



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO MOLECULAR E POR MICROSCOPIA DIRETA DE
MYCOPLASMA SPP. EM CAPRINOS NO ESTADO DA PARAÍBA**

IAGO CARVALHO BARBOSA

Areia-PB, 2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

MONOGRAFIA

**DETECÇÃO MOLECULAR E POR MICROSCOPIA DIRETA DE
MYCOPLASMA SPP. EM CAPRINOS NO ESTADO DA PARAÍBA**

IAGO CARVALHO BARBOSA

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Medicina Veterinária
pela Universidade Federal da Paraíba, sob
orientação da Prof. Valeska Shelda Pessoa
De Melo.**

Areia-PB, 2016

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

B238d Barbosa, Iago Carvalho.

Detecção molecular e por microscopia direta de *Mycoplasma* spp. em caprinos no estado da Paraíba / Iago Carvalho Barbosa. - Areia: UFPB/CCA, 2016.

24 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Valeska Shelda Pessoa de Melo.

1. Patologia veterinária 2. Micoplasmose animal 3. Caprinos I. Melo, Valeska Shelda Pessoa de II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 636.09:616



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

IAGO CARVALHO BARBOSA

DETECÇÃO MOLECULAR E POR MICROSCOPIA DIRETA DE
***MYCOPLASMA SPP.* EM CAPRINOS NO ESTADO DA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em **Medicina Veterinária**, pela Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em:

Nota:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Valeska Shelda Pessoa De Melo - UFPB
Orientador

Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp - UFPB
Examinador

Méd. Vet. Karla Priscila Garrido Bezerra - UFPB
Examinador

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos tri-fosfatados

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FAO - Food and Agricultural Organization

g/L – Grama por Litro

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC – Intervalo de Confiança

L/L – Litro por Litro

mM – milimolar

n – número amostral

O – Oeste

OR – *Odds ratio*

p – Probabilidade

pb – Pares de base

PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase

PPT - Proteínas Plasmáticas Totais

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossômico

S – Sul

spp. - Espécies

SRD - Sem Raça Definida

UEL - Universidade Estadual de Londrina

VG - Volume Globular

µL – microlitro

RESUMO

BARBOSA, Iago Carvalho, Universidade Federal da Paraíba, maio de 2016. **DETECÇÃO MOLECULAR E POR MICROSCOPIA DIRETA DE *MYCOPLASMA SPP.* EM CAPRINOS NO ESTADO DA PARAÍBA.** Orientador: Valeska Shelda Pessoa De Melo.

Os hemoplasmas são bactérias pequenas e pleomórficas, causadoras de anemia hemolítica aguda e doenças crônicas em espécies domésticas e selvagens no mundo todo. Incluem-se entre as bactérias gram-negativas e parasitos obrigatórios de eritrócitos. Em pequenos ruminantes, a hemoplasmosose implica em perda de peso, anemia severa e até mesmo mortalidade. Com o objetivo de estudar a infecção causada por micoplasma hemotrópico em caprinos no estado da Paraíba, foram realizados esfregaços sanguíneos de ponta orelha e coletadas amostras de sangue de 402 caprinos distribuídos em oito propriedades caprinas localizadas no estado da Paraíba. Para a detecção molecular de hemoplasmas foram amplificadas regiões específicas do gene 16S rRNA. A infecção por hemoplasma foi detectada em 158 (39,30%) animais pela PCR, enquanto por microscopia direta não houve detecção. Do total de 8 propriedades estudadas, 5 apresentaram associação significativa com a positividade para hemoplasmas. Do total de animais, 118 (29,3%) estavam anêmicos e foi observada diferença significativa entre média de VG de animais positivos e animais negativos ($p < 0,05$). Houve associação significativa entre animais adultos, machos, raça parda e raça mista com positividade de hemoplasmas. Não foi observada associação significativa entre a detecção do agente e presença de carrapatos ($p > 0,05$). Diferente de estudos anteriores que apresentam uma maior prevalência em ovinos do que em caprinos, o presente estudo mostra uma alta prevalência de hemoplasmas em caprinos. Estes animais apresentam menor bacteremia quando comparados aos ovinos, em alguns casos ausência de bacteremia detectável, e ainda a bacteremia pode estar diminuída no sangue periférico em casos de infecções a longo prazo. A alta prevalência indica que os micoplasmas hemotrópicos são um importante diagnóstico diferencial para doenças transmitidas por artrópodes para pequenos ruminantes. Destaca-se por fim que pode existir um alto risco de contração deste agente pelos humanos, sendo considerado assim um problema de saúde pública.

PALAVRAS-CHAVE: Micoplasmas hemotrópicos; Hemoplasmas; Esfregaço; PCR; Pequenos ruminantes.

ABSTRACT

BARBOSA, Iago Carvalho, Federal University of Paraiba, May 2016. **MOLECULAR AND DIRECT MICROSCOPY DETECTION OF *MYCOPLASMA* SPP. IN GOATS FROM PARAIBA STATE.** Advisor: Valeska Shelda Pessoa De Melo.

