiology letters**, v. 90, n. 3, p. 283-287, 1992.

MILLÁN, J.; DI CATALDO, S.; VOLOKHOV, D. V.; BECKER, D. J. Worldwide occurrence of haemoplasmas in wildlife: Insights into the patterns of infection, transmission, pathology and zoonotic potential. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 6, p. 3236-3256, 2021.

MILLÁN, J.; TRAVAINI, A.; CEVIDANES, A.; SACRISTÁN, I.; RODRÍGUEZ, A. Assessing the natural circulation of canine vector-borne pathogens in foxes, ticks and fleas in protected areas of Argentine Patagonia with negligible dog participation. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 63-70, 2019

MILLÁN, J.; VELARDE, R.; DELICADO, V.; NEGRE, N.; RIBAS, A.; OLEAGA, Á.; LLANEZA, L.; ESPERÓN, F. High diversity of hemotropic mycoplasmas in Iberian wild carnivores. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 60, p. 11-16, 2018.

MONGRUEL, A. C. B.; SPANHOL, V. C.; VALENTE, J. D. M.; PORTO, P. P.; OGAWA, L.; OTOMURA, F. H.; MARQUEZ, E. S.; ANDRÉ, M. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. Survey of vector-borne and nematode parasites involved in the etiology of anemic syndrome in sheep from Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 3, 2020.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov.(formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 2, p. 365-371, 2004.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, n. 2, p. 683-683, 2002.

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 the requests for '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuisma*' and '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n.3, p. 891-899, 2001.

NEIMARK, H.; KOCAN, K. M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, n.2, p. 287-291, 1997.

NOCARD, E.; ROUX, E. La microbe de la peripneumonie. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 12, p. 240-262, 1898.

OLIVAL, K. J.. HOSSEINI, P. R.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; ROSS, N.; BOGICH, T. L.; DASZAK, P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 646-650, 2017.

OLIVEIRA, R. P. A. D.; COLLERE, F. C. M.; FERRARI, V. S. C.; SOARES, N. A.; LEANDRO, A. S.; OLIVEIRA, W. F.; GALVÃO, S. R.; KAFKA, R.; DELAI, R. M.; MARTINI, R.; SALDANHA, A.; SANTOS, L. P.; CUBAS, Z. S.; LANGE, R. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. '*Candidatus Mycoplasma haemoalbiventris*' and tick-borne pathogens screening in white-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Curitiba and Foz do Iguaçu Cities, Paraná State, southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 4, 2021.

OROZCO, A. M. O.; BENTO, L. D.; SOUTO, . C.; GIRARDI, F. M.; NOGUEIRA, B. C. F.; YAMATOI, R. S.; CAMPOS, A. K.; CAROLYN, C.; MONTIANI-FERREIRA, F.; COLLERE, F. C. M.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. '*Candidatus Mycoplasma Haemoalbiventris*' and Tick-Borne Pathogens in Black-Eared Opossum (*Didelphis aurita*) from Southeastern Brazil. **Microorganisms**, v. 10, n.10, p. 1955, 2022.

- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and earth system sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633-1644, 2007.
- PERLES, L.; MORAES, M.F.; XAVIER DA SILVA, M.; VIEIRA, R.F.C.; MACHADO, R.Z.; LUX HOPPE, E.G.; ANDRÉ, M.R. Coinfection by multiple vector agents in wild ring-tailed coatis (*Nasua nasua*) from Iguazu National Park, southern Brazil. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1828, 2023.
- PETERS, R.; PETERS, J.; TEWS, K. H.; BÄHR, W. A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 367, n.3, p. 282-294, 1974.
- PERSICHETTI, M. F.; PENNISI, M. G.; VULLO, A.; MASUCCI, M.; MIGLIAZZO, A.; SOLANO-GALLEGO, L. Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy. **Parasites & vectors**, v. 11, p. 1-11, 2018.
- PHAN, T. G.; KAPUSINSZKY, B.; WANG, C.; ROSE, R. K.; LIPTON, H. L.; DELWART, E. L. The fecal viral flora of wild rodents. **PLOS pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002218, 2011.
- PONTAROLO, G. H.; KUHL, L. F.; PEDRASSANI, D.; CAMPOS, M.; FIGUEIREDO, F. B.; VALENTE, J. D. M.; GONLALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C.; BARROS-FILHO, I. R. 'Candidatus *Mycoplasma haemoalbiventris*', a novel hemoplasma species in White-eared opossums (*Didelphis albiventris*) from Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n.2, p. 565-572, 2021.
- RAMALHO, A. C.; GUERRA, R. R.; MONGRUEL, A. C. B.; VIDOTTO, O.; LUCENA, R. B.; GUERRA, M. V. S. F.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. *Mycoplasma* sp. infection in captive Marcgrave's capuchin monkeys (*Sapajus flavius*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 51, p. 34-36, 2017.
- RAMOS, R.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F.; OLVEIRA, R.; SOUZA, I.; PIMENTEL, D.; GALINDO, M.; SANTANA, M.; ROSA, E.; FAUSTINO, M.; ALVES, L. Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). **Parasitology research**, v. 107, p. 1115-1120, 2010.
- RASKIN R.E.; MEYER D.J. **Canine and feline cytology: A color atlas and interpretation guide**. 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 2009.
- RAZIN, S.; JACOBS, E. *Mycoplasma* adhesion. **Journal of general microbiology**, v. 138, n.3, p. 407-422, 1992.
- REIS, S. F. **Ectoparasitas de pequenos mamíferos e suas especificidades: uma rede de interações em um fragmento de Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado). Viçosa Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa, 2020.
- RETIEF, L.; CHIMIMBA, C. T.; OOSTHUIZEN, M. C.; MATSHOTSHI, A.; BASTOS, A. D. Haemoplasma prevalence and diversity in three invasive *Rattus* species from Gauteng Province, South Africa. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1632, 2022.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

