



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS.**

SALATIEL RIBEIRO DIAS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PIROPLASMÍDEOS E
ANAPLASMATACEAE sp. EM BUBALINOS (*Bubalus bubalis*)
NO BAIXO AMAZONAS**

**SANTARÉM-PARÁ
2022**

SALATIEL RIBEIRO DIAS

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PIROPLASMÍDEOS E
ANAPLASMATACEAE sp. EM BUBALINOS (*Bubalus bubalis*)
NO BAIXO AMAZONAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Biociências.

Orientador: Antonio Humberto Hamad Minervino

**SANTARÉM-PARÁ
2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

D541d Dias, Salatiel Ribeiro
Detecção molecular de Piropasmídeos e *Anaplasmatáceas* sp. em bubalinos
(*Bubalus bubalis*) no Baixo Amazonas / Salatiel Ribeiro Dias. – Santarém, 2022.
59 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Antônio Humberto Hamad Minervino
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação Tecnológica, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Búfalos. 2. Theileira. 3. Anaplama. 4. Babesia. 5. Ectoparasitas. 6. Fatores de risco. I. Minervino, Antônio Humberto Hamad, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 636.293098115

Bibliotecária - Documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB/2 566



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
COORDENAÇÃO DO INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS



ATA CIBEF/IBEF/REITORIA/UFOPA Nº 7, DE 09 DE
AGOSTO DE 2022

Ao oitavo dia do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e dois às 9 horas e 30 minutos, por videochamada <https://meet.google.com/vmr-ngss-hpa>, instalou-se a banca Examinadora e Julgadora da Dissertação do Mestrando SALATIEL RIBEIRO DIAS. A banca examinadora foi composta pelos professores Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino, PRESIDENTE; examinador externo, Dr. Fábio Edir Amaral Albuquerque, PPGSND – UFOPA; examinador interno, prof. Dr. Waldiney Pires Moraes, UFOPA. Deu-se a abertura dos trabalhos, por parte do professor Antonio Humberto Hamad Minervino, Orientador da Pesquisa, que, após apresentar os membros da banca Examinadora e Julgadora e esclarecer a tramitação do procedimento para a defesa, de imediato, solicitou a(o) Mestrando (a) que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada DETECÇÃO MOLECULAR DE PIROPLASMÍDEOS E ANAPLASMATACEAE sp. EM BUBALINOS (*Bubalus bubalis*) NO BAIXO AMAZONAS, marcando um tempo de 35 minutos de apresentação. Concluída a exposição, o Prof. Antonio Humberto Hamad Minervino, Presidente, passou a palavra ao examinador externo, Dr. Fábio Edir Amaral Albuquerque, para arguir o candidato ao título de Mestre em Biociências, e, em seguida, ao examinador interno, Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes, na mesma condição, para que fizesse o mesmo. Após, exibiu suas considerações sobre o trabalho em julgamento; tendo sido considerado **aprovado**; o Mestrando, conforme as normas vigentes na Universidade Federal do Oeste do Pará. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, em até 30 (trinta) dias, via procedimentos para a conclusão, no SIGAA; contendo as modificações sugeridas pela banca Examinadora e Julgadora constante na folha de correção anexa. Conforme exigência deste Programa, o orientando não obterá o título se não comprovar a submissão de artigo científico para publicação.

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 16:51)
ANTONIO HUMBERTO HAMAD MINERVINO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CPPGSND (11.01.02.06.01)
Matrícula: ###439#3

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 18:52)
WALDINEY PIRES MORAES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
ISCO (11.01.45)
Matrícula: ###343#5

(Assinado digitalmente em 08/08/2022 13:55)
FÁBIO EDIR AMARAL ALBUQUERQUE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.112-##

(Assinado digitalmente em 09/08/2022 08:19)
SALATIEL RIBEIRO DIAS
DISCENTE
Matrícula: 2020#####6

Dedico a Deus que é meu porto seguro e nunca me abandonou.

Aos meus amigos e familiares que me ajudaram direta e indiretamente ao longo dessa caminhada. A minha mãe, Maria Onidi (*In memoriam*) que carrego em meus pensamentos aonde quer que eu esteja.

É por vocês que dedico a minha vitória.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus** por me conceder saúde e força de vontade para seguir firme em busca de meus sonhos e objetivos.

Agradeço aos meus irmãos, em especial, **Samuel**, pelo apoio, carinho e amizade.

Agradeço a toda a família Ribeiro, pelo carinho, amizade, apoio, parceria, e lembrar que juntos somos mais fortes.

Ao meu orientador **Antonio Humberto Hamad Minervino**, por ter aceitado me orientar ajudando em todos os momentos que precisei.

Agradeço a equipe do Laboratório de Sanidade Animal – LARSANA/UFOPA

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que contribuíram direto e indiretamente com o desenvolvimento desse trabalho, o meu muito obrigado.

“Faça o seu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda”
(Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) se mostram bem adaptados na Amazônia, em especial no estado do Pará, no entanto são escassas as informações sobre aspectos sanitários dos rebanhos. As doenças transmitidas por carrapatos como a Piroplasmose e a Anaplasmosose causam importantes perdas em rebanhos bovinos, no entanto ainda existe um debate sobre o grau de susceptibilidade de bubalinos à estas doenças bem como faltam informações sobre a caracterização destes patógenos que infectam bubalinos. O presente estudo objetivou determinar a prevalência e os possíveis fatores de riscos associados à infecção por Piroplasmida e *Anaplasma sp.* em bubalinos na região do Baixo Amazonas e caracterizar molecularmente estes patógenos infectantes de bubalinos na região. Foi realizado um estudo transversal considerando dois níveis de amostragem (fazenda e animal) sendo obtidas 621 amostras de sangue total de bubalinos oriundos de 60 propriedades na região, incluindo áreas de várzea e de terra firme. Ectoparasitas presentes nos bubalinos foram coletados e foi aplicado questionário epidemiológico. Amostras de sangue total e ectoparasitas foram submetidas à extração de DNA e análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers (BAB2), BAB-143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') senso e BAB-694-667 (5'-GCACTCTARTCTCAAAG-3) anti-senso que amplifica um fragmento de 551 pb do gene 18S rRNA da ordem Piroplasmida e o primer EHR16SD rRNA que amplifica fragmento de 344 pb do gene 16S rRNA de quase todos os membros da família *Anaplasmataceae*. Amostras positivas na PCR foram submetidas à sequenciamento no BLAST para análises de caracterização e identificação das espécies. Os resultados obtidos mostraram a prevalência de 2,09% de Piroplasma sp. A análise dos fatores de risco entreanimais apresentou resultados significativos nos fatores relacionados a faixa etária, local da propriedade, realização de controle de ectoparasitas e se existia a presença de animais silvestres. Já na análise de Fatores de risco entre fazendas, os bubalinos amostrados em áreas de terra firme possuíam 4,5 vezes (1-19, 95% IC) maior risco de estarem infectados com Piroplasma em comparação aos animais mantidos na Várzea. Dentre os 13 animais positivos, o resultado do sequenciamento permitiu a identificação de cinco amostras ao nível de espécie não sendo possível identificar todas as amostras positivas. Cinco búfalos eram positivos para *Theileria*, sendo quatro búfalos infectados por *Theileria buffeli* e um infectado por *Theileria occidentalis*. Em relação aos ectoparasitas, dos 95 coletados, oito carrapatos foram positivos na PCR para Piroplasmida, porém nenhuma amostra houve sucesso no sequenciamento e identificação da espécie. Com relação a Anaplasmataceae,

somente dois animais foram positivos, assim a prevalência foi de apenas 0,32% (0,04-1,16, 95% IC), deste modo, devido ao número reduzido de animais positivos, a análise de fatores de risco é considerada irrelevante. O sequenciamento dos animais positivos, revelou infecção por *Anaplasma platys* com 99,42% de similaridade e *Anaplasma phagocytophilum* com 98,49% de similaridade. Um búfalo positivo tinha piolho, no entanto nenhum tinha carrapato. O presente estudo identificou pela primeira vez *Theileria buffeli* e *Theileria occidentalis*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* em bubalinos na região do Baixo Amazonas.

Palavras-chave: Búfalos. Theileira. Anaplama. Babesia. Ectoparasitas. Fatores de risco.

ABSTRACT

Buffaloes (*Bubalus bubalis*) are well adapted in the Amazon, especially in the state of Pará, however information on health aspects of the herds is scarce. Diseases transmitted by ticks such as Piroplasmosis and Anaplasmosis cause important losses in cattle herds, however there is still a debate about the degree of susceptibility of buffaloes to these diseases as well as information on the characterization of these pathogens that infect buffaloes is lacking. The present study aimed to determine the prevalence and possible risk factors associated with infection by Piroplasmid and *Anaplasma* sp. in buffaloes in the Lower Amazon region and to molecularly characterize these pathogens infecting buffaloes in the region. A cross-sectional study was carried out considering two sampling levels (farm and animal) and 621 samples of whole blood of buffaloes were obtained from 60 properties in the region, including floodplain and dry land areas. Ectoparasites present in buffaloes were collected and an epidemiological questionnaire was applied. Whole blood and ectoparasite samples were subjected to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) analysis using primers (BAB2), BAB-143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') sense and BAB-694-667 (5'-GCACTCTARTCTCAAAG-3) antisense that amplifies a 551 bp fragment of the 18S rRNA gene of the Piroplasmid order and the EHR16SD rRNA primer that amplifies a 344 bp fragment of the 16S rRNA gene from almost all members of the Anaplasmatacea family. PCR positive samples were submitted to BLAST sequencing for characterization and species identification analysis. The results obtained showed a prevalence of 2.09% of *Piroplasma* sp. The analysis of risk factors among animals showed significant results in factors related to age group, location of the property, performance of ectoparasite control and whether there was the presence of wild animals. In the analysis of Risk Factors between farms, the buffaloes sampled in areas of dryland had 4.5 times (1-19, 95% CI) greater risk of being infected with *Piroplasma* compared to animals kept in wetland. Among the 13 positive animals, the sequencing result allowed the identification of five samples at the species level, not being possible to identify all the positive samples. Five buffaloes were positive to *Theileria*, with four buffaloes infected with *Theileria buffeli* and one infected with *Theileria Occidentalis*. Regarding ectoparasites, of the 95 collected, eight ticks were positive in PCR for Piroplasmid, but no sample was successful in sequencing and identifying the species. Regarding Anaplasmataceae, only two animals were positive, so the prevalence was only 0.32% (0.04-1.16, 95% CI), thus, due to the reduced number of positive animals, the analysis of factors risk is considered irrelevant.

The sequencing of positive animals revealed infection by *Anaplasma platys* with 99.42% similarity and *Anaplasma phagocytophilum* with 98.49% similarity. One positive buffalo had lice, however none had ticks. The present study identified for the first time *Theileria buffeli* and *Theileria Occidentalis*, *Anaplasma platys* and *Anaplasma phagocytophilum* in buffaloes in the Lower Amazon region.

Keywords: Buffaloes. Theileira, Anaplama, Babesia, Ectoparasites, Risk factors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Posicionamento filogenético das sequencias de *Anaplasma sp.* amplificadas em bubalinos no Baixo Amazonas.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Fatores de risco associados a presença de *Piroplasma sp.* em bubalinos.