Hemoplasmas are small and pleomorphic bacteria, which cause acute hemolytic anemia and chronic diseases in domestic and wild species worldwide. They are gram-negative bacteria and erythrocytic parasites. In small ruminants the hemoplasmosis is characterized by weight loss, severe anemia and even mortality. In order to study the infection caused by hemotropic mycoplasma in goats in the state of Paraiba, blood smears from the ear tip were performed and blood samples were collected from 402 goats distributed in eight farms from the state of Paraiba. For molecular detection of hemoplasma, the specific region 16S rRNA gene was amplified. Hemoplasma infection was detected in 158 (39.30%) animals by PCR, while by direct microscopy no detection was observed. From 8 farms studied, 5 showed association with positivity for hemoplasmas. From 402 animals, 118 (29.3%) were anemic and significant difference was observed between the PCV (packed cell value) average of positive and negative animals ($p < 0.05$). There was significant association between adult animals, male and mixed race with hemoplasma positivity. There was no significant association between the agent detection and ticks ($p > 0.05$). Although most studies indicate a higher prevalence in sheep than in goats, this study showed a high prevalence in goats. Goats have lower bacteremia compared to sheep, in some cases no detectable bacteremia, and that bacteremia may decrease in the peripheral blood in cases of long-term infections. The high prevalence indicates that hemotropic mycoplasmas are an important differential diagnosis of diseases transmitted by arthropods to small ruminants. It stands out that there may be a high contraction risk of this agent by humans, thus considered a public health problem.

KEY WORDS: Hemotropic mycoplasma; Hemoplasma; Smears; PCR; Small ruminants.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. AMOSTRAGEM	11
2.2. ANÁLISE HEMATOLÓGICA E DETECÇÃO DIRETA POR ESFREGAÇO SANGUÍNEO	12
2.3. PCR	12
2.3.1.Extração de DNA	12
2.3.2. PCR	13
2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4. CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

A região Nordeste do Brasil é conhecida pelo grande período de escassez de água, apresentando uma distribuição de chuvas temporal e espacialmente irregular. Esta característica cria uma dificuldade com relação a agricultura, gerando a toda população da área rural uma vida árdua e severa. Sendo assim, já é reconhecidamente tratado que a criação de pequenos ruminantes, em especial de caprinos, apresenta-se como uma alternativa contribuindo para uma promoção do nível de bem-estar desta população (AHUYA, 2005; IÑIGUEZ, 2004; PAPACHRISTOFOROU, 2006; PEACOCK, 2005).

A caprinocultura foi trazida ao Brasil pelos portugueses desde a colonização, sendo a região Nordeste o local por onde essa cultura mais se disseminou. Comparado com a criação de bovinos, a criação de caprinos é muitas vezes vista como uma cultura menos importante. Entretanto, a criação de caprinos é mais adaptável às duras condições do semiárido, diminuindo assim a possibilidade de perdas (GONÇALVES, 2011).

O rebanho mundial de caprinos encontra-se nos dígitos de 1,006 bilhão de cabeças. O Brasil possui em torno 8,850 milhões de cabeças, sendo 91,61% na região Nordeste (BRASIL, 2014; FAO, 2014). Grande parte destes animais são destinados a criação de subsistência, na qual os próprios produtores usufruem do animal e seus derivados (MARTINS, 2007). Neste aspecto, o estudo dos caprinos e de seus agentes infecciosos se torna algo extremamente necessário.

A criação de caprinos enfrenta duras condições de produção, que se caracterizam por condições climáticas extremas e uma infinidade de doenças bacterianas e virais com altas taxas de infecções (RJEIBI, 2015) como a hemoplasmosse. Os hemoplasmas são bactérias pequenas e pleomórficas, sendo encontradas em forma cilíndrica, esférica ou em forma de anel, apresentando-se individualmente ou em correntes. São bactérias gram-negativas e parasitos obrigatórios de eritrócitos que infectam uma gama de animais vertebrados (MESSICK, 2004).

Estas bactérias causam anemia hemolítica aguda e doenças crônicas variadas. A severidade da doença pode variar de um quadro clínico assintomático à risco de morte, dependendo parcialmente da susceptibilidade do hospedeiro. Fatores como idade, infecção concomitante, imunossupressão ou esplenectomia, podem apresentar-se em associação com a manifestação aguda da doença (MESSICK, 2004).

Anteriormente conhecidos como *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, os micoplasmas foram removidos da ordem *Rickettsiales* e inseridos na família *Mycoplasmataceae*, com base em características moleculares e fenotípicas (NEIMARK, 2001, 2002). A análise filogenética das sequências do gene 16S rRNA das bactérias *Haemobartonella felis*, *Haemobartonella muris*, *Eperythrozoon suis* e *Eperythrozoon wenyonii*, demonstrou que estas bactérias não se encaixam no gênero *Rickettsia*, mas que são pertencentes aos micoplasmas (NEIMARK, 1997; RIKIHISA, 1997; NEIMARK, 2001, 2002b).

Hemoplasmas, como outros micoplasmas, não são encontrados na natureza como organismos de vida livre, mas sim, dependem de uma célula hospedeira para produção de compostos essenciais os quais são incapazes de produzir (MESSICK, 2004). Diferentemente da maioria dos micoplasmas, a sobrevivência dos hemoplasmas é conseguida através do parasitismo na superfície dos eritrócitos. Eles dependem desta célula para o fornecimento de aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas (MESSICK, 2004). Para suportar o estilo de vida parasitário, um número considerável de genes do micoplasma é dedicado a adesinas, possuindo ainda vários conjuntos de antígenos de superfície para escapar do sistema imunológico do hospedeiro (RAZIN, 1998).

Dois tipos de hemoplasmas são descritos como microrganismos que acometem pequenos ruminantes. *Mycoplasma ovis*, que é mais conhecido (NEIMARK, 2004), e “*Candidatus Mycoplasma haemovis*”, sendo mais recente, foi detectado primeiramente na Hungria (HORNOK, 2009).