RODRIGUES, M. S.; LIMA, L.; XAVIER, S. C. D. C.; HERRERA, H. M.; ROCHA, F. L.; ROQUE, A. L. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; JANSEN, A. M. Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 8, p. 171-181, 2019.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERTS, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of *16SrRNA* gene sequences from *H. muris*, *H. felis* and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823-829, 1997.

SASHIDA, H.; SASAOKA, F.; SUZUKI, J.; WATANABE, Y.; FUJIHARA, M.; NAGAO, K.; KOBAYASHI, S.; FURUHAMA, K.; HARASAWA, R. Detection of hemotropic mycoplasmas in free-living brown sewer rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 7, p. 979-983, 2013.

SACRISTÁN, I.; ACUÑA, F.; AGUILAR, E.; GARCÍA, S.; LÓPEZ, M. J.; CEVIDANES, A.; CABELLO, J.; HIDALGO-HERMOSO, E.; JOHNSON, W. E.; POULIN, E.; MILLÁN, J.; NAPOLITANO, C., Assessing cross-species transmission of hemoplasmas at the wild-domestic felid interface in Chile using genetic and landscape variables analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2ª ed. Belo Horizonte: Editora, FEPMVZ. 265 p. 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHOEB, T. R.; DAVIS, J. K.; LINDSEY, J. R. Murine respiratory mycoplasmosis, rat and mouse, in JONES, T. C.; DUNGWORTH, D. L.; MOHR, U. Monographs on the Pathology of Laboratory Animals. **Respiratory System** (Second edition). New York, NY, Springer-Verlag, p. 117-131, 1996.

SEPÚLVEDA-GARCÍA, P.; RAFFO, E.; MEDINA-VOGEL, G.; MUNOZ, F.; MUNOZ, P.; ALABÍ, A.; TALLONI-NAVARRETE, M. J.; GONÇALVES, L. R.; DE MELLO, V. V. C.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; BITTENCOURT, P.; MULLER, A. Molecular survey of *Bartonella* spp. and haemoplasmas in American minks (*Neovison vison*). **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 4, p. 2094-2110, 2021.

SILVA-SANTOS, M.; MATOS, P.; LIMA, V. F.; MEIRA-SANTOS, P.; ROCHA, L. Micoplasmose em cães - relato de 4 casos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n.19, 2014.

SOARES, R. L.; ECHEVERRIA, J. T.; PAZZUTI, G.; CLEVELAND, H. P. K.; BABO-TERRA, V. J.; FRIOZI, E.; RAMOS, C. A. D. N. Occurrence of *Mycoplasma haemocanis* in dogs infested by ticks in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 360-363, 2016.

SOUZA, U. A.; OBERRATHER, K.; FAGUNDES-MOREIRA, R.; ALMEIDA, B. A. D.; VALLE, S. D. F.; GIROTTO-SOARES, A.; SOARES, J. F. First molecular detection of *Mycoplasma ovis* (Hemotropic mycoplasmas) from Sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 360-366, 2019.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária 2ª edição**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.3, p.119-120, 2011.

STUEN, S.; GRANQUIST, E. G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 31, 2013

SYKES, J. E.; TASKER, S. **Hemoplasma infections. Canine and Feline Infectious Diseases, 1st ed.**; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, p. 390-398, 2013.

TAMURA K.; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TAMURA K.; STECHER G.; KUMAR S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, p. 3022–3027, 2021.