TABELA 2. Relação dos fatores de riscos relacionados a presença de Piroplasmídeos nas propriedades.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- ABCB** – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
- ADEPARA** – Agencia de Defesa Agropecuária do Estado do Pará.
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA** - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.
- FAO** – Food and Agriculture Organization
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IFA** – Imunofluorescência Indireta
- LARSANA** – Laboratório Sanidade Animal
- M** – Molar
- Ng** – Nanogramas
- Pb** – Pares de bases
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- Pg** – Picograma
- pH** - Potencial Hidrogeniônico
- RNA** – Ácido Ribonucleico
- TE** – Tris EDTA
- TPB** – Tristeza Parasitaria Bovina
- UFOPA** – Universidade Federal do Oeste do Pará
- UV** – Ultravioleta
- V** – Volts
- μL** – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Histórico da bubalinocultura	19
2.2 Aspectos produtivos.	19
2.3 Aspectos reprodutivos.	20
2.4 Aspectos de sanidade.	20
2.5 Reação em cadeia da polimerase.	21
2.6 Anaplasma	22
2.6.1 Ciclo de vida.....	23
2.6.2 <i>Anaplasma marginale</i>	23
2.6.3 <i>Anaplasma centrale</i>	24
2.6.4 Impactos econômicos da anaplasmosose	25
2.6.5 Métodos de diagnóstico de anaplasma.....	25
2.7 Babesia	26
2.7.1 Métodos de diagnóstico	27
2.8 Theileria	27
2.8.1 Theileriose tropical	28
2.8.2 Febre da costa leste	28
2.8.3 Métodos de diagnóstico	29
2.8.3.1 Diagnóstico laboratorial	29
2.8.3.2 Diagnóstico imunológico.....	29
2.8.3.3 Diagnóstico molecular	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E METODOS	32
4.1 Área de estudo	32
4.2 Delineamento experimental	32
4.3 Coleta e processamento das amostras de sangue.	33
4.4 Coleta de ectoparasitas	33
4.5 Extração de DNA	33
4.5.1 Carrapatos e piolhos	33
4.5.2 Sangue total.....	34

4.6	Quantificação do DNA extraído	34
4.7	Deteção molecular de patógenos	34
4.8	Análise estatística	35
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Prevalência de anaplasma	36
5.2	Prevalência de piroplasmas.	37
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	47

1 INTRODUÇÃO

Os búfalos se mostram super adaptados na Amazônia, em especial no estado do Pará. No entanto, a precariedade da sanidade dos animais, devido a carência de manejo adequado, constitui um dos principais desafios na sua cadeia produtiva, uma vez que a falta de diagnóstico contribui pra a disseminação de doenças, trazendo consigo, prejuízos aos produtores. Outro aspecto que limita o manejo sanitário pauta-se nas condições climáticas da região, apresentando altos índices pluviométricos na época do inverno (LOURENÇO JÚNIOR e GARCIA, 2008).

De acordo com dados do IBGE (2017), a região norte apresenta o maior rebanho bubalino do país, concentrando cerca de 66% do efetivo, sendo que os estados do Amapá e Pará, juntos, reúnem cerca de 60% do rebanho. E no Pará, a maior parte de concentra no arquipélago Ilha de Marajó, a maior ilha fluviomarítima do planeta.

No que se refere a região oeste do estado do Pará, dados da Adepará mostram que a cidade de Santarém se destaca na bubalinocultura, apresentando um rebanho de aproximadamente 8.400 cabeças, advindas de 232 propriedades rurais.

Os búfalos são considerados animais de dupla aptidão (carne e leite) e apresentam algumas vantagens frente aos bovinos, dentre elas a maior capacidade de aproveitamento de forragem de baixa qualidade (HUHN et al., 1986), como também sua adaptabilidade à diferentes tipos de ambientes, o que abre possibilidades para bubalinocultura em regiões menos favoráveis à criação de bovinos, como por exemplo as regiões de várzea (MINERVINO et al., 2008; VALE et al., 2013).

Apesar da alta rusticidade dos bubalinos, a espécie é afetada por uma grande diversidade de parasitas, no entanto são escassos os estudos sobre a prevalência de ectoparasitas e de patógenos transmitidos por carrapatos (SILVA et al., 2014). Dentre as doenças que acometem bubalinos, pode-se destacar a anaplasmose, causada por bactérias do gênero *Anaplasma* e a piroplasmose, causa por parasitas dos gêneros *Babesia* e/ou *Theileria*, que constituem doenças de grande interesse econômico para a pecuária, uma vez que causam grandes prejuízos aos produtores.

Em bovinos, a anaplasmose é causada por bactérias intraeritrocitárias obrigatórias *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale*, tendo os carrapatos como os principais vetores (DAHLGREN et al., 2011). Já a theileriose, também conhecida por piroplasmose, é causada pelos protozoários hemoparasitas intracelulares *Theileria annulata* e *Theileria parva*, tendo, também, o carrapato como seu principal transmissor (SCHNITTGER et al., 2000), com detecção em maior frequência utilizando das técnicas de microscopia, a

partir o esfregaço sanguíneo, embora se configure com uma técnica de baixa detecção em comparação com as técnicas de biologia molecular.

Deste modo, por conta da escassez de estudos sobre a prevalência de doenças transmitidas por ectoparasitas, em especial relacionados a detecção molecular de Piropasmídeos e patógenos da família anaplasmatáceas, e, além da importância da bubalinocultura na região do Baixo Amazonas e no estado do Pará, torna-se uma grande necessidade, maiores e mais aprofundadas pesquisas sobre tais patógenos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da bubalinocultura

Os búfalos (*Bubalus bubalis*), são pertencentes a família bovidae e subfamília bovinæ, são originários do continente asiático e amplamente distribuídos pelos demais continentes (DAMÉ *et al.*, 2006). Sua domesticação se deu durante o terceiro milênio a.C. na Mesopotâmia, nos vales do Hindu e, em seguida, na China (MARQUES, 2000).

No Brasil, os primeiros animais foram introduzidos no final do século XIX, devido suas características exóticas e a rusticidade, com o objetivo de preencher o chamado “vazio pecuário” nas regiões desfavoráveis a pecuária bovina (BERNARDES, 2007). De acordo com Moreira *et al.*, (1994), os búfalos se destacam pela rusticidade, fertilidade, longevidade, podendo alcançar até 15 anos de vida; precocidade, com elevada taxa de natalidade, acima dos 80% e baixa taxa de mortalidade, com cerca de 3%.

2.2 Aspectos produtivos

Os búfalos são animais de dupla aptidão, ou seja, apresentam potencial tanto para a produção leiteira quanto para a produção de carne, mas, por conta de sua força e resistência, é amplamente utilizado para tração. Deste modo, passa a ser considerado de tripla aptidão, principalmente em locais de difícil acesso, tais como terrenos inundados, como é o caso de algumas regiões do norte do Brasil (OLIVEIRA, 2005).

Das raças disponíveis, o Brasil apresenta quatro delas com reconhecimento da ABCB (Associação Brasileira de Criadores de Búfalos): Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi e Carabao (ROCHA², 2007). E, com a tendência no consumo de carnes com baixo teor de gordura e alto valor proteico, a carne de búfalo vem se tornando uma poderosa alternativa de consumo, alavancando a cadeia produtiva e chamando a atenção de investidores do setor pecuário (ROCHA¹, 2007; Oliveira, 2005).

O rebanho global de búfalos é estimado em mais de 208 milhões de cabeças distribuídas por 77 países, nos cinco continentes, no entanto a maior concentração de animais da espécie é na Ásia que detém 96,8% do rebanho mundial de bubalinos (Minervino *et al.*, 2020). Segundo dados do IBGE de 2020, estado do Pará é líder no ranking nacional, apresentando um efetivo de 605.110 cabeças, equivalente a 40,27% da produção brasileira. Os principais municípios produtores são Chaves (31,5%), Soure

(15,37%), Cachoeira do Arari (7,98%) e Almeirim (14,49%), que, juntos, concentram quase 70% desse rebanho no estado.

2.3 Aspectos reprodutivos

O período de gestação em bubalinos apresenta tempo de duração médio de 300 dias, com variação de 299 a 340 dias, conforme condições ambientais e fatores fisiológicos. No que se refere ao intervalo de partos, o nível de aceitação é de 2 bezerros a cada três anos (AL-AMIN et al., 1988).

Segundo Tonhati et al (2000), a idade ao primeiro parto é fator importante, pois descreve as características produtivas e reprodutivas em um determinado rebanho, e, sendo assim, quanto mais precoce é o animal, mais descendentes irá produzir. Ribeiro (2008), afirma que a idade ao primeiro parto de búfalos é mais tardia que de bovinos, variando de 35 a 56 meses, sendo que em análises de registros da Embrapa Oriental, foram verificadas médias de 39,8 meses de idade ao primeiro parto em fêmeas das raças Murrah e Mediterrâneo.

2.4 Aspectos de sanidade

Embora sejam considerados animais rústicos, os búfalos apresentam susceptibilidade às infecções parasitárias, justamente pela tendência de aglomeração por longos períodos, bem como por deficiências nutricionais e confinamento com alta taxa de lotação (COCHRILL, 1981; LAÚ, 1999).

Segundo Lima (2000), as parasitoses apresentam importância no desenvolvimento da pecuária de um modo geral, haja vista que é responsável por causar grandes prejuízos econômicos no que diz respeito à baixa produtividade do rebanho, morte dos animais, além dos altos gastos com tratamentos e medicamentos. Assim, Furlong *et al.*, (1985) afirmam que é importante conhecer a biologia dos parasitas, para então reduzir seus efeitos na produção animal.

Os bubalinos são hospedeiros de uma variedade de parasitas, podendo ser tanto endoparasitas, quanto ectoparasitas (MOHAN, 1968). Dentre os ectoparasitas que infectam os bubalinos, podem-se destacar os carrapatos e os piolhos. Os carrapatos atuam como excelentes vetores de doenças por apresentarem propriedades biológicas específicas como o hematofagismo, boa fixação nos hospedeiros, ingurgitamento lento,

longevidade dos estágios no ambiente, bem como transmissão transovariana e poucos inimigos naturais (HARWOOD & JAMES, 1979).

Apesar dos bubalinos serem conhecidos popularmente por apresentarem resistência às infecções por carrapatos, estudos mostram a existência de algumas espécies que os parasitam, entretanto, em menor intensidade quando comparado aos bovinos, onde se destacam *Ripicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma cajennense* (NITHIKATHKUL *et al.*, 2002).

No Brasil é grande a escassez de estudos sobre a parasitose de carrapatos em búfalos, entretanto, Rocha *et al.*, (1969), em seu estudo, observaram a presença de infestação natural de *R.(B) microplus* e *Dermacentor nitens* em bubalinos de São Paulo e Minas Gerais.

Segundo Furlong (1993), é um grande desafio controlar e erradicar o carrapato, no Brasil, devido suas dimensões continentais, porém, manter a imunidade contra os agentes causadores da Tristeza Parasitária Bovina, é fator essencial para minimização de perdas econômicas.

No que se refere ao piolho, destaca-se *H. tuberculatus* como o principal ectoparasita que acomete os bubalinos (VENEZIANO *et al.*, 2007; BASTIANETTO *et al.*, 2009), que também pode transmitir doenças como a anaplasmose (SILVA, 2014).

2.5 Reação em cadeia da polimerase

A biologia molecular se configura como a nova frente de investigação, permitindo avanços no diagnóstico de diversas doenças, detectando com maior precisão e entregando resultados altamente robustos, além de sensíveis e rápidos, quando comparados com as técnicas convencionais, como por exemplo, a microscopia (BOLLELA *et al.*, 1999; LORENZ, 2012).

De acordo com Martire (2002), a PCR é capaz de amplificar um fragmento de DNA *in vitro*, de um gene de interesse de determinado microrganismo a partir da seleção dos iniciadores, ou *primers* como são conhecidos. Dentro de um curto período de tempo, as sequências são amplificadas em mais de um milhão de vezes.