Mycoplasma ovis, anteriormente conhecido por *Eperythrozoon ovis*, é uma bactéria não cultivável, que não possui parede, se apresentando ainda como um parasita que infecta a superfície dos eritrócitos em principal de ovinos, mas também infecta caprinos e cervídeos (BOES, 2012; GRAZZIOTIN, 2011a; GRAZZIOTIN, 2011b; HORNOK, 2012; NEIMARK, 2004; STOFFREGEN, 2006). Este agente é transmitido por artrópodes, através da ingestão de sangue de animais contaminados com o parasita e depois disseminando este para outros animais (NEIMARK, 2004). *M. ovis* é completamente resistente à penicilina e outros agentes antimicrobianos que se destinam à parede celular. O tratamento com tetraciclina também não elimina este agente de animais cronicamente infectados (NEIMARK, 2004).

Como *M. ovis* não é possível de ser cultivado, o diagnóstico deste agente é feito por métodos indiretos ou diretos. Como método indireto são utilizados testes sorológicos e como método direto pode ser utilizado a PCR (Reação em cadeia pela polimerase) ou detecção direta de organismos em eritrócitos, utilizando-se os métodos de coloração de Romanowsky, laranja

de acridina ou ainda coloração de Giemsa, todos em esfregaços de sangue. O parasitismo muitas vezes ocorre em um nível baixo e é transitório, portanto a detecção exige que o método escolhido seja realizado em vários momentos (NEIMARK, 2004).

A hemoplasmosse causada por *M. ovis* se caracteriza pela perda de peso, anemia severa e até mesmo mortalidade de ovinos, e ocasionalmente em ovelhas jovens (CAMPBELL, 1971). Por outro lado, a infecção crônica pode ocorrer de forma assintomática em ovelhas mais velhas (GULLAND, 1987). *M. ovis* apresenta um quadro clínico ainda mais severo quando acomete caprinos (NEIMARK, 2004).

Apesar de toda a severidade que este agente causa aos caprinos, os estudos direcionados a estes animais ainda são poucos. Manson et al. (1989a) realizaram uma pesquisa acerca da detecção de *M. ovis* na Tasmânia, Austrália. Foi observado que dos 600 caprinos analisados, apenas um apresentou-se soropositivo para *M. ovis* (0.17%), enquanto em ovinos, 44.9% dos animais apresentaram soropositividade (550/1224). Outro artigo publicado por Rjeibi em 2015, mostra que em um estudo realizado na África, de 166 caprinos nenhum apresentou-se positivo para *M. ovis*.

Vários profissionais da veterinária (veterinários, técnicos veterinários, etc.) manipulam uma grande variedade de animais domésticos, de produção e selvagens, os quais podem estar infectados por bactérias, protozoários e vírus. Estes profissionais têm contato com fluidos e tecidos de animais que podem estar infectados, são expostos a vetores artrópodes como moscas, mosquitos e carrapatos que infestam animais saudáveis, doentes e mortos. Além disso, profissionais veterinários e manuseadores estão envolvidos diretamente com o cuidado dos animais de produção, animais de vida livre e animais de zoológico, apresentando assim um fator de risco de exposição bem maior (MAGGI et al., 2013).

O desenvolvimento de estudos fazendo uso da PCR e utilizando o gene 16S rRNA resultaram no reconhecimento de vários novos hemoplasmas, alguns destes capazes de infectar seres humanos. Embora o potencial patogênico dos micoplasmas hemotrópicos em humanos não estar claramente definido, estes patógenos zoonóticos emergentes podem representar um problema de saúde pública ainda mais grave do que é atualmente reconhecido (MAGGI, 2013a).

Com base na visualização de organismos em esfregaços de sangue, pesquisadores da Mongólia Interior (China), obtiveram taxas elevadas de infecção de humanos por micoplasmas hemotrópicos. De um total de 1529 pessoas, 35,3% estavam positivas para presença de micoplasma. Quando analisado somente as mulheres grávidas, esta prevalência apresenta-se

ainda mais alta, com taxas de infecção de até 57% e 100% em recém-nascidos de mães infectadas (HU, 2009; YANG, 2000). De maneira semelhante foi encontrada uma alta prevalência de infecção em agricultores e veterinários que trabalham com suínos na China, onde 32 dos 65 trabalhadores (49%) foram positivos para *M. suis* por meio da PCR (YUAN, 2009).

Nos Estados Unidos (EUA), Sykes et al. (2010) isolou variantes de hemoplasmas ovinos em um médico veterinário. Em outro estudo realizado na Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSU), EUA, Maggi et al. (2013) separou uma população em dois grupos, os que não haviam sido expostos a artrópodes ou tinham contato frequente com animais (grupo A), e os que haviam sido expostos a artrópodes e mantinham contato frequente com animais (grupo B). A partir disto foi feita a detecção de micoplasmas hemotrópicos por PCR. No grupo “A” a prevalência encontrada foi de 0.67% (2/296), enquanto a do grupo “B” foi de 4.66% (9/193). Dos 11 positivos, 9 foram positivos para *M. ovis*. Tal fato chama atenção para a possível transmissão zoonótica destas bactérias para humanos, em principal para os que mantem contato direto com caprinos.