TANAKA, H.; HALL, W. T.; SHEFFIELD, J. B.; MOORE, D. H. Fine structure of *Haemobartonella muris* as compared with *Eperythrozoon coccoides* and *Mycoplasma pulmonis*. **Journal of Bacteriology**, v. 90, n. 6, p. 1735-1749, 1965.

TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats?. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 12, n. 5, p. 369-381, 2010.

TASKER, S.; BINNS, S.H.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A.; HELPS, C.R.; JENSEN, W.A.; OLVER, C.S.; LAPPIN, M.R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. **Veterinary Research**, v.152, n.7, p.193-198, 2003.

TASKER, S.; BRADDOCK, J. A.; BARAL, R.; AJUDA, C. R.; DIA DO, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; MALIK R.. Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on '*Cadidatus Mycoplasma haemominutum*' infection. **Microbes and infection**, v. 8, n. 3, p. 653-661, 2006.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2015.

TULLY, J. G.; BOVÉ, J. M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R. F. Revised taxonomy of the class Mollicutes: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod associated mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmatales fam. nov.) from helical

species (Spiroplasmataceae, and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 378-385, 1993.

VALENTE, J. D.; SALDANHA, A., MARTINI, R.; LANGE, R. R.; BAGGIO, R. A.; MARTINS, T. F.; VIEIRA, R. F. ‘*Candidatus Mycoplasma haemosphiggurus*’ a novel haemoplasma species in orange-spined hairy dwarf porcupines (*Sphiggurus villosus*) from Southern Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 3, p. 1054-1061, 2021.

VARANAT, M.; MAGGI, R.G.; LINDER, K.E.; BREITSCHWERDT, E.B. Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* sp. in dogs with splenic disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1284-1291, 2011.

VIDAL, R. A. C. **Rastreo de agentes de doenças caninas de transmissão vectorial numa população de cães com funções militares policiais**. 94f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2013.

VIEIRA, R. F. C.; MOLENTO, M. B.; DOS SANTOS, L. C.; MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; SANTOS, A. P. ; GUIMARÃES, A. M. S.; MOHAMED, A.; FILHO, I. R. B.; BIONDO, A. W.; MESSICK, J. B. Detection of a novel hemoplasma based on *I6SrRNA* gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Veterinary Microbiology**, Filadélfia, v. 139, n. 3-4, p. 410-413, 2009.

VOLOKHOV, D.; HWANG, J.; CHIZHIKOV, V.; DANACEAU, H.; GOTTDENKER, N. Prevalence, genotype richness, and coinfection patterns of hemotropic mycoplasmas in raccoons (*Procyon lotor*) on environmentally protected and urbanized barrier islands. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 9, p. e00211-17, 2017.

VOLOKHOV, D.; SIMONYAN, V.; DAVIDSON, M.; CHIZHIKOV, V. RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the *I6S-23S rRNA* intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the *I6SrRNA* gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasma. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, p. 515-528, 2012.

WEKSLER, M.; BONVICINO, C. R.; PATTON, J. L.; PARDIÑAS, U. U. F.; D’ELÍA, G. Genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900. **Mammals of South America**, v. 2, p. 417-437, 2015.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; MELI, M.L.; BERNASCONI, M.V.; CASATI, S.; HEGGLIN D.; PUORGER, M.; NEIMARK, H.; CATTORI, V.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Investigação por PCR em tempo real de potenciais vetores, reservatórios e padrões de excreção de micoplasmas hemotrópicos felinos. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3798-3802, 2007.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, v. 2 p. 2142, 2005.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

ZACHARY, J. F.; BASGALL, E. J. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. **Veterinary pathology**, v. 22, n. 2, p. 164-170, 1985.

## 9 ANEXOS

**Anexo I.** Estimativa de divergência evolutiva entre sequências. É apresentado o número de substituições de bases por local entre as sequências. As análises foram efectuadas utilizando o modelo de Máxima Verosimilhança Composta. Esta análise envolveu 64 sequências de nucleótidos, com um dataset final de 971 posições. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de eliminação de pares). As análises evolutivas foram efectuadas no MEGA X.

