

Alta Detecção de Infecção por Micoplasmas Hemotrópicos em Primatas de Vida Livre da Amazônia Brasileira

Henrique Christino Lial

Aricia Duarte Benvenuto, Victor Yunes,

José Luiz Catão-Dias

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo

henriquelial@usp.br

Objetivos

Os objetivos do projeto foram investigar a ocorrência de hemoplasmas em amostras de sangue de primatas não-humanos, realizar a caracterização molecular dos hemoplasmas encontrados, e comparar as informações epidemiológicas de indivíduos positivos e negativos para hemoplasmas.

Métodos e Procedimentos

Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo ICMBio (SISBIO 60528-6) e submetidos para avaliação da CEUA-FMVZ (protocolo 2884140322). Foram testadas amostras de sangue total de 70 indivíduos, compreendendo nove espécies de primatas neotropicais: bugio-preto (*Alouatta caraya*, n=7), macaco-da-noite (*Aotus vociferans*, n=6), macaco-aranha-peruano (*Ateles chamek*, n=4), macaco-aranha-de-cara-branca (*Ateles marginatus*, n=11), caxiú-de-nariz-branco (*Chiropotes albinasus*, n=15), sagui de Snethlage (*Mico emiliae*, n=7), guigó (*Plecturocebus vieirai*, n=2), zogue-sogue de alta floresta (*Plecturocebus grovesi*, n=8), e macaco-prego (*Sapajus apella*, n=10), coletadas na Usina Hidroelétrica e no Parque Florestal de SINOP entre fevereiro e junho de 2019. O DNA total das amostras foi extraído com um kit comercial de colunas de sílica. Como método de triagem para detecção de *Mycoplasma* spp., foi realizado um protocolo de PCR em tempo real universal adaptado de Cabello *et al.*, (2013), o qual amplifica um fragmento de aproximadamente 334 pares de bases do gene 16S rRNA. Para a

caracterização dos agentes amplificados nas amostras positivas, foi aplicado um protocolo de PCR nested adaptado de Iso *et al.*, (2013), o qual amplifica um fragmento de 1100-1400 pb do mesmo gene. A detecção dos fragmentos amplificados foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR SAFE, e os amplicons com o tamanho similar ao esperado foram enviados para sequenciamento do tipo Sanger. Em seguida, as sequências obtidas foram comparadas às mais próximas disponíveis nas bases de dados GenBank/EMBL/DDBJ utilizando a ferramenta BLAST, e então alinhadas utilizando o software MEGA7. Para as análises estatísticas, foram utilizados os testes apropriados para avaliar a correlação entre a infecção por micoplasmas hemotrópicos e o sexo, classe etária, sítio de coleta, e presença de ectoparasitas.

Resultados

Dos animais testados, 62 (88,6%) foram positivos no protocolo de triagem, sendo destes 22/22 (100%) Atelidae, 7/7 (100%) Callitrichidae, 22/25 (88%) Pitheciidae, 8/10 (80%) Cebidae e 2/6 (33.3%) Aotidae. A análise preliminar das sequências mostrou 95-100% de identidade em relação às sequências de *Mycoplasma* spp. mais próximas no GenBank (AB820288, AF338269, KT314163, MH734379), todas descritas em primatas não humanos. A análise estatística não mostrou correlações significantes entre a infecção e classe etária, sexo, local de coleta ou infestação por ectoparasitas.

Conclusões

A prevalência de hemoplasmas em primatas neotropicais encontrada neste estudo é mais alta do que as descritas previamente (4,2% - 64,3%) e, de acordo com a literatura científica consultada pelos autores, trata-se da primeira descrição do agente nas famílias Callitrichidae e Pitheciidae, e no gênero *Ateles*. Os resultados da análise estatística indicam que os hemoplasmas afetam igualmente todas as populações estudadas, e sugerem que podem existir rotas diretas e indiretas de transmissão. Estudos futuros pretendem determinar se há correlação entre a infecção por micoplasmas hemotrópicos e alterações hematológicas, além de elaborar a árvore filogenética dos *Mycoplasma*, incluindo as sequências obtidas.