Baseando-se em diagnósticos moleculares, cinco espécies de micoplasma hemotrópicos foram detectados em humanos: *Mycoplasma haemofelis* semelhante (SANTOS, 2008), *M. suis* do tipo (YUAN, 2009), *M. ovis* (SYKES, 2010), "*Candidatus Mycoplasma haemohominis*" (STEER, 2011), e "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*" (MAGGI et al., 2013).

Este trabalho tem por objetivo a identificação direta de *Mycoplasma* spp. por microscopia óptica e pela Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR), e análise de fatores de risco com positividade para este agente, em caprinos da Paraíba, Nordeste, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

O tamanho amostral foi calculado como previamente descrito por THRUSFIELD (1995). O número total de caprinos no estado da Paraíba em 2014 foi estimado em 507.589 cabeças (BRASIL, 2014) e foi assumida uma prevalência de 50%. Assim, o tamanho mínimo da amostra foi estimado em $n=384$, considerando um nível de confiança de 95%.

Um total de 402 amostras de sangue de caprinos foram coletadas (35 machos e 367 fêmeas) em 8 propriedades distribuídas no estado da Paraíba entre o mês de maio e novembro de 2014. Destas, 5 eram produtoras de leite localizadas nos municípios de Algodão de Jandaíra ($6^{\circ} 53.531' S 35^{\circ} 59.096' O$), Caturité I ($7^{\circ} 24.562' S 36^{\circ} 0.096' O$), Caturité II ($07^{\circ} 23.261' S 36^{\circ} 03.878' O$), Gurjão ($7^{\circ} 14.747' S 36^{\circ} 33.084' O$) e Serra Branca ($7^{\circ} 29.259' S 36^{\circ} 42.335' O$), e 3 produtoras de carne localizadas nos municípios de Cuité ($6^{\circ} 38.356' S 36^{\circ} 09.733' O$), Juarez Távora ($7^{\circ} 09.437' S 35^{\circ} 36.051' O$) e Olivedos ($06^{\circ} 53.039' S 36^{\circ} 13.923' O$) (FIGURA).

As localidades das propriedades foram georreferenciadas usando Sistema Global de Posicionamento (*Global Positioning System* - GPS). As coordenadas foram convertidas para grau decimal e as regiões foram mapeadas utilizando o software Quantum GIS 2.8 (Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, EUA).

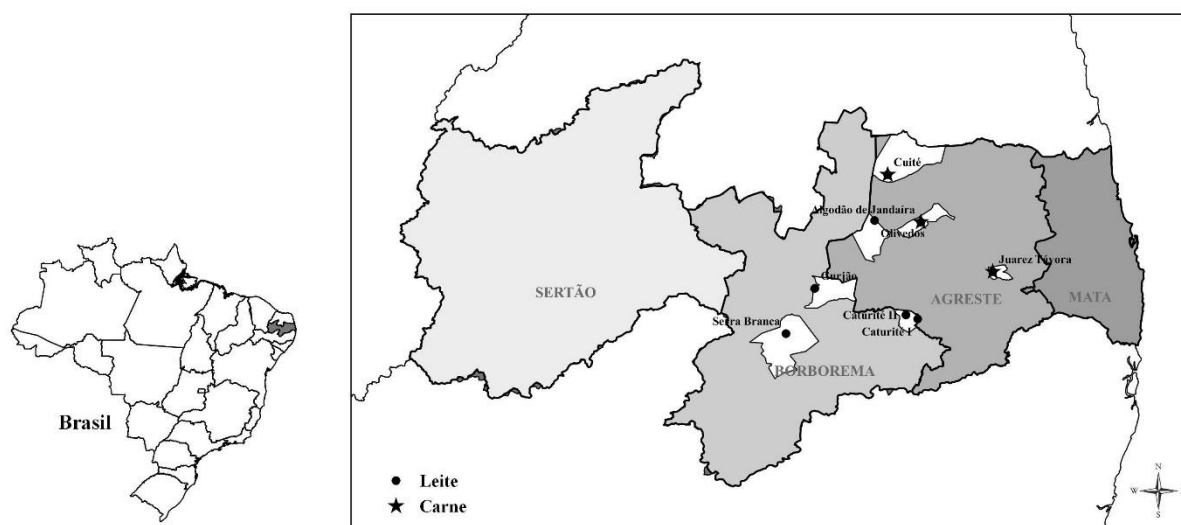


Figura - Localização geográfica das propriedades (produtoras de leite e carne) e mesorregiões do estado da Paraíba, Nordeste, Brasil.

As amostras de sangue foram coletadas por punção de veia jugular usando tubos comerciais contendo EDTA (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA) e foram armazenadas a 4°C até a mensuração do Volume Globular (VG) e Proteínas Plasmáticas Totais (PPT).

Um questionário epidemiológico foi aplicado em cada propriedade com informações dos animais quanto a raça, idade, sexo, presença de carrapatos, e histórico de carrapatos na propriedade. A idade dos animais foi estratificada em dois grupos, ≤ 1 ano e > 1 ano. A propriedade produtora de carne localizada no município de Juarez Távora foi utilizada como controle para análise estatística, por apresentar as melhores práticas de manejo.

2.2. Análise hematológica e detecção direta por esfregaço sanguíneo

Para a mensuração do Volume Globular (VG) e Proteínas Plasmáticas Totais (PPT), foram utilizadas as técnicas de centrifugação de microhematócrito e refratometria, respectivamente. Animais com hematócrito abaixo de 22% foram considerados anêmicos e animais com hipoproteinemia, normoproteinemia e hiperproteinemia foram classificados de acordo com valores descritos anteriormente (KRAMER, 2000).