ID Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 PP109112												
2 PP109113	0.00											
3 PP109115	0.07	0.07										
4 PP109114	0.01	0.01	0.07									
5 PP109116	0.07	0.07	0.00	0.07								
6 PP109117	0.07	0.07	0.00	0.07	0.00							
7 PP109119	0.01	0.01	0.08	0.00	0.08	0.07						
8 PP109118	0.00	0.00	0.08	0.00	0.08	0.07	0.00					
9 PP109120	0.00	0.00	0.08	0.01	0.08	0.07	0.00	0.00				
10 PP109121	0.00	0.00	0.08	0.01	0.08	0.07	0.00	0.00	0.00			
11 PP109123	0.00	0.00	0.07	0.01	0.07	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00		
12 PP109122	0.00	0.00	0.08	0.01	0.08	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
13 KT215620.1	0.08	0.08	0.02	0.08	0.02	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
14 KT215621.1	0.08	0.08	0.01	0.08	0.01	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
15 KT215637.1	0.00	0.00	0.08	0.01	0.08	0.08	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16 KM258432.1	0.08	0.08	0.05	0.08	0.05	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
17 KT215634.1	0.10	0.10	0.07	0.10	0.07	0.07	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
18 KT215633.1	0.10	0.10	0.08	0.10	0.08	0.08	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
19 KT215632.1	0.09	0.09	0.07	0.09	0.07	0.07	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09
20 KT215631.1	0.09	0.09	0.07	0.09	0.07	0.07	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
21 KT215628.1	0.07	0.07	0.00	0.07	0.00	0.00	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08
22 KT215629.1	0.08	0.08	0.01	0.08	0.01	0.01	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
23 KT215627.1	0.07	0.07	0.00	0.07	0.00	0.00	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08
24 KT215630.1	0.07	0.07	0.02	0.07	0.02	0.02	0.07	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07
25 KT215625.1	0.13	0.13	0.06	0.12	0.06	0.06	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
26 KT215626.1	0.09	0.09	0.02	0.08	0.02	0.02	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
27 KT215623.1	0.08	0.08	0.01	0.08	0.01	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
28 KT215636.1	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
29 KT215638.1	0.01	0.01	0.07	0.00	0.07	0.07	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
30 KT215624.1	0.08	0.08	0.02	0.08	0.02	0.02	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
31 KT215635.1	0.08	0.08	0.05	0.08	0.05	0.05	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
32 KT215640.1	0.04	0.04	0.09	0.04	0.09	0.09	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
33 KJ739312.1	0.04	0.04	0.09	0.04	0.09	0.09	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
34 MN423261.1	0.08	0.08	0.05	0.08	0.05	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
35 KT215639.1	0.04	0.04	0.09	0.04	0.09	0.09	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05
36 AB758437.1	0.08	0.08	0.05	0.08	0.05	0.05	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08

Anexo I. Continuação.

<b>ID Sequências</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>37</b> AB758436.1	0.08	0.08	0.05	0.08	0.05	0.05	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
<b>38</b> KT314160.1	0.09	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
<b>39</b> KT314161.1	0.09	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
<b>40</b> KT314162.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08
<b>41</b> KT314163.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08
<b>42</b> KM538691.1	0.09	0.09	0.07	0.09	0.07	0.07	0.09	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09
<b>43</b> KM538692.1	0.09	0.09	0.07	0.09	0.07	0.07	0.09	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09
<b>44</b> MN543637.1	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09
<b>45</b> FJ667773.1	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12
<b>46</b> FJ667774.1	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12
<b>47</b> MK064160.1	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09
<b>48</b> EF616468.1	0.11	0.11	0.09	0.11	0.09	0.09	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
<b>49</b> DQ464424.1	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
<b>50</b> GU562823.1	0.09	0.09	0.06	0.09	0.06	0.07	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10
<b>51</b> AB758435.1	0.08	0.08	0.05	0.08	0.05	0.05	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
<b>52</b> AF338269.1	0.22	0.22	0.21	0.22	0.21	0.20	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
<b>53</b> KT314165.1	0.22	0.22	0.21	0.22	0.21	0.20	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
<b>54</b> DQ641256.1	0.23	0.23	0.21	0.22	0.21	0.21	0.23	0.23	0.23	0.23	0.22	0.23
<b>55</b> NR121759.1	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.21	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
<b>56</b> KF313922.1	0.22	0.22	0.20	0.22	0.20	0.20	0.23	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22
<b>57</b> KM275255.1	0.20	0.20	0.19	0.20	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
<b>58</b> EU828581.1	0.23	0.23	0.22	0.23	0.22	0.21	0.24	0.24	0.23	0.23	0.23	0.23
<b>59</b> AB610849.1	0.22	0.22	0.22	0.23	0.22	0.22	0.22	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22
<b>60</b> DQ464422.1	0.10	0.10	0.09	0.10	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
<b>61</b> KU554425.1	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12
<b>62</b> EF416566.1	0.11	0.11	0.10	0.12	0.10	0.10	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.12
<b>63</b> AF548631.1	0.12	0.12	0.10	0.12	0.10	0.10	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
<b>64</b> NR181869.1	0.32	0.32	0.30	0.32	0.30	0.30	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32