A metodologia para a realização desta técnica foi desenvolvida por um grupo de pesquisadores no ano de 1985, repetindo três reações simples de desnaturação, anelamento e síntese, variando apenas a temperatura em cada etapa, também necessita

de determinados reagentes para que ocorra a correta reação, onde se destaca a amostra, primers, dNTP's, Taq polimerase, MgCl², tampão da PCR e, um equipamento, o termociclador (AGNE et al., 2009; SANTOS et al., 2014).

Segundo Farah (1997), ao seguir essas três etapas, consegue-se obter milhões de cópias da sequência de DNA de interesse, uma vez que o número de cópias cresce de maneira exponencial a cada ciclo. E, de acordo com Pierre et al (1991), a sensibilidade da PCR pode ser ainda mais aumentada após a amplificação do produto, por meio de uma segunda reação de PCR, com o objetivo de amplificar um fragmento interno da primeira amplificação, metodologia conhecida como Nested-PCR.

2.6 Anaplasma

Constitui o gênero de bactérias que causam a anaplasiose, caracterizada como uma doença hemolítica causada pela ação de bactérias intraeritrocitárias obrigatórias, gram-negativas, classificadas na ordem das Rickettsiales, família Anaplasmataceae e gênero *Anaplasma* (SPARE et al., 2020).

De acordo com Dumler et al., (2001), a descoberta do gênero *Anaplasma* se deu em 1910, por Sir Arnold Theiler, na qual engloba seis espécies, sendo elas: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma bovis* e *Anaplasma platys*; onde Dumler et al., (2001) realizaram a reorganização da ordem *Rickettsiales* baseada em estudos filogenéticos do RNA ribossômico 16S (16S rRNA) e do gene *groES1*, resultando na substituição da família *Ehrlichiaeae* pela família *Anaplasmataceae*. Sendo assim, o gênero *Anaplasma* que continha somente *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e *Anaplasma ovis*, passou a abranger as bactérias *Ehrlichia bovis* e *Ehrlichia platys*, foram reclassificados como *Anaplasma bovis* e *Anaplasma platys*, já *Ehrlichia phagocytophila* e *Ehrlichia equi*, por conta de semelhança genética, ocorreu a unificação para a espécie *Anaplasma phagocytophilum*.

Dahlgren et al., (2011) afirmam que *Anaplasma* sp. são vetores de doenças, tendo o carrapato como seu principal transmissor, assim, apresentam importância significativa na saúde pública bem como na saúde animal, onde é responsável por prejuízos econômicos na pecuária afetando a saúde e a produtividade animal. Entretanto, o destaque do gênero como fator importante para a saúde pública, reflete no aumento do interesse em pesquisas com a finalidade de obter dados sobre a sua biologia, genética e patobiologia (WOLDEHIWET, 2010).

Em bubalinos, poucos são os estudos realizados com anaplasmoses, mas o que se sabe, é que em comparação aos bovinos, sua prevalência é bem inferior, sendo observada em alguns trabalhos, tais como Corrêa (2011) e Silva et al. (2013) onde relataram a ocorrência, ainda que baixa, de *Anaplasma marginale*. Embora seja baixa a prevalência, percebe-se que *Anaplasma marginale* é a principal bactéria das Anaplasmataceae que infectam bubalinos.

Anaplasma marginale e *Anaplasma centrale* são as principais espécies, sendo que *Anaplasma centrale* é caracterizada como sendo de menor potencial de patogenicidade. A forma de identificação e diferenciação das bactérias citadas, se dá pela visualização em microscópio, onde pontos ou corpúsculos de inclusão ao serem observados na fronteira das hemácias, caracterizam *Anaplasma marginale*, já, quando há a observação de corpúsculos no centro dos eritrócitos, caracteriza-se como *Anaplasma centrale* (KOCAN et al., 2003).

2.6.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Anaplasma* abrange tanto vertebrados quanto carrapatos ixodídeos, uma vez que os vertebrados atuam como reservatório dessas bactérias, servem de fonte de infecções para o vetor carrapato (VILLAR et al., 2016).

A primeira replicação dessas bactérias acontece no intestino médio do carrapato, quando o mesmo se alimenta do hospedeiro infectado, após isso, há o direcionamento das bactérias para o epitélio das glândulas salivares do carrapato, marcando a segunda replicação da bactéria (UETI et al., 2009). Posteriormente a isso, o carrapato infecta o próximo hospedeiro inoculando a saliva, com o intuito de preparar o local para se alimentar (MELO, 2018).

Carrapatos ixodídeos apresentam potencial de transmissão de *Anaplasma sp.* via transestadial e não via transovariana (RAR e GOLOVLJOVA, 2011), podendo também transmitir por via mecânica, por meio de fômites (toda e qualquer partícula capaz de transportar patógenos) contaminados com sangue (DIKMANS, 1950).

2.6.2 *Anaplasma marginale*

Esta espécie apresenta distribuição geográfica em todo o globo terrestre, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, e, o aumento da disseminação

pode estar atrelado ao transporte de bovinos de regiões endêmicas para regiões não endêmicas, bem como o aquecimento global que atua no deslocamento das populações de vetores (KOCAN *et al.*, 2010). A bactéria também foi encontrada em locais que apresentam clima moderado, tais como Estados Unidos, Canadá, Rússia e Hungria (BURSAKOV e KOVALCHUK, 2019; HORNOK *et al.*, 2007; KOCAN *et al.*, 2010; RAR *et al.*, 2015).

É conhecido popularmente como parasita dos bovinos, haja vista que causa elevado prejuízo econômico. No entanto, *Anaplasma marginale* apresenta diversos outros hospedeiros, dentre os quais destacam-se os búfalos, bisontes, veados, antílopes, carneiros selvagens e a girafa (AUBRY e GEALE, 2011).

No que se refere às vias de transmissão, foram descritas três: a biológica, a mecânica e a transplacentária (ZAUG, 1985). A biológica abrange cerca de 20 espécies de carrapatos, que pode ocorrer tanto de maneira interestadial quanto intraestadial (STICH *et al.*, 1989). A mecânica não necessita de vetores biológicos, uma vez que pode ocorrer por fômites infectados (DA SILVA *et al.*, 2013). Já a transmissão transplacentária ocorre principalmente em bovinos, onde bezerros nascem saudáveis, porém portadores da doença (KOCAN *et al.*, 2015).

2.6.3 *Anaplasma centrale*

Quanto a sua distribuição geográfica, se estende sobre as regiões tropicais e subtropicais do mundo (RAR e GOLOLJOVA, 2011). Por um determinado período de tempo, acreditava-se que somente os bovinos eram hospedeiros de *Anaplasma centrale*, no entanto, após pesquisas, foi descoberto outros animais como hospedeiros: ovelhas, gnus e antílopes (HOSSEINI-VASOUKOLAEI *et al.*, 2014; KHUMALO *et al.*, 2016).

Em relação à transmissão, pode ocorrer tanto de forma mecânica, através de inoculação sanguínea, como biológica, por meio dos carrapatos (THEILER, 1911). Kocan *et al.*, (2003) afirmam que a manifestação clínica da doença é branda em bovinos e ainda fornece imunidade protetora contra *A. marginale*. Por conta disso, é utilizada como vacina viva no controle da anaplasmoose bovina.

Em bubalinos, estudos realizados com anaplasmoose ainda são escassos, no entanto, é sabido que a prevalência em búfalos é inferior em comparação aos bovinos (SILVA *et al.*, 2014). Estudos realizados por Raiput *et al.*, (2005), demonstraram a inferioridade da prevalência de *Anaplasma marginale* em búfalos comparados com

bovinos, uma vez que foi verificado maior percentual de infecção em carrapatos que parasitam bovinos. Reddy *et al.*, (1988), verificaram que, dificilmente os animais apresentavam parasitemia superior a 1%. Correa (2011), constatou, no Brasil, a prevalência sorológica de 43% em bovinos naturalmente infectados. Já Souza *et al.*, (2000), observaram a prevalência de 98% para *Anaplasma marginale* em bovinos.

2.6.4 Impactos econômicos da anaplasmoze

Por se tratar de uma hemoparasitose, é considerada fator de risco aos animais, causando prejuízos econômicos para as cadeias produtivas, como no caso da anaplasmoze bovina, que causa grandes prejuízos devido ao elevado número de morbidade e mortalidade nos rebanhos (MELO, 2018). Associado a estes prejuízos, destaca-se a perda de peso dos animais, redução na produção leiteira, maior frequência de abortos, altos custos com tratamentos medicamentosos e controle da doença (KOCAN *et al.*, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2021).

De acordo com Ribeiro *et al.*, (1983), a Anaplasmoze é a principal causa de morte de bezerros, e, juntamente com a Babesiose, demandam cerca de 500 milhões de dólares por ano (GRISI *et al.*, 2002). Segundo Kocan *et al.*, (2003), estima-se que nos Estados Unidos, os custos de um caso clínico de anaplasmoze gira em torno de 400 dólares/animal. Já no Brasil, 5,27 dólares/animal (SOUZA *et al.*, 2021).

2.6.5 Métodos de diagnóstico de anaplasma

O diagnóstico de anaplasmoze pode ser realizado de maneira direta ou indireta. O diagnóstico direto é realizado através de microscopia, baseado na detecção de corpúsculos dentro dos eritrócitos em esfregaços sanguíneos (VIDOTTO; MARANA, 2001; AUBRY e GEALE, 2011), ou também, pelo método de Ramanowsky, no entanto, apresentam baixa faixa de detecção (GALE *et al.*, 1996), limitando o diagnóstico para a avaliação de bovinos com baixa carga bacteriana (MELO, 2018).

Já os métodos de diagnóstico indireto, que podem ser chamados de sorológicos, quantificam anticorpos específicos contra *Anaplasma* spp. (AUBRY e GEALE, 2011). Destaca-se os ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), método de fixação de complemento (CF), teste de aglutinação do cartão (CAT) e a citometria de fluxo (AUBRY e GEALE, 2011; OIE,

2012).

Segundo Coelho *et al.*, (2007), ainda no campo, o diagnóstico de anaplasmose pode ser feito através da verificação e correta identificação dos sinais clínicos, no entanto, esses sinais se expressam alguns dias após o pico da rickettsemia, período em que o quadro de anemia se mostra mais intenso.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) também é uma técnica frequentemente utilizada no diagnóstico de *Anaplasma* spp., uma vez que apresenta alta sensibilidade, podendo diferenciar animais infectados com *A. marginale* e animais vacinados com *A. centrale* (MOLAD *et al.*, 2006).

2.7 Babesia

O gênero *Babesia* é representado por protozoários hemoparasitas intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, família Babesiidae e são caracterizados pela presença de um complexo apical e um citoesqueleto único, o que difere de outros eucariotos (BOSE *et al.*, 1995; GORDON; SIBLEY, 2005). São descritas oito espécies com potencial para infectar bovinos e duas são encontradas no Brasil: *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* (UILENBERG, 2006; VIDOTTO *et al.*, 1995; GUGLIELMONE, 1995).

De acordo com Fonseca & Braga (1924), a primeira ocorrência no Brasil se deu em 1901 quando foi diagnosticado no exame de animais recém importados e em fase de aclimação no estado do Rio de Janeiro. Friedhoff (1988), afirma que a infecção dos ectoparasitas *Babesia sp.* ocorre no decorrer da hematofagia dos animais com parasitemia.

A incidência de *Babesia sp.* na hemolinfa dos carrapatos, o estresse, época do ano e tipo de pastagem são alguns dos fatores que contribuem para surgimento da babesiose, bem como as características genéticas dos animais como por exemplo dos animais europeus, na qual já se sabe que apresentam maior sensibilidade comparado ao gado zebu e as raças indianas (BOCK *et al.*, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2000; JONSSON, 2006).