A detecção direta de hemoplasmas foi realizada pela análise de esfregaços sanguíneos, corados com corantes do tipo Romanovsky (MESSICK, 2004). A leitura das lâminas foi realizada em microscópico óptico, em objetiva de imersão com aumento de 1.000x.

2.3. PCR

2.3.1. Extração de ácido nucléico

As amostras foram mantidas a -80 °C até a análise molecular. O DNA foi extraído a partir de 200 µL de sangue total utilizando um kit comercial (Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Para controle negativo utilizou-se uma amostra contendo água ultra-pura em cada lote de 30 amostras.

2.3.2. PCR

Inicialmente, foi realizada PCR convencional para o gene da desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) (BIRKENHEUER, 2003), para assegurar que a extração do DNA foi bem-sucedida.

Para a detecção molecular de hemoplasmas foram utilizados primers de regiões específicas do gene 16S rRNA (16S_HAEMOforw: GGC CCA TAT TCC T(AG)C GGG AAG; 16S_HAEMOrev: AC(AG) GGA TTA CTA GTG ATT CCA) que amplificaram fragmento de aproximadamente 900 pb (DIECKMANN et al., 2010). Resumidamente, 5 µL de DNA da amostra para a amplificação, numa mistura de reação total de 25 µL contendo tampão de PCR 1X (Invitrogen, Life Technologies™, São Paulo, Brasil), 0,2 mM de trifosfato de desoxinucleótido (dNTP), 1,0 U de Taq DNA polimerase (Platinum® Taq DNA polimerase, Invitrogen™) e 0,2 mM de cada primer.

Após desnaturação inicial a 95 °C durante cinco minutos, a amplificação consistiu em 40 ciclos de amplificação (95 °C durante 60 seg, 59 °C durante 45 seg e 72 °C durante 60 seg), com uma extensão final a 72°C durante cinco minutos. As amostras foram mantidas a 4 °C até serem analisadas. Amostra de sangue de cão positiva para *M. haemocanis* foi usada como controle positivo. Uma amostra negativa para hemoplasma e água ultrapura foram usados como controles negativos. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese e visualizados.

2.4. Análise estatística

O teste de Mann-Whitney não-paramétrico foi utilizado para comparar os valores de VG e PPT entre os animais infectadas e não-infectadas. Para determinar a associação entre a infecção por hemoplasmas e as variáveis independentes, foram utilizados os testes Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. A Razão de Chance (*odds ratio* - OR), intervalo de confiança de 95% e os valores de p foram calculados separadamente para cada variável, sendo considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Os dados foram compilados e analisados utilizando o Software Epi Info™ (versão 7).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 158 (39,30%; IC 95%: 34,42-44,12%) caprinos foram positivos para *Mycoplasma* spp. pela PCR. Com exceção dos animais das propriedades localizadas em Caturité I ($p = 0,9377$) e Algodão de Jandaíra ($p = 0,0664$), todos apresentaram mais chance de estarem infectados com *Mycoplasma* spp. ($p < 0,05$), em comparação com a propriedade de Juarez Távora. Apesar disto, todas as propriedades apresentaram ao menos um caprino positivo. A prevalência de *Mycoplasma* spp. para cada variável está sumarizada na Tabela.

Apesar de não existirem estudos no Brasil acerca da detecção de hemoplasmas em caprinos, a prevalência total de detecção (39,30%) foi diferente dos resultados encontrados em estudos internacionais anteriores, nos quais na Tunísia nenhum caprino foi positivo para presença de *M. ovis* e apenas 6,28% dos ovinos foram positivos (RJEIBI, 2015). Na China a prevalência foi de 50% para machos e 54% para fêmeas na detecção de *M. ovis* por semi-nested PCR (SONG, 2014). Na Hungria foi encontrada uma prevalência de 51,5% (HORNOK, 2009) e 81,8% na Argentina (AGUIRRE, 2009) para detecção de *M. ovis* em ovinos. A justificativa encontrada para uma maior prevalência em ovinos do que em caprinos, é o fato de os caprinos apresentarem uma menor bacteremia quando comparados aos ovinos (DADDOW, 1979), em alguns casos a ausência de bacteremia detectável foi observada em cabras (MASON, 1991) e que a bacteremia pode diminuir no sangue periférico em casos de infecções a longo prazo (FOGGIE, 1964). Esta também pode ser uma explicação para a pouca prevalência em caprinos, já que os vetores necessitam de um alto nível de bacteremia no sangue periférico para poderem transmitir a doença (MASON, 1991).

A média do volume globular (VG) dos caprinos foi de 0,24 L/L. Do total de 402 animais, 118 (29,3%; IC 95%: 25,1-33,9%) estavam anêmicos. O valor médio do VG dos animais positivos para *Mycoplasma* spp. (0,26 L/L) mostrou uma diferença significativa quando comparado aos animais negativos (0,32 L/L) ($p = 0,0002$).

Os resultados encontrados apontam uma diferença significativa entre o valor médio de VG para animais positivos e negativos, o que pode ser causado por alguma infecção concomitante ou pelo microrganismo estudado, sendo necessários, portanto, mais estudos com relação a patogenicidade de *Mycoplasma* spp. em caprinos. Os mecanismos responsáveis pela patogenicidade de micoplasmas ainda não foram completamente definidos, embora as taxas de VG inferiores em animais positivos indiquem que o agente causa anemia hemolítica (MESSICK, 2004). Os hemoplasmas são causadores da anemia hemolítica, contudo há

variações clínicas de animal para animal. Os sinais clínicos são observados quando há alguma predisposição, tais como esplenectomia, imunocomprometimento, infecção concomitante ou infecção por mais de um tipo de micoplasma, porém animais adultos e saudáveis em geral apresentam-se assintomáticos (MESSICK, 2004).