Referências Bibliográficas

CABELLO J., ALTET L.; NAPOLITANO C.; et al. Survey of infectious agents in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*): High prevalence and diversity of hemotrophic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 448-454, 2013.

ISO T.; SUZUKI J.; SASAOKA F.; et al; Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **Veterinary Microbiology** v. 163, n. 1-2, p. 184-189, 2013

High detection rate of hemoplasma infection in free-ranging Neotropical primates from the Brazilian Amazon

Henrique Christino Lial

Aricia Duarte Benvenuto, Victor Yunes,

José Luiz Catão-Dias

School of Veterinary Medicine and Animal Science

henriquelial@usp.br

Objectives

The objectives of this studies were to investigate the occurrence of hemotropic mycoplasmas in blood samples of free-ranging neotropical primates, to molecularly characterize the found hemoplasmas, and to compare the epidemiological data from positive and negative individuals.

Materials and Methods

All of the performed procedures were approved by ICMBio (SISBIO 60528-6) and submitted for evaluation by CEUA-FMVZ (protocol 2884140322). Whole blood samples from 70 individuals were tested, comprising nine species of neotropical primates: black howler (*Alouatta caraya*, n=7), Spix's night monkey (*Aotus vociferans*, n=6), black spider monkey (*Ateles chamek*, n=4), white-whiskered spider monkey (*Ateles marginatus*, n=11), white-nosed saki (*Chiropotes albinasus*, n=15), Emilia's marmoset (*Mico emiliae*, n=7), Vieira's titi (*Plecturocebus vieirai*, n=2), Groves' titi (*Plecturocebus grovesi*, n=8), tufted capuchin (*Sapajus apella*, n=10), collected in the Hydroelectric Power Plant and the Forest Park of SINOP between February and June 2019. Total DNA from the samples was extracted with a commercial silica column kit. As a screening method for the detection of *Mycoplasma* spp., a universal real-time PCR protocol, adapted from Cabello *et al.*, (2013), targeting a fragment of approximately 334 base pairs of the 16S rRNA gene, was performed. For the characterization

of the agents amplified in the positive samples, a nested PCR protocol adapted from Iso *et al.*, (2013) was applied, targeting a 1100-1400bp fragment of the same gene. The detection of the amplified fragments was performed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel, stained with SYBR SAFE, and amplicons with the expected were sent for Sanger-type sequencing. Then, the sequences obtained were compared to the closest ones available in the GenBank/EMBL/DDBJ databases using the BLAST algorithm, and then aligned using the MEGA7 software. For statistical analyses, appropriate tests were used to assess the correlation between the infection by hemotropic hemoplasmas and sex, age group, collection site, and presence of ectoparasites.

Results

Overall, 62 (88.6%) non-human primates were positive to the screening protocol, of which 22/22 (100%) were Atelidae, 7/7 (100%) were Callitrichidae, 22/25 (88%) were Pitheciidae, 8/10 (80%) Cebidae and 2/6 (33.3%) Aotidae. The preliminary analysis of the retrieved sequences showed 95-100% identity to the closest hemoplasma sequences available on GenBank (AB820288, AF338269, KT314163, MH734379), detected in NTP. Statistical analysis showed no significant correlation between infection and age group, sex, collection site or ectoparasite infestation

Conclusions

The prevalence of hemoplasmas found in this study is high in comparison with those previously described in non-human primates (4.2% - 64.3%), and according to the scientific literature consulted by the authors, this is the first description of the agent in the Callitrichidae and Pitheciidae families, and in the *Ateles* genus. The results of the statistical analysis indicate that hemoplasmas affect all the studied populations equally, and suggest that there may be direct and indirect routes of transmission. Future studies intend to determine whether there is a correlation between infection by hemotropic mycoplasmas and hematological alterations, and to build the phylogenetic tree of *Mycoplasma* including the obtained sequences.

References

CABELLO J., ALTET L.; NAPOLITANO C.; et al. Survey of infectious agents in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*): High prevalence and diversity of hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 167, p. 448-454, 2013.

ISO T.; SUZUKI J.; SASAOKA F.; et al; Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **Veterinary Microbiology** v. 163, n. 1-2, p. 184-189, 2013