O gênero *Babesia* é capaz de infectar diferentes hospedeiros tais como ruminantes selvagens, canídeos, felídeos, roedores e o búfalo africano, através de vetores biológicos e mecânicos (DE LA FUENTE *et al.* 2005). Frente ao desenvolvimento de doenças causadas pelos agentes da babesiose, os bubalinos são considerados resistentes, entretanto, os bezerros podem desenvolver sintomas ao se depararem com situações adversas (TERKAWIA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014).

Atualmente, em nível mundial, a Tristeza Parasitaria Bovina (TPB), responde por grandes perdas econômicas em decorrência do menor ganho ou perda de peso dos animais parasitados, baixa da produção de leite, infertilidade ou subfertilidade dos touros, abortamentos, mortalidade, e acima de tudo, muitos gastos com medicamentos e serviço médico veterinário (ARAÚJO et al., 1998; ADHAM et al., 2009).

2.7.1 Métodos de diagnóstico

Segundo Terkawia et al., (2011), o diagnóstico é realizado por meio da identificação dos parasitos em esfregaço sanguíneo, entretanto, sendo uma técnica barata, rápida e bem simples, não apresenta boa sensibilidade, tanto que é indicado apenas para animais que apresentam doença clínica, uma vez que pode gerar resultados inconsistentes em animais com a infecção no estado subclínico e/ou crônico.

Outras metodologias que têm sido bastante utilizadas nos estudos epidemiológicos da babesiose são as técnicas sorológicas, uma vez que podem verificar a presença e a intensidade de anticorpos específicos no soro de animais, servindo também como indicador da presença do agente, entretanto, apresenta algumas limitações, como não conseguir realizar o diagnóstico precoce nas formas agudas da doença (MAHONEY; WRIGHT; MIRRE, 1973).

No entanto, a técnica de biologia molecular, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), apresenta maior sensibilidade que as técnicas citadas anteriormente, sendo capaz de detectar cerca de 10 pg de DNA do parasita em amostras sanguíneas (BOSE et al., 1995). De acordo com Costa-Junior et al., (2006), a sensibilidade desta técnica pode ser aumentada com a utilização da técnica de Nested PCR.

A adoção do uso das técnicas moleculares de PCR na pesquisa epidemiológica das infecções por *Babesia sp.* têm apresentado importantes informações, permitindo a detecção de agentes infecciosos tanto em hospedeiros vertebrados quanto emectoparasitas (OLIVEIRA et al., 2004).

2.8 Theileria

Constitui o gênero de protozoários hemoparasitas intracelulares, pertencentes à família Theileriidae, ordem Piroplasmida, subclasse Piroplasmida e filo Apicomplexa (PURNELL, 1978; ROBINSON, 1982; UILENBERG, 1995).

O gênero *Theileria* engloba espécies de suma importância na sanidade de bovinos,

uma vez que causam diversos prejuízos, são elas: *Theileria annulata*, *Theileria parva* e *Theileria sergenti* (LI *et al.*, 2007; PRESTON, 2001; SCHNITTGER *et al.*, 2000), sendo que *Theileria annulata* e *Theileria parva* as de maior relevância, haja vista que também são agentes etiológicos da theileriose tropical, conhecida como theileriose mediterrânea, e, febre da Costa Leste, respectivamente (Schnittger *et al.*, 2000) e ainda assim, com maior destaque na literatura para *Theileria annulata*.

2.8.1 Theileriose tropical

Apresenta distribuição geográfica ao longo da África do Norte, sul da Europa, Oriente Médio, Ásia e China com o potencial de mortalidade é menor comparado à febre da Costa Leste com taxa de 70%. Bovinos de raças europeias, em especial, os de alta produção, apresentam-se como mais susceptíveis a contrair a infecção (URGUHART *et al.*, 1998).

2.8.2 Febre da costa leste

Apresenta distribuição geográfica na África Oriental e Central, apresentando alta percentagem de mortalidade, chegando a 100% em animais introduzidos nestas áreas endêmicas, uma vez que os animais nativos apresentam resistência natural. Os surtos dessa doença podem ser sazonais ou de acordo com as chuvas, assim, quanto mais chuva, maiores e mais frequentes serão os surtos. (URGUHART *et al.*, 1998).

Essas doenças apresentam alta gravidade, podendo levar a morte tanto de animais adultos quanto de bezerros (PRESTON, 2001; SINGH *et al.*, 2001; ZHANG, 1997). Os animais infectados que conseguem sobreviver à fase aguda, evoluem para um estado crônico da doença, onde apresentam um nível muito baixo de parasitemia, sendo assintomático, onde acabam atuando como reservatório natural do hemoparasita, facilitando a sua dispersão (SCHNITTGER *et al.*, 2004).

Juntamente com protozoários do gênero *Babesia* (principalmente *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*), causam a doença conhecida como piroplasmose bovina, transmitida pelo vetor carrapato, responsável por infectar rebanhos bovinos e bubalinos, (SIVAKUMAR *et al.*, 2014). Foi classificada e relatada em 1907, em cervos na França (BETTENCOURT; FRANCA; BORGES, 1907; UILENBERG, 2006).

Segundo VINODKUMAR *et al.*, (2016), as manifestações clínicas não são

observadas com frequência em búfalos infectados com piroplasmose, no entanto, Silveira *et al.*, (2016), relataram uma *Theileria* spp. relacionados a *T. buffeli/orientalis* que acomete bubalinos na Amazônia.

Shaw (2002) afirma que os carrapatos, ao se alimentarem de hospedeiro contaminado com os piroplasmas de *Theileria* spp., acabam por se infectarem, onde parte dos piroplasmas ingeridos sofrem divisão celular no intestino, tornando-se um cineto móvel. Posteriormente a isso, este cineto conquista o acesso a cavidade geral do carrapato, alcançando as glândulas salivares, ocorrendo então a multiplicação do parasita, que são liberados para o hospedeiro vertebrado.

2.8.3 Métodos de diagnóstico

2.8.3.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico envolve a detecção e identificação do patógeno por meio da observação de esfregaço sanguíneo no microscópio, o que permite a análise da morfologia do parasita (AKTAS *et al.*, 2005; AL-AMERY e HASSO, 2002; CHAE *et al.*, 1999; D'OLIVEIRA *et al.*, 1995; NORVAL *et al.*, 1992; PRESTON, 2001; SCHNITTGER *et al.*, 2004).

No entanto, esta metodologia de diagnóstico apresenta baixa sensibilidade em decorrência do baixo nível de parasitemia no sangue, bem com a dificuldade de distinção morfológica entre as espécies patogênicas e a não patogênicas (AKTAS *et al.*, 2005; D'OLIVEIRA *et al.*, 1995; NORVAL *et al.*, 1992). Atrelado a isso, deve-se levar em consideração a experiência do técnico que vai executar as análises e também os fatores limitantes da microscopia, haja vista que somente vai detectar e identificar o parasita em amostras de animais expostos ao estado agudo da doença (ZAEEMI *et al.*, 2010).

2.8.3.2 Diagnóstico imunológico

Para isso, recorre-se às técnicas sorológicas, especialmente os testes de imunofluorescência indireta (IFA), na qual baseiam-se na detecção de anticorpos anti-antígenos em amostras de soro (procedimento no qual o sangue sofre centrifugação para que ocorra a separação de suas fases) (COLLINS *et al.*, 2020). Apesar de apresentar maior sensibilidade comparada ao método de microscopia, apresenta alguns entraves, tais como

a necessidade de técnico experiente e a ocorrência de reações cruzadas entre espécies próximas (NORVAL *et al.*, 1992, AKTAS *et al.*, 2005, PAPADOPOULOS *et al.*, 1996).

Outra técnica que se destaca no diagnóstico, têm por base o método de ELISA, que se mostra de fácil utilização, otimização do processamento, permitindo a análise simultânea de um maior número de amostras. Porém apresenta entrave semelhante à técnica anterior, reações cruzadas entre espécies próximas, fato que prejudica a especificidade e a confiabilidade (BILGIC *et al.*, 2010).

2.8.3.3 Diagnóstico molecular

De acordo com Calder *et al.*, (1996), as técnicas moleculares são as que apresentam maior especificidade e sensibilidade, sendo capaz de detectar baixos níveis parasitemias, característica de animais portadores assintomáticos, bem como a distinção entre espécies, o que garante uma maior confiabilidade dos dados. Segundo Tanaka *et al.*, (2010), boa parte dos testes moleculares utilizados se baseiam na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Apesar de todas as vantagens da técnica de PCR, foram desenvolvidas novas variantes que adicionam ainda mais vantagens, como é o caso do PCR em tempo real, que possibilita a observação no decorrer da reação, bem como a quantificação da carga parasitária na amostra (PONCHEL *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a detecção molecular de *Anaplasma* sp. e Piroplasmídeos em bubalinos na região do Baixo Amazonas e identificar possíveis fatores de riscos associados a infecção por estes patógenos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de bubalinos infectados por Piroplasmídeos (*Babesia* sp. e *Theileria* sp.) por meio da reação de polimerase em cadeia.
- Determinar a prevalência de bubalinos infectados por bactérias da família Anaplasmatacea por meio da reação de polimerase em cadeia.
- Determinar os possíveis fatores de risco associados com a detecção molecular de patógenos transmitidos por carrapatos (Piroplasmidas e Anaplasmatacea).
- Identificar as espécies de Piroplasmidas e Anaplasmatacea infectando bubalinos por meio de sequenciamento genético.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado na região do baixo Amazonas, que compreende o município de Santarém, localizado na região oeste do Pará, norte do Brasil, abrangendo propriedades localizadas em áreas secas (terra firme) e áreas de várzea, estas últimas, comumente encontradas ao longo das margens do rio Amazonas na qual sofrem inundações anualmente. Estas áreas de várzea, durante o período da seca, oferecem grandes extensões de pastagens naturais, úteis na atividade pecuária, e, deste modo, os animais são levados para essas áreas onde ficam pastando por aproximadamente 8 meses, regressando para as áreas secas no pico de cheia do rio Amazonas (LANGENWALDER *et al.*, 2019). O rebanho de búfalos do município de Santarém gira em torno de 8.364 animais, dispostos em 232 propriedades (MINERVINO *et al.*, 2020).

4.2 Delineamento experimental

Foram utilizadas amostras provenientes de um estudo transversal, previamente relatado por (Batista *et al.*, 2018). Em suma, foi realizada uma pesquisa com amostragem probabilística em dois estágios (nível da fazenda e nível de animal). A amostragem de fazendas calculada com 95% de confiança usando Epi Info (CDC), incluiu 60 fazendas de búfalos (grupos) representando 25,9% do total de fazendas na área de estudo. Adotou-se uma abordagem de amostragem sistemática para a seleção de agricultores usando a lista de agricultores. Se um agricultor se recusasse a ser amostrado, uma fazenda nos arredores era então incluída. A amostragem de animais dentro da fazenda foi calculada no local de acordo com cada rebanho, seguindo a fórmula de detecção de doenças (CANNON & ROE, 1982).

Um questionário epidemiológico detalhado foi elaborado incluindo informações das fazendas como localização (terra seca ou várzea), tamanho do rebanho, tipo de rebanho (carne ou leite), manejo/condições de pastagem/pastejo, controle de carrapatos e carrapatos, contato com animais selvagens e detalhes dos animais como como sexo, idade, raça, tipo (carne ou leite), origem, contato com a espécie, transportado para várzea (BATISTA, 2018).