TABELA – Prevalência de *Mycoplasma* spp. em caprinos da Paraíba, Nordeste, Brasil.

<i>Mycoplasma</i> spp. – PCR						
Propriedades		+/n	%	OR	IC 95%	Valor de P
Olivedos		29/50	58,00	4,7183	2,01-11,09	0,0002
Gurjão		29/45	64,44	6,1927	2,55-15,03	0,00002
Caturité I		11/50	22,00	0,9637	0,38-2,44	0,9377
Cuité		2/49	4,08	0,1454	0,03-0,69	0,0065
Algodão de Jandaíra		4/45	8,89	0,3333	0,01-1,12	0,0664
Caturité II		24/50	48,00	3,1538	1,35-7,37	0,0070
Serra Branca		47/60	78,33	12,3526	5,07-30,06	0,0000
Juarez*		12/53	22,64			
Idade	>1	149/336	44,35	5,0463	2,42-10,53	0,000003
	≤1	9/66	13,64			
Gênero	Machos	8/35	22,86	0,4286	0,19-0,97	0,0371
	Fêmeas	150/367	40,87			
Carrapatos	Sim	14/26	53,85	1,8796	0,84-4,18	0,1164
	Não	144/ 376	38,30			
Raça	Parda	71/109	65,14	11,2105	5,63-22,34	0,0000
	Mista	73/195	37,44	3,5902	1,90-6,78	0,00004
	Boer	14/98	14,29			

+ - Total de animais positivos; n – total de animais; IC – Intervalo de confiança

* Propriedade referência para o estudo

A média do PPT para os caprinos foi de 78,0 g/L. Do total de 402 animais, 326 (81,0%; IC 95%: 76,9-84,6%) apresentaram hiperproteinemia e 10 (2,5%; IC 95%: 1,3-4,5%) apresentaram hipoproteinemia. Não houve diferença significativa ($p = 0,0880$) com relação ao PPT entre os caprinos positivos para *Mycoplasma* spp. (80,5 g/L) e os negativos (70,0 g/L). Dos 326 caprinos que apresentaram hiperproteinemia, 131 (40,18%; IC 95%: 35,0-45,6%) foram positivos para *Mycoplasma* spp. por PCR.

Com exceção da propriedade de leite de Caturité I e Algodão de Jandaíra, todas as propriedades restantes eram mais propensas a estarem infectadas pelo *Mycoplasma* sp. do que a propriedade de Juarez Távora.

Os caprinos com mais de um ano de vida apresentaram uma probabilidade maior de estarem infectados com *Mycoplasma* spp. do que os caprinos com menos de um ano de vida ($p = 0,000003$). Qualquer atividade que transmite glóbulos vermelhos infectados de um animal para outro pode espalhar a infecção. Portanto, a vacinação, marcação de orelha, ou quaisquer outros procedimentos que causem sangramento podem disseminar a infecção entre os membros do rebanho. Vetores, como piolhos, pulgas, carrapatos e mosquitos também podem transmitir o agente (MESSICK, 2004). Como um animal adulto pasteja por áreas mais longas e mais afastadas do que os animais mais jovens, este tem mais contato com outros animais possivelmente infectados, sendo assim mais fácil ao animal contrair o agente. A transmissão vertical do micoplasma só foi observada em gatos, suínos e camelídeos (MESSICK, 2004). Esta pode ser ainda mais uma explicação do porquê de os animais mais jovens ainda não estarem infectados pelo agente, já que esta possivelmente não é transmitida de mãe para filho, caso fosse os animais jovens apresentariam uma alta prevalência.

Os caprinos machos, e os animais da raça parda ($p = 0,000$) e de raça mista ($p = 0,00004$) possuem maior probabilidade de serem positivos para *Mycoplasma* spp. que os caprinos da raça Boer. Em estudos realizados com cães e gatos, foi mostrado que como os machos percorriam maiores distancias que as fêmeas, estes apresentavam uma maior propensão de serem infectados. Como este estudo refere-se a animais confinados, tal achado deve ser melhor analisado em estudos futuros.

Nenhuma associação foi encontrada entre os positivos para *Mycoplasma* spp. e a presença de carrapatos ($p = 0,1164$). Moscas e mosquitos hematófagos (*Stomoxys calcitrans* e *Aedes aegypti*) e piolhos (*Polyplax serrata* e *P. spinulosa*) foram implicados na transmissão do micoplasma em estudos anteriores. Entretanto, não foi possível avaliar se algum outro vetor possuía algum potencial de transmissibilidade neste estudo.

Com relação a caprinos que apresentaram resultado negativo para detecção de *Mycoplasma* spp., podemos inferir algumas hipóteses: 1 – O animal realmente não apresentara o agente; 2 – O caprino possui uma resistência ao microrganismo estudado; 3 – A amostra foi insuficiente para detecção pela técnica proposta; 4 – A técnica utilizada não apresenta grande sensibilidade. Apesar da PCR ser uma técnica de sensibilidade alta, é sabido que existem poucos estudos acerca da detecção de *Mycoplasma* spp. em caprinos. Portanto, mais estudos são necessários para definir se as propostas são corretas ou não.

Na análise de esfregaços sanguíneos de ponta de orelhas, por meio de microscopia direta, foi constatado que 0 (0%) animais apresentavam micoplasmas hemotrópicos. Com os resultados obtidos deste estudo, é possível inferirmos algumas suposições, dentre as quais, que o método de detecção direta de *Mycoplasma* spp. por meio da leitura de lâminas por microscopia direta possui baixa sensibilidade. Além disso, a maioria dos animais não apresenta sinais clínicos, sustentando o fato destes animais possuírem um baixo nível de parasitemia, sendo necessário técnicas de maior sensibilidade (DADDOW, 1979).

Um estudo realizado com *Mycoplasma haemofelis* (LAPPIN, 2002) mostra a baixa sensibilidade deste método de detecção direta, além do fato de o microrganismo ser confundido com debris celulares e artefatos. Sykes et al. (2007) também mostra em seu trabalho a baixa sensibilidade da técnica de detecção direta por leitura de esfregaços.

Para um melhor entendimento do microrganismo estudado em meio ao ambiente proposto, faz-se necessário a realização de análise filogenética, como o sequenciamento das amostras para se determinar a espécie envolvida na população estudada. Existem poucos dados disponíveis sobre a infecção de micoplasmas hemotrópicos na literatura nacional e internacional, sendo preciso mais pesquisas para este agente.

4. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a alta prevalência de micoplasmas hemotrópicos nas propriedades avaliadas no estado da Paraíba possui uma associação positiva com fatores de risco como idade (mais de 1 ano de vida), gênero (machos) e raça (raça parda e raça mista).

O quadro clínico encontrado de VG reduzido em animais positivos sustenta a severidade do agente no comprometimento dos eritrócitos.

Concluiu-se ainda que existe um alto risco de contração deste agente pelos humanos, sendo considerado assim um problema de saúde pública. Portanto, deve-se implementar um sistema de monitoramento de saúde regional animal para detectar qualquer aumento da prevalência de doenças transmitidas por artrópodes. Assim como, médicos veterinários também devem incluir este patógeno no diagnóstico diferencial de doenças transmitidas por artrópodes.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, D.H.; THOMPSON, C.; NEUMANN, R.D.; SALATIN, A.O.; GAIDO, B.A.; DE ECHAIDE, S.T. Clinical mycoplasmosis outbreak due to *Mycoplasma ovis* in sheep from Shalta, Argentina. Clinical, microbiological and molecular diagnosis. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 41, n. 4, p. 212–214, out/dez. 2009.

AHUYA, C.O.; OKEYO, A.M.; MWANGI-NJURU; PEACOCK, C. Developmental challenges and opportunities in the goat industry: The Kenyan experience. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 197-206. Out. 2005.

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

BOES, K.M.; GONCAROV, K.O.; THOMPSON, C.A.; HALIK, L.A.; SANTOS, A.P.; GUIMARAES, A.M.; FEUTZ, M.M.; HOLMAN, P.J.; VEMULAPALLI, R.; MESSICK, J.B. Identification of a *Mycoplasma ovis*-like organism in a herd of farmed white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in rural Indiana. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, p. 77–83, março 2012.

BRASIL. Banco de dados: **IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)**, 2014. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2014/. Acesso em: 01 mar. 2016.

CAMPBELL, R.W.; SLOAN, C.A.; HARBUTT, P.R. Observation on mortality in lambs in Victoria associated with *Eperythrozoon ovis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, n. 11, p. 538–541, nov. 1971.

DADDOW, K.N. The transmission of a sheep strain of *Eperythrozoon ovis* to goats and the development of a carrier state in the goats. **Australian Veterinary Journal**, v.55, p.605, 1979.

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, p. 351-353, 26 out. 2010.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Banco de dados FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/E>. Acesso em: 01 mar. 2016.

FOGGIE, A.; NISBET, D. I. Studies on *Eperythrozoon* infection in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 74, p. 45–61, 1964.

GONÇALVES, O.J. Entre bois e cabras: uma visão histórica sobre mentalidades e valores nos sertões. **Estudos Históricos**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 47, p. 49-68, jan/jun 2011.

GRAZZIOTIN, A.L.; DUARTE, J.M.; SZABÓ, M.P.; SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; MOHAMED, A.; VIEIRA, R.F.; DE 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, 22 jun 2011a.

GRAZZIOTIN, A.L.; SANTOS, A.P.; GUIMARAES, A.M.; MOHAMED, A.; CUBAS, Z.S.; DE OLIVEIRA, M.J.; DOS SANTOS, L.C.; DE MORAES, W.; VIEIRA, R.F.; DONATTI, L.; DE BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma ovis* in captive cervids: prevalence, molecular characterization and phylogeny. **Veterinary Microbiologist**, v. 152, p. 415–419, 28 set 2011b.

GULLAND, F.M.; DOXEY, D.L.; SCOTT, G.R. The effects of *Eperythrozoon ovis* in sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 43, n. 1, p. 85–87, jul. 1987.

HORNOK, S.; HAJTÓS, I.; MELI, M.L.; FARKAS, I.; GÖNCZI, E.; MEILI, T.; HOFMANN-LEHMANN, R. First molecular identification of *Mycoplasma ovis* and ‘*Candidatus M. haemoovis*’ from goat, with lack of haemoplasma PCR-positivity in lice. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 60, p. 355–360, 17 ago 2012.