4.3 Coleta e processamento das amostras de sangue

As amostras sanguíneas foram coletadas por venopunção jugular externa em tubos siliconizados vacutainer® contendo ácido dietileno diamino tetracético (EDTA). Em seguida, foram encaminhadas para o laboratório de Sanidade Animal, LARSANA da Universidade Federal do Oeste do Pará, UFOPA, onde foram devidamente identificadas e alicotadas em microtubos para então, serem congeladas a 20°C negativos para posterior análises moleculares.

4.4 Coleta de ectoparasitas

Após realizar a contenção correta, os bubalinos foram examinados em áreas corporais específicas (dorso, ponta da cauda, pescoço e orelhas). Os ectoparasitas foram coletados de cada animal, principalmente carrapatos e piolhos (*Haematopinus tuberculatus*), logo em seguida foram acondicionados em tubos plásticos do tipo falcon identificados com a numeração de acordo com animal a qual foi extraído, conservados em álcool absoluto e posteriormente identificados a nível de espécie (ARAGÃO & FONSECA, 1961; MARTINS *et al.*, 2010).

4.5 Extração de DNA

4.5.1 Carrapatos e piolhos

Os ectoparasitas foram separados em pool de cinco exemplares por animal e colocados em microtubos de 1,5 ml, conforme descrito por Sangioni et al. (2005), adaptado. Os ectoparasitas foram triturados com o auxílio de agulha romba estéril, acrescido de 150 µl de solução tampão TE pH 8,0 (10mM TRIS HCl; 1mM EDTA) e 450 µl de Isotiocinato de guanidina, seguindo de homogeneização e adição de 100 µl de Clorofórmio. Após centrifugação (12.000 g por 5 minutos), foram recuperados aproximadamente 300 µl de sobrenadante e transferido para um novo microtubo de 1,5 ml estéril, sendo acrescido 600 µl de Isopropanol e armazenado em freezer (-20°C) por no mínimo duas horas. Após esse processo as amostras foram novamente centrifugadas (12.000 g à 4°C por 15 minutos). O produto sobrenadante foi descartado e o sedimento exposto em temperatura ambiente por uma hora e em seguida acrescido de 60 µl de TE e

aquecido em termobloco (56°C por 5 minutos). A solução final contendo o DNA diluído em TE foi armazenado em freezer até a sua utilização na PCR.

4.5.2 Sangue total

A extração de DNA das amostras sanguíneas foi realizada utilizando Kit comercial (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, São Paulo, Brasil) seguindo as orientações do fabricante.

4.6 Quantificação do DNA extraído

Após o procedimento de extração de DNA, as amostras foram encaminhadas para o processo de quantificação, com o auxílio do equipamento NanoDrop 2000 (Spectrophotometer features, Silverside Rd Bancroft Building Wilmington, de 19810, USA) e todas as amostras com quantidades abaixo de 30ng/μl de DNA foram re-extraídas.

4.7 Detecção molecular de patógenos

A análise molecular utilizou a reação de PCR em um primer que pode detectar principalmente o gênero *Babesia*, mas também outros patógenos da família Piroplasmida, em especial do gênero *Babesia*, mas que também amplifica outros patógenos da mesma ordem como *Theileria* sp. (BAB2), BAB-143-167 (5'-CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA-3') senso e BAB-694-667 (5'-CACTCTARTCTCAAAG-3) anti-senso, desenvolvido para amplificar um fragmento 551b do Gene 18S rRNA de presente na família Piroplasmida definido por Almeida (2011).

Para detectar organismos da família Anaplasmataceae, foi realizada uma reação de PCR com primers que amplificam um fragmento de 344 pb do gene 16S rRNA de praticamente todos os membros da família Anaplasmataceae EHR16SD (F-GGTACCYACAGAAGAAGTCC) e EHR16SR (R-TAGCACTCATCGTTTACAG).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídeo (Invitrogen®) (0,5 μL/mL) em tampão de corrida TEB 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 100 V por 60 minutos. Para a determinação dos produtos

amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 a 1000 pares de base (100 pb DNA Ladder -Invitrogen®). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (UV) (AlphaImager HP, San Jose, California, 95134 USA) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II- Stratagene®, LA, Jolla, CA).

Todos os produtos de PCR positivos gerados nas amostras de campo testadas pelos protocolos de PCR descritos acima foram purificados e sequenciados utilizando-se o kit comercial BigDye TM Terminator – Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems e em seguida sequenciados no sequenciador de DNA modelo ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções. As sequências obtidas foram editadas pelo pacote de programas Bioedit® e submetidas à análise de similaridade com as sequências disponíveis no GenBank, através do programa BLAST analysis (Altschul et al., 1990).

4.8 Análise estatística

Para análise estatística dos dados foram consideradas duas condições distintas dos bubalinos: presença/ausência de *Piroplamída sp.* e presença/ausência de *Anaplasma sp.*. Foi aplicado o teste de associação de qui-quadrado (χ^2) entre estas distintas condições e os possíveis fatores de risco obtidos por meio do questionário epidemiológico.

Tais análises foram realizadas em dois níveis distintos: *Animal-level*, considerando a prevalência ao nível de animal dentre a população total amostrada; *herd-level*, avaliando a prevalência ao nível de fazenda, onde cada propriedade foi considerada como uma unidade amostral sendo esta positiva (quando no mínimo um animal da propriedade foi positivo) ou negativa (quando nenhum animal positivo para Piroplasmida ou Anaplasma sp.). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio de programa estatístico (Minitab 17, Minitab Inc, State College, EUA). Foram consideradas significativas as diferenças cujo valor de “p” apresentou valores iguais ou inferiores a 0,05.

5 RESULTADOS

O método de amostragem dentro das 60 fazendas de búfalos, resultou em 621 animais amostrados, sendo a maioria de pequenos rebanhos em terras secas e de várzea. Animais machos e fêmeas de todas as idades foram amostrados e uma descrição detalhada foi apresentada por Batista et al., (2018).

5.1 Prevalência de anaplasma

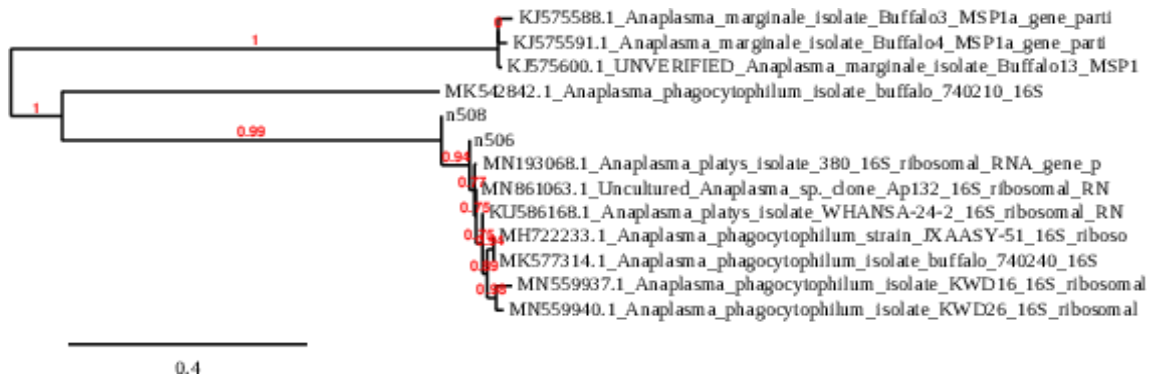
Dos 621 animais amostrados, apenas 2 foram positivos para *Anaplasma sp.*, apresentando prevalência a nível de animal de 0,32% (0,04 a 1,16 IC 95%). Ambos os animais eram provenientes da mesma propriedade, deste modo, a prevalência em nível de fazenda foi de 1,66% (0,04 a 8,9 IC 95%). Considerando o limitado número de animais positivos, a análise de fatores de risco é considerada irrelevante e, portanto, não será apresentada.

Os dois animais positivos para *Anaplasma sp.* mesmos são provenientes de uma fazenda de médio porte localizada na várzea amazônica, região que apresenta menor infestação de ectoparasitos (Batista et al., 2018), ambos eram novilhas de corte que se alimentavam de pastagens naturais do Baixo Amazonas em sistema de produção extensivo. Um dos búfalos positivos para *Anaplasma sp.* tinha piolhos, mas nenhum tinha carrapatos. Na fazenda com os dois animais positivos amostrados tinham um total de 19 búfalos, dos quais nenhum estava infestado por carrapatos e apenas um estava infestado por piolhos da espécie *Haematopinus tuberculatus*, e, coincidentemente um dos animais positivos para *Anaplasma* era justamente o animal infestado por piolhos.

O sequenciamento de ambas as amostras de sangue total de búfalos positivas na PCR, revelou infecção por duas espécies distintas de *Anaplasma*, o *Anaplasma platys* com 99,42% de similaridade de uma sequência recuperada em Wuhan, China (ascensão GenBank # KU586168) (GUO et al., 2016) e *Anaplasma phagocytophilum* com 98,49% de similaridade com a sequência MN559940 de *Anaplasma phagocytophilum* isolado KWD26 do gene 16S de RNA ribossômico. Interessantemente uma mesma propriedade apresentou búfalos infectados por duas espécies distintas de *Anaplasma*.

A figura 1 apresenta a árvore filogenética das amostras sequenciadas no presente estudo.

Figura 1. Posicionamento filogenético das sequências de *Anaplasma sp.* amplificadas em bubalinos no Baixo Amazonas.



Fonte: Acervo do autor, (2022).

5.2 Prevalencia de piroplasmas

Quanto à investigação de Piroplasmídeos, dos 621 animais analisados, 13 apresentaram-se positivos na reação em cadeia da polimerase representando 2,09% do número total de animais amostrados. No que se refere aos ectoparasitas, 8 carrapatos foram positivos, correspondendo a 7,6% dos 95 exemplares coletados, no entanto, nos piolhos não se verificou nenhum positivo.

A tabela 1 apresenta a análise dos fatores de risco associados a detecção de Piroplasmídeos no sangue de bubalinos ao nível de animal.

Tabela 1. Fatores de risco associados à presença de *Piroplasma sp.* em bubalinos.

Fatores de Risco	<i>Piroplasmida</i> Positivos/Total (%)	P*
Sexo do animal		0,775
Macho	4/236 (1,69%)	
Fêmea	9/385 (3,34%)	
Presença de ectoparasitas*		0,716
Sim	3/115 (2,61%)	
Não	10/506 (1,98%)	
Presença de carrapatos		0,040
Sim	3/49 (6,12%)	
Não	10/572 (1,75%)	
Presença de piolhos		1
Sim	12/549 (2,19%)	
Não	1/72 (1,39%)	
Faixa etária (meses)		0,003
1 a 12	3/153 (1,96%)	
13 a 24	10/222 (4,54%)	
> 24	0/246 (0,0%)	
Aptidão		0,905
Corte	5/229 (2,18%)	
Leite	8/392 (2,04%)	
Tamanho do rebanho		0,649
Médio	2/56 (3,5%)	
Micro	5/218 (2,29%)	
Pequeno	6/347(1,73%)	
Local da propriedade		0,24
Terra firme	11/420 (2,62%)	
Várzea	2/201 (1,0%)	
Origem dos animais		0,65
Compra	2/70 (5,7%)	
Fazenda	11/551 (2,9%)	
Mantido com outros animais		0,283
Sim	67/420 (2,8%)	
Não	6/201 (3,9%)	

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Em relação aos fatores de risco associados com a detecção molecular de Piropasmídeos ao nível de animal, apenas os fatores faixa etária e infestação por carrapatos apresentaram associação. Em relação a faixa etária, animais novos, com 1-12 meses de 12-24 meses foram mais positivos para Piropasmídeos que animais acima de 24 meses. Nenhum animal acima de 24 meses apresentou infecção por parasitas da ordem Piropasmida. Em relação a infestação por carrapatos, búfalos que estavam com carrapatos no momento da coleta estavam infectados em maior número que bubalinos sem carrapatos.

É válido ressaltar que a maioria dos búfalos positivos para Piropasmídeos era oriundo de áreas de Terra Firme (n=11) com apenas dois animais positivos identificados em propriedades de várzea. Apesar da diferença, devido ao baixo número de animais positivos, não foi possível constatar diferença significativa entre o local da propriedade e a detecção molecular de Piropasmídeos ($p=0,24$).

Foi possível a realização do sequenciamento do PCR em apenas cinco animais que se apresentaram positivos, onde revelou a infecção de duas espécies distintas de *Theileria* sp., quatro animais infectados por *Theileria buffeli*, sendo três com 99,47%, 98,96%, 100% de similaridade com a sequência HM538215, respectivamente, e um, com 99,80% de similaridade com a sequência EF126184. O outro búfalo apresentou infecção por outra espécie de Piropasmídeo, a *Theileria occidentalis*, com 100% de similaridade com a sequência MH208642.

A ocorrência de Piropasmídeos nas fazendas, detectada no presente trabalho foi de 16,67% (10/60), a tabela 2 apresenta a relação dos fatores de riscos associados a presença de Piropasmas nas propriedades.

Tabela 2. Relação dos fatores de riscos relacionados a presença de Piroplasmídeos nas propriedades.

Fator de risco	<i>Piroplasmida</i> * Positivos/Total (%)	P*
Presença de Ectoparasitas*		0,055
Sim	6/31 (19,35%)	
Não	1/29 (3,45%)	
Presença de Carrapatos		0,123
Sim	4/19 (21,05%)	
Não	3/41 (7,32%)	
Presença de Piolhos		0,023
Sim	5/20 (25,0%)	
Não	2/40 (5,0%)	
Tamanho do Rebanho		
Médio	0/2 (0,0%)	
Micro	4/34 (11,76%)	
Pequeno	3/24 (12,50%)	
Presença de Silvestres		0,955
Sim	6/51 (11,76%)	
Não	1/9 (11,11%)	
Local de Coleta		0,099
Terra Firme	6/34 (17,65%)	
Várzea	1/26 (3,85%)	
Tipo de Pastagem		ND
Cultivada	2/19 (10,53%)	
Mista	0/5 (0,0%)	
Nativa	5/36 (13,89%)	
Descanso de Pastagem		0,676
Sim	3/20 (15,0%)	
Não	4/40 (10,0%)	
Mantido com outros animais		0,35
Sim	4/45 (8,89%)	
Não	3/15 (20,0%)	
Faz controle de carrapatos		0,69
Sim	5/36 (13,89%)	
Não	2/24 (8,33%)	
Animais vão pra Várzea		0,47
Sim	6/55 (10,91%)	
Não	1/5 (20,0%)	

Verificou-se na tabela acima que apenas o fator de risco relacionado ao local de propriedade apresentou resultados relevantes, onde se observou uma tendência a maior ocorrência de *Piroplasma sp.* em fazendas em áreas de terra firme ($p = 0,09$).

6 DISCUSSÃO

Dentre os quatro animais infectados com *T. buffeli*, três apresentaram grande similaridade com o mesmo genótipo, mesmo sendo animais de propriedades distintas. Em estudo realizado na Tailândia que avaliou de maneira mais profunda a variabilidade genética de *T. orientalis* em bovinos e búfalos, foram observadas grandes semelhanças entre as sequências nucleotídicas de isolados do mesmo genótipo de bovinos e búfalos, e, portanto, os búfalos foram considerados como reservatórios para esses genótipos de *T. orientalis* na Tailândia. Observaram ainda que, *T. orientalis* que circulam na Tailândia são mais diversos em seus caracteres genéticos do que o previsto anteriormente (Altangerel et al., 2011).

Em estudo com bovinos no Kenya, foram detectados os patógenos *B. bovis*, *B. bigemina*, *T. parva*, *T. velifera*, *T. taurotragi*, *T. mutans* e *A. marginale*, *T. ovis*, e *T. orientalis* além de coinfeções observadas em mais de 50% das amostras positivas (Adjou Moumouni et al., 2015), o que contrasta com os resultados encontrados no presente estudo onde não foi observada uma menor presença de animais infectados e uma menor diversidade de patógenos apesar do estudo ter sido realizado em uma ampla e diversa região e ter incluído 60 propriedades distintas em condições de terra firme e de várzea. No presente estudo não foram verificadas coinfeções entre os patógenos estudados.

Em estudo nas Filipinas com bovinos e búfalos e utilizando a mesma reação de PCR do presente estudo, piroplasmas foram detectados em 29,9% dos bovinos e apenas três (2,8%) dos búfalos examinados (Prado et al., 2022), o que corrobora com os resultados do presente estudo que búfalos possuem baixa prevalência molecular de Piroplasma.

Em Hubei, China, *Theileria buffeli* (19.1%) foi a espécie com maior prevalência, no entanto o estudo também identificou outras espécies de piroplasmida como *Babesia orientalis*, *B. bovis* e *B. bigemina* (He et al., 2012).

Em um dos poucos estudos realizados no estado do Pará, conduzido na região Nordeste do estado e na Ilha de Marajó, a prevalência de *Theileria sp.* foi de 4.2% e 3.6% para *Babesia bovis* e 1% para *Babesia bigemina* com uma prevalência ao nível de fazenda de 50%. Neste estudo a maioria dos animais positivos eram de uma mesma propriedade com histórico de doença linfoproliferativa de etiologia desconhecida, sendo que os autores sugerem que possa ser causada pela *Theileria sp.* (Silveira et al., 2016).

Diferentemente do observado, nas 60 fazendas amostradas não foi relatado histórico de doença crônica ou problemas sanitários nos rebanhos bubalinos. Ainda são necessários estudos para determinar a susceptibilidade de bubalinos a *Theileria sp.* e quais as alterações clínicas decorrentes da infecção por este patógeno, uma vez que os animais amostrados estavam todos sem sintomas clínicos evidentes.

Em estudo no Maranhão, uma baixa prevalência de Piroplasma foi detectada, com apenas um búfalo infectado por *Theileria sp.* (0.35%) (Abate et al., 2018).

No presente estudo, dos 621 animais analisados, foi verificado a positividade para *Anaplasma sp.* em apenas dois animais, demonstrando uma baixa infecção. Esses dados vão de encontro ao estudo realizado por Abate et al. (2018), onde os 287 búfalos examinados foram negativos para *Anaplasma sp.*, em especial *A. marginale*. Verifica-se pelo posicionamento filogenético que as espécies de *Anaplasma* encontradas em búfalos na região estão distantes de isolados de *A. marginale*, patógeno associado a Anaplasmosse bovina.

A baixa prevalência de búfalos infectados por *Anaplasma sp.* no presente estudo foi um tanto quanto inesperada, uma vez que estudos preliminares na região do Marajó com um número parecido de animais amostrados detectaram mais de 5% de animais positivos, enquanto a prevalência de *Anaplasma sp.* em búfalos no Baixo Amazonas não chegou a 0,5%, ou seja, mais de dez vezes inferior.

Ressalta-se ainda que os achados anteriores do gênero em búfalos foram unicamente de *Anaplasma marginale*, possivelmente em decorrência de uma contaminação cruzada entre as espécies bovina e bubalina que pastejam as mesmas áreas (SILVA et al., 2014). Por outro, existe variação na detecção molecular de *Anaplasma sp.* em outro estudo também na Ilha de Marajó, onde *Anaplasma marginale* foi detectado em apenas 2% dos animais.

Em estudo realizado no Rio de Janeiro, 10% dos búfalos examinados foram positivos para *A. marginale* (SILVA et al., 2014), já em outro estudo, também realizado no estado do Rio de Janeiro, de 295 animais amostrados, apenas 1% foi positivo para *A. marginale* (CORRÊA, 2011).

Em outro estudo, recente, realizado na Tailândia (Nguyen, 2020), foi detectado 41% de positividade de organismos da família Anaplasmataceae (*Anaplasma marginale*

e *Anaplasma platys*-like) em rebanhos bubalinos da região. Já em Cuba, foi verificada a detecção de *Anaplasma* em 54,6% do rebanho bubalino (ÓBREGON et al., 2019).

Verifica-se uma grande variabilidade de resultados, com detecção molecular e com números bastante diferentes, embora considerando estudos realizados no mesmo estado, isso é decorrente da função dos diferentes fatores de risco para a infecção, como por exemplo a presença do vetor responsável pela transmissão do patógeno. Essa grande variabilidade nos resultados reforça a importância do estudo realizado, que vem a contribuir para a identificação das espécies de patógenos em uma área de grande importância para a bubalinocultura, onde até o momento era carente de informações. Avanços nos estudos filogenéticos certamente irão permitir um melhor entendimento da epidemiologia molecular dos patógenos transmitidos por carrapatos contribuindo para a adequada identificação de hospedeiros reservatórios susceptíveis.

De acordo com Hornok et al. (2018), na Hungria, búfalos criados de maneira extensiva em sistema de manejo que se assemelha ao utilizado na região do Baixo Amazonas (pastejo coletivo em extensas áreas de pastagens naturais) não apresentaram *Anaplasma phagocytophilum* na Hungria, enquanto que outras espécies de ruminantes que habitam o mesmo parque natural húngaro, apresentaram prevalências que chegaram em até 97%.

As diferenças na prevalência de *A. phagocytophilum* pode estar relacionada aos hábitos de pastejo, haja vista que espécies que se alimentam em áreas de pastos mais extensas são menos propensas a estarem infestadas por carrapatos, o principal vetor de *Anaplasma sp.*. Esta hipótese é suportada por achados conclusivos na região do baixo Amazonas que verificaram que búfalos em áreas de várzea são menos infestados por carrapatos do que animais de áreas de terra firme (BATISTA et al., 2018). Apesar de não ser comum a infecção de búfalos por *A. phagocytophilum*, um estudo recente demonstrou uma infecção sintomática deste patógeno na espécie infectada por uma variante genética do patógenos (*ankA* gene cluster II) que havia sido descrita infectando apenas cervídeos (LANGENWALDER et al. 2019).

Outro interessante estudo que avaliou comparativamente a detecção molecular de *Anaplasma sp.* em bovinos e búfalos no Egito, verificou que bovinos apresentavam uma prevalência muito superior (68%) em relação a bubalinos (29%), com a circulação de

diversos genótipos, mas com predominância de linhagens já descritas e específicas da região (AL-HOSARY et al., 2020).

Com relação a prevalência de *Anaplasma sp.* em ectoparasitas, os resultados obtidos a partir de carrapatos e piolhos coletados em bubalinos no baixo Amazonas foram diferentes dos obtidos por outros grupos em diferentes locais, inclusive no estado do Pará, na região do Marajó, onde 17.5% dos carrapatos coletados de bubalinos foram positivos para *A. marginale* e que este patógenos apresentavam linhagem semelhante entre bovinos e búfalos (DA SILVA et al., 2015).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo verificou a ocorrência de Piroplasmídeos no sangue total de bubalinos indicando que o parasita infecta esta espécie na região, além de identificar pela primeira vez a presença de *Theileria buffeli* e *Theileria occidentalis*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* em bubalinos na região do Baixo Amazonas.

Verificou-se que búfalos mais jovens e infestados por carrapatos apresentaram maior frequência de infecção por Piroplasmídeos. Propriedades de terra firme apresentaram uma tendência de maior ocorrência de Piroplasmídeos do que propriedades localizadas na várzea.

Em piolhos da espécie *H. tuberculatus* não foi detectada a presença de Piroplasmídeos, inclusive nos exemplares que infestavam búfalos que foram positivos. Embora haja a necessidade de estudos mais aprofundados, os presentes resultados indicam que o piolho apresenta limitada importância na epidemiologia de Piroplasmídeos em bubalinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, H. L., DOS SANTOS, N. J. R., BRITO, D. R. B., VALENTE, J. D. M., VIEIRA, T. S. W. J., GARCIA, J. L., VIEIRA, R. F. DA C., & VIDOTTO, O. (2018). *Theileria* sp. in water buffaloes from Maranhão State, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27(4), 593–596. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180075>.

ADHAM, F. K. et al. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I – *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitology Research*, v. 105, p. 721-730, 2009.

ADJOU MOUMOUNI, P. F., ABOGE, G. O., TERKAWI, M. A., MASATANI, T., CAO, S., KAMYINGKIRD, K., JIRAPATTHARASATE, C., ZHOU, M., WANG, G., LIU, M., IGUCHI, A., VUDRIKO, P., YBANEZ, A. P., INOKUMA, H., SHIRAFUJI-UMEMIYA, R., SUZUKI, H., & XUAN, X. (2015). Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13071-015-1106-9>.

AGNE, M. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields : a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 1–11, 2009.

AKTAS, M., ALTAY, K. E DUMANLI, N. 2005. Survey of *Theileria* parasites of sheep in Eastern Turkey using polymerase chain reaction. *Small Ruminant Research* 60: 289-293.

AL-AMERY, M.A.Y. E HASSO, S.A. 2002. Laboratory diagnosis of novel species of *Theileria hirci*, *Eimeria caprovina* and *Eimeria pallidain* goats in Iraq. *Small Ruminant Research* 44: 163-166.

AL-AMIN, S. K.; HANNA, W. J.; AL-MARAASHI, A. Growth and development of buffaloes. *Indian Journal Animal Science*, v. 58, n. 8, p. 942, 1988. BARBOSA, N.G.S. **Bubalinocultura no Estado do Pará**. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.34-38, jan./mar. 2005. Disponível em www.cbpa.org.br.

AL-HOSARY, A.; RĂILEANU, C.; TAUCHMANN, O.; FISCHER, S.; NIJHOF, A.M.; SILAGHI, C. Epidemiology and genotyping of *Anaplasma marginale* and co-infection with piroplasms and other Anaplasmataceae in cattle and buffaloes from Egypt. *Parasites and Vectors* 2020, 13, 495, doi:10.1186/s13071-020-04372-z.

ALTANGEREL, K., SIVAKUMAR, T., INPANKAEW, T., JITTAPALAPONG, S., TERKAWI, M. A., UENO, A., XUAN, X., IGARASHI, I., & YOKOYAMA, N. (2011). Molecular Prevalence of Different Genotypes of *Theileria orientalis* Detected from Cattle and Water Buffaloes In Thailand. *Journal of Parasitology*, 97(6), 1075–1079. <https://doi.org/10.1645/GE-2846.1>

ARAÚJO F. R. et al. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology*, v. 74, p. 101-108, 1998.

AUBRY, P.; GEALE, D.W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, s. n., p.1-30, 2011.

BARBOSA, N. G. S. Bubalinocultura no estado do Pará. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 29, n. 1, p. 34-38, 2005.

BASTIANETTO, E.; LEITE, R.C. Aspectos Epidemiológicos e Controle Das Doenças Parasitárias Em Bubalinos. *Revista Ciência Animal Brasileira*, Suppl.1 (VIII Congresso Brasileiro de Buiatria), 2009.

BATISTA, H. R., SARTURI, C., STELMACHTCHUK, F. N., OLIVEIRA, D. R., MORINI, A. C., GENNARI, S. M., MARCILI, A., BASTOS, F. A. N., BARATA, L. E. S., & MINERVINO, A. H. H. (2018). Prevalence and risk factors associated with ectoparasite infestation of buffaloes in an Amazonian ecosystem. *Parasites & Vectors*, 11(1), 335. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2917-2>

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Rev Bras Reprod Anim**. XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007. Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em: 20 dez.2018.

BETTENCOURT, A. C.; FRANCA, R.; BORGES, I. Un cas de piroplasmose baciliforme chez le daim. **Arq Inst R Bact Camara Pestana**, v. 1, p. 341–349, 1907.

BILGIC, H.B., KARAGENÇ, T., SHIELS, B., TAIT, A., EREN, H., WEIR, W. 2010. Evaluation of cytochrome b as a sensitive target for PCR based detection of *T. annulata* carrier animals. *Veterinary Parasitology* 174(3-4): 341-347.

BOLLELA, VALDES R., SATO, DAISY N. E FONSECA, BENEDITO A. L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Revista de Saúde Pública**. 1999, v. 33, n. 3, p. 281-286. DOI: doi.org/10.1590/S0034-89101999000300009.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; DE VOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesioses. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.

BURSAKOV, S.A., KOVALCHUK, S.N., 2019. Co-infection with tick-borne disease agentes in cattle in Russia. *Ticks Tick Borne Dis*. 10, 709–713. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.004>.

CALDER, J.A., REDDY, G.R., CHIEVES, L., COURTNEY, C.H., LITTELL, R., LIVENGOOD, J.R., NORVAL, R.A., SMITH, C. E DAME, J.B. 1996. Monitoring *Babesia bovis* infections in cattle by using PCR-based tests. *Journal of Clinical Microbiology* 34(11): 2748-2755.

CHAE, J., LEVY, M., HUNT, J. JR., SCHLATER, J., SNIDER, G., WAGHELA, S.D., HOLMAN, P.J. E WAGNER, G.G. 1999 *Theileria* sp. Infections associated with bovine fatalities in the United States confirmed by small-subunit rRNA gene analyses of blood and tick samples. *Journal of Clinical Microbiology* 37(9): 3037-3040.

COCKRILL WR. O búfalo em ascensão: animal doméstico fundamental, criação, proteção e saúde animal. In: Ramos AA, Villares JB, Moura JC. (Ed.). Os búfalos. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1981. p. 01-54.

COELHO, L.C.T. **Anaplasmose bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente.** 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

COLLINS, N.E., ALLSOPP, M.T.E.P. E ALLSOPP, B.A. 2002. Molecular diagnosis of theileriosis and heartwater in bovines in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 217-224.

CORRÊA F.N. 2011. Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 99p.

COSTA JUNIOR, L. M. et al. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Veterinary Parasitology*, v. 139, p. 231-236, 2006.

DA SILVA, A.S., LOPES, L.S., DIAZ, J.D., TONIN, A.A., STEFANI, L.M., ARAÚJO, D.N., 2013. Lice outbreak in buffaloes: evidence of *Anaplasma marginale* transmission by sucking lice *Haematopinus tuberculatus*. *J. Parasitol.* 99 (3), 546–547.

DA SILVA, J.B.; DA FONSECA, A.H.; BARBOSA, J.D. Molecular characterization of *Anaplasma marginale* in ticks naturally feeding on buffaloes. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *35*, 38–41, doi:10.1016/j.meegid.2015.07.027.

DA SILVA, J.B.; LOPES, C.T. DE A.; DE SOUZA, M.G.S.; GIBSON, A.F.B.; VINHOTE, W.M. DE S.; DE FONSECA, A.H.; DE ARAÚJO, F.R.; BARBOSA-NETO, J.D. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma marginale* em búfalos na ilha de Marajó, Pará. *Pesqui. Vet. Bras.* **2014**, *34*, 11–14, doi:10.1590/S0100-736X2014000100002.

DAHLGREN, F.S., MANDEL, E.J., KREBS, J.W., MASSUNG, R.F., MCQUISTON, J.H., 2011. Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the USA, 2000–2007. *Am.J.Trop. Med. Hyg.* **85**, 124–131.

DAMÉ, M. C. F. **Búfalo: animal de tração**. Pelotas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006.

DIKMANS, G., 1950. The transmission of anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* 11, 5–16.

D'OLIVEIRA, C., VAN DER WEIDE, M., HABELA, M.A., JACQUIET, P. E JONGEJAN, F. 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33(10): 2665-2669.

DUMLER JS, BARBET AF, BEKKER CP, DASCH GA, PALMER GH, RAY SC, RIKIHISA Y, RURANGIRWA FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichiaequi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001 Nov;51(Pt 6):2145-2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145. PMID: 11760958.

FARAH, S.B.. DNA: segredos e mistérios. **São Paulo: Editora Sarvier**, 1997. Cap. 5, p. 103-140.0.

FONSECA, A. & BRAGA, A. 1924. Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos. Off. Typog. Do Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. 216 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Faostat – Statistics Database, 2017. Disponível em: Acessado em: 09 de julho de 2022.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. IN: RISTIC, M Babesiosis of domestical animals and man. Florida, p.23-52, 1988.

FUENTE, J. de la, PASSOS, L.M.F., BUSSCHE, R.A. van den, RIBEIRO, M.F.B., FACURY-FILHO, R.J., KOCAN, K.M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitology*, v.121, p.307-16, 2004.

FURLONG J, ABREU HGL, VERNEQUE RS. Parasitoses dos bovinos na região da Zona da Mata de Minas Gerais: I. Comportamento estacional de nematódeos gastrintestinais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1985; 20: 143- 153.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região sudeste do Brasil. *Cad. Téc. Esc. UFMG*, Belo Horizonte, v. 8, p. 49-61, 1993.

GALE, K.R.; DIMMOCK, C.M.; GARTSIDE, M.; LEATCH. G. *Anaplasma marginale*:

detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 1103-1109, 1996.

GONÇALVES, P. M. Epidemiology and control of bovine babesioses and anaplasmosis in southeast region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p.187-194, 2000.

GORDON, J. L.; SIBLEY, L. D. Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. **BMC Genomics**, v. 6, n. 1, p. 179, 2005.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G.E.M. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995

GUO, W.P.; TIAN, J.H.; LIN, X.D.; NI, X.B.; CHEN, X.P.; LIAO, Y.; YANG, S.Y.; DUMLER, J.S.; HOLMES, E.C.; ZHANG, Y.Z. Extensive genetic diversity of Rickettsiales bacteria in multiple mosquito species. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/SREP38770.

HARWOOD, R.F. & JAMES, M.T. 1979. *Entomology in Human and Animal Health*. Seventh Edition. Macmillan Publishing Co., New York. 548p

HE, L., FENG, H. H., ZHANG, W. J., ZHANG, Q. L., FANG, R., WANG, L. X., TU, P., ZHOU, Y. Q., ZHAO, J. L., & OOSTHUIZEN, M. C. (2012). Occurrence of Theileria and Babesia species in water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Hubei province, South China. *Veterinary Parasitology*, *186*(3-4), 490-496. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2011.11.021>.

HORNOK, S., ELEK, V., DE LA FUENTE, J., NARANJO, V., FARKAS, R., MAJOROS, G., FOLDVÁRI, G., 2007. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet. Microbiol.* *122*, 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.024>.

HOSSEINI VASOUKOLAEI, NASIBEH & OSHAGHI, MOHAMMAD & SHAYAN, PARVIZ & VATANDOOST, HASSAN & BABAMAHOODI, FARHANG & YAGHOUBI ERSHADI, MOHAMMAD REZA & ZAKKYEYEH, TELMADARRAIY & MOHTARAMI, FATEMEH. (2014). Anaplasma Infection in Ticks, Livestock and Human in Ghaemshahr, Mazandaran Province, Iran. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases*.

HÜHN, S., LOURENÇO JUNIOR, J.B., MOURA CARVALHO, L.O.D., NASCIMENTO, C.N.B., VIEIRA, L.C. Aproveitamento do leite de búfala em produtos derivados. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1, 1984, Belém. Anais. Belém: EMBRAPA - PATU, 1986. v.5. p.265-269.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA: Produção da Pecuária Municipal, 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=resultados>. Acesso em: 15 jul. 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Maior concentração de búfalos do país, Ilha do Marajó está no Censo Agro. Rio de Janeiro, 13 nov. 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2vXJkQd>. Acesso em: 10 jul. 2022.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

KHUMALO ZTH, CATANESE HN, LIESCHING N, HOVE P, COLLINS NE, CHAISI ME, GEBREMEDHIN AH, OOSTHUIZEN MC, BRAYTON KA. 2016. Characterization of *Anaplasma marginale* subsp. centrale strains by use of *msp1a*S genotyping reveals a wildlife reservoir. *J Clin Microbiol* 54:2503–2512. doi:10.1128/JCM.01029-16.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n. 4, p.698-712, 2003.

KOCAN, K.M., DE LA FUENTE, J., BLOUIN, E.F., COETZEE, J.F., EWING, S.A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>.

KOCAN, K.M., DE LA FUENTE, J., CABEZAS-CRUZ, A., 2015. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev. Sci. Tech.* 34 (2), 577–586.

LANGENWALDER, D.B.; SCHMIDT, S.; GILLI, U.; PANTCHEV, N.; GANTER, M.; SILAGHI, C.; AARDEMA, M.L.; VON LOEWENICH, F.D. Genetic characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains from goats (*Capra aegagrus hircus*) and waterbuffalo (*Bubalus bubalis*) by 16S rRNA gene, *ankA* gene and multilocus sequence typing. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **2019**, 10, 101267, doi:10.1016/j.ttbdis.2019.101267.

LÁU HD. Doenças em Búfalos no Brasil: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle. Belém: EMBRAPA, CPATU, 1999. p. 27-31.

LI, Y., LUO, J., LIU, Z., GUAN, G., GAO, J., MA, M., DANG, Z., LIU, A., REN, Q., LU, B., LIU, J., ZHAO, H., LI, J., LIU, G., BAI, Q. E YIN, H. 2007. Experimental transmission of *Theileria* sp. 46 (China 1) infective for small ruminants by *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis qinghaiensis*. *Parasitology Research* 101(3): 533-538.

LIMA WS. Controle das helmintoses dos bovinos. In: BRESSAN, M. Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2000. 65p.

LOURENÇO JÚNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. Panorama da bubalinocultura na Amazônia. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA, 1. 2008, Belém, PA. Belém: Sebrae-PA, 2008.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction : Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. May, p. 1–15, 2012.

MAHONEY, D.F; WRIGHT, I. G; MIRRE, G. B. Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 67, p. 197-203, 1973.

MARQUES, J.B.F. **Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA). – Brasília : Embrapa Comunicação para Transferência deTecnologia, 2000. 176p.; (Coleção 500 Perguntas, 500 Respostas).

MARTIRE, T. M.. Métodos rápidos de diagnóstico. In: SANT’ANA, C.C. Tuberculose:na infância e na adolescência. São Paulo: Atheneu, 2002. Cap. 11, p. 95-109.

MELO, I. O. **Balanço ácido-base, hidroeletrólítico e hemograma de bezerros inoculados com *Anaplasma marginale***. 2018. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2018.

MENDONCA, F. L. **Utilização de isolados de *Anaplasma marginale* de baixa virulência em protocolos de imunização de bezerros: análise dos efeitos pós-vacinaise proteção contra o desafio natural**. 2015. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.2015.

MINERVINO, A. H. H., ZAVA, M., VECCHIO, D., & BORGHESE, A. (2020). *Bubalus bubalis*: A Short Story. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 570413. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.570413>

MINERVINO, A. H. H; CARDOSO, E. C.; ORTOLANI, E. L. Características do sistema produtivo da pecuária no município de Santarém, Pará. *Acta Amazônica*, 2008; 38(1): 11-16.

MOHAN R.N. 1968. Diseases and Parasites of Buffaloes. III. Parasitic and miscellaneous diseases. *Vet. Bulletin* 38:735-756.

MOLAD, T.; MAZUZ, M.L.; FLEIDEROVITZ, L.; FISH. L.; SAVITSKY. I.; KRIGEL. Y.; LEIBOVITZ. B.; MOLLOY. J.; JONGEJAN. F.; SHKAP. V. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 55-62, 2006.

MOREIRA, P.; COSTA, A. L.; VALENTIN, J. F. Comportamento produtivo e reprodutivo de bubalinos mestiços Murrah-Mediterrâneo em pastagem cultivada em terra firme, no Estado do Acre. Rio Branco: EmbrapaCPAF-Acre, 1994. 19 p. (Boletim de Pesquisa, 13).

NGUYEN, A.H.L.; TIAWSIRISUP, S.; KAEWTHAMASORN, M. Molecular detection and genetic characterization of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys*- like (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in water buffalo from eight provinces of Thailand.*BMC Vet. Res.* **2020**, 16, 1–12, doi:10.1186/s12917-020-02585-z.

NITHIKATHKUL, C.; POLSEELA, P.; CHANGSAP, B.; LEEMINGSAWAT, S. A Study of ixodid ticks on domestic animals in Samut Prakan Province, Thailand. **Southeast Asian Journal Tropical Med Public Health**, v. 33, supl. 3, p. 41-44, 2002.

NORVAL, R.A.I., PERRY, B.D. E YOUNG, A.S. 1992. The Epidemiology of Theileriosis in Africa. Academic Press Limited, London.

OBREGÓN, D.; CABEZAS-CRUZ, A.; ARMAS, Y.; SILVA, J.B.; FONSECA, A.H.; ANDRÉ, M.R.; ALFONSO, P.; OLIVEIRA, M.C.S.; MACHADO, R.Z.; CORONA-GONZÁLEZ, B. High co-infection rates of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* in water buffalo in Western Cuba. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*,955–967, doi:10.1007/s00436-018-06194-6.

OIE. Bovine anaplasmosis. OIE Terrestrial manual. [S.l: s.n.], 2017. v.13. p. 1-15. OIE. TERRESTRIAL ANIMAL HEALTH CODE. 46. ed. [S.l.]: Publications, World Organisation for Animal Health (OIE), 2017. v. I. Disponível em: <<https://www.oie.int/doc/ged/D10905.PDF>>. Acessado em: 02 jan 2021.

OLIVEIRA, C. M. C., BARBOSA, J. D., CAVALEIRO DEMACEDO, R. S., BRITO, M. F., PEIXOTO, P. V., TOKARNIA, C. H. Estudo comparativo da toxidez de *Palicourea juruana* (Rubiaceae) para búfalos e bovinos Pesquisa Veterinária Brasileira, v.24,n. 1, p. 27-30, 2004.

OLIVEIRA, F. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.122-134, abril/jun. 2005.

PAPADOPOULOS, B., PERIÉ, N.M. E UILENBERG, G. 1996. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 1. Serological cross-reactions. *Veterinary Parasitology* 63(1-2): 41-56. *Parasitol.* v.129, p.247-69, 2004.

PIERRE, C.; LECOSSIER. D.; BOUSSONGANT, Y.; BOCART, D.; JOLY V.; YENI, P.. Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 712-719, 1991.

PONCHEL, F., TOOMES, C., BRANSFIELD, K., LEONG, F.T., DOUGLAS, S.H., FIELD, S.L., BELL, S.M., COMBARET, V., PUISIEUX, A., MIGHELL, A.J., ROBINSON, P.A., INGLEHEARN, C.F., ISAACS, J.D. E MARKHAM, A.F. 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3.

PRADO, I. C. B., CAPUNO, L. X. B., COLLERA, P. DLP., CABRALDA, A. P. D., DE RAMOS, K. A. S., BERNARDO, J. M. G., DIVINA, B. P., MASATANI, T., TANAKA, T., & GALAY, R. L. (2022). Molecular Detection and Characterization of *Babesia* and *Theileria* in Cattle and Water Buffaloes from Southern Luzon, Philippines. *Microorganisms*, *10*(4), 678. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040678>.

PRESTON, P.M. 2001. Theilerioses. In *The Encyclopedia of Arthropod-transmitted Infections of Man and Domesticated Animals* (M. W. Service ed), pp 487-502, CABI Publishing, Oxon, UK.

PURNELL, R.E. 1978. *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries on the northern Mediterranean littoral. *Veterinary Science Communications* 2: 3-10.

RAJPUT Z.I., HU S., ARIJO A.G., HABIB M. & KHALID M. 2005. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6:1057-1062.

RAR, V., GOLOVLJOVA, I., 2011. *Anaplasma*, Ehrlichia, and “Candidatus Neoehrlichia” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infec. Gen. Evol.* 11 (8), 1842–1861.

RAR, V.A., EPIKHINA, T.I., EFREMOVA, E.A., MARCHENKO, V.A., SUNTSOVA, O.V., LISAK, O.V., DOROSHCHENKO, E.K., ZUBAREVA, I.M., TIKUNOV, A.YU., TIKUNOVA, N.V., 2015. Molecular genetic analysis of infection agents of farm animals anaplasmosis on the territory of Western and Eastern Siberia. *Acta Biomed. Sci.* 5, 83–87 (in Russian).

REDDY G.R., MORE T., SHARMA S.P. & SINGH L.N. 1988. The oxidant defense system in water-buffaloes (*Bubalus bubalis*) experimentally infected with *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 27:245-249.

RIBEIRO, H.F.L. **Reprodução de bubalinos na região Amazônia.** Setor de Reprodução Animal ISPA/UFRA. 2008. Belém, Pará.

RIBEIRO, M.F.B.; SALCEDO, J.H.P.; SANTOS, J.L. Inquérito de opinião com criadores da Zona da Mata do estado de Minas Gerais: I. Alguns fatores associados com a mortalidade de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 35, s. n., p. 547-556, 1983.

ROBINSON, P.M. 1982. Theileriosis *annulata* and its transmission - A review. *Tropical Animal Health and Production* 14(1): 3-12.

ROCHA, DÉLCIO1. Bubalinocultura: Os Búfalos no Brasil. Publicado em 17/05/2007. Disponível em <http://www.zootecniabrasil.com.br/>, acessado em 01/06/2009. Fonte: Redação Rural News.

ROCHA, DÉLCIO2. Bubalinocultura: Búfalo: sinônimo de produção de carne. Publicado em 17/05/2007. Fonte: Embrapa Rondônia. Disponível em <http://www.zootecniabrasil.com.br/>, acessado em 10/07/2022.

ROCHA, U. F.; SERRA, O. P.; GROCK, R.; SERRA, R. G. Infestação natural de búfalos – *Bubalus bubalis* L., 1758 – dos estados de São Paulo e de Minas Gerais, Brasil, por

Boophilus microplus (Canestrini, 1997) e por *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), Acari, Ixodidae. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, n. 4, p. 197-199, 1969.

SANTOS, E. A. et al. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, p. 1522–1525, 2014.

SCHNITTGER, L., YIN, H., JIANXUN, L., LUDWIG, W., SHAYAN, P., RAHBARI, S., VOSS-HOLTMANN, A. E AHMED, J.S. 2000. Ribosomal small-subunit RNA gene-sequence analysis of *Theileria lestoquardi* and a *Theileria* species highly pathogenic for small ruminants in China. *Parasitology Research* 86(5): 352-358.

SCHNITTGER, L., YIN, H., QI, B., GUBBELS, M.J., BEYER, D., NIEMANN, S., JONGEJAN, F. E AHMED, J.S. 2004. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitology Research* 92(3): 189-196.

SHAW, M. K. *Theileria* Development and