HORNOK, S.; MELI, M.L.; ERDOS, A.; HAJTÓS, I.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection.

Veterinary Microbiolog, v. 136, p. 372–377, 29 out 2009.

HU, Z.; YIN, J.; SHEN, K.; KANG, W.; CHEN, Q. Outbreaks of hemotropic mycoplasma infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1139–1140, jul 2009.

IÑIGUEZ, L. Goats in resource-poor systems in the dry environments of West Asia, Central Asia and the Inter-Andean valleys. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 137-144, fev 2004.

KRAMER, J.W. Normal hematology of Cattle, Sheep, and goats In: FELDMAN, B.; ZINKL, J.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Cap.166, p. 1075-1084, 2000.

LAPPIN, M.R.; TASKER, S. Haemobartonella felis: recente developments in diagnosis and treatment. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 4, p. 3-11, 2002.

MAGGI, R.G.; COMPTON, S.M.; TRULL, C.L.; MASCARELLI, P.E.; MOZAYENI, B.R.; BREITSCHWERDT, E.B. Infection with Hemotropic Mycoplasma Species in Patients with or without Extensive Arthropod or Animal Contact. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. v10, p. 3237-3241, out 2013a.

MAGGI, R.G.; MASCARELLI, P.E.; HAVENGA, L.N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E.B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasites Vectors*, v. 6, p. 103, 15 abr 2013b.

MARTINS, E.C.; WANDER, A.E.; CHAPAVAL, L.; BOMFIM, M.A.D. O mercado e as potencialidades do leite de cabra na cidade de Sobral: a visão do consumidor. In: **Congresso Brasileiro De Sistemas De Produção**, 7., 2007, Fortaleza. Agricultura familiar, políticas públicas e inclusão social: anais. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 1 CD-ROM.

MASON, R.W.; CORBOULD, A.; STATHAM, P. A serological survey of *Eperythrozoon ovis* in goats and sheep in Tasmania. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, n. 4, p. 122-3. 1989a

MASON, R.W.; CORBOULD, A.; STATHAM, P. Experimental *Eperythrozoon ovis* infection in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, p. 221–222, 1989b.

MASON, R. W.; STATHAM, P. The determination of the level of *Eperythrozoon ovis* parasitaemia in chronically infected sheep and its significance to the spread of infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 3, p. 115–116, mar 1991.

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

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, p. 365–371, 01 mar 2004.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*,’ ‘*Candidatus ycoplasma haemomuris*,’ ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 891-899, maio 2001.

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

NEIMARK, H.; KOCAN, K.M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a mycoplasma. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 156, p. 287–291. 1 nov 1997.

PAPACHRISTOFOROU, C.; MARKOU, M. Overview of the economic and social importance of the livestock sector in Cyprus with particular reference to sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 62, p. 193-199, abr 2006.

PEACOCK, C. Goats – A pathway out of poverty. **Small Ruminant Research**, v. 60, p. 179-186, out 2005.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.4, p. 1084-1156, dez 1998.

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

RJEIBI, M.R.; DARGHOUTH, M.A.; OMRI, H.; SOUIDI, K.; REKIK, M.; GHARBI, M. First molecular isolation of *Mycoplasma ovis* from small ruminants in North Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 82, Art. #912, 5 pages, 8 jun 2015.

SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; OLIVEIRA, S.T.; GUIMARAES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H.A.; GONZALEZ, F.H.; MESSICK, J.B. Hemoplasma infection in HIV-positive, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1922-1924, dez 2008.

SONG, W.; SONG, Q.; HE, L.; ZHOU, Y.; ZHAO, J. The establishment and application of a semi-nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma ovis*. **Small Ruminant Research**, v. 119, n. 1–3, p. 176–181, jun 2014.

STEER, J.A.; TASKER, S.L BARKER, E.N.; JENSEN, J.; MITCHELL, J.; STOCKI, T.; CHALKER, V.J.; HAMON, M. A novel hemotropic *Mycoplasma* (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 53, n. 11, p. e147-e151, dez 2011.

STOFFREGEN, W.C.; ALT, D.P.; PALMER, M.V.; OLSEN, S.C.; WATERS, W.R.; STASKO, J.A. Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 249–258, 2006.

SYKES, J.E.; DRAZENOVICH, N.L.; BALL, L.M.; LEUTENEGGER, C.M. Detection of mixed infection with “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal Veterinary Diagnosis Investigate**, n.19, p. 250-255, 2007.

SYKES, J. E.; LINDSAY, L. L.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Human co-infection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3782–3785, out. 2010.

TAGAWA, M.; TAKEUCHI, T.; FUJISAWA, T.; KONNO, Y.; YAMAMOTO, S.; MATSUMOTO, K.; YOKOYAMA, N.; INOKUMA, H. A clinical case of severe anemia in a sheep coinfecting with *Mycoplasma ovis* and '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' in Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, p. 99-102, jan. 2012.

THRUSFIELD M. Veterinary Epidemiology. **Blackwell Science Ltd.**, London, 1995.

YANG, D.; TAI X, QIU. Y.; YUN, S. Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. **Epidemiology and Infection**, v. 125, p. 421–426, out 2000.

YUAN, C.L.; LIANG, A.B.; YAO, C.B.; YANG, Z.B.; ZHU, J.G.; CUI, L.; YU, F.; ZHU, N.Y.; YANG, X.W.; HUA, X.G. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 7, p. 890–894, jul 2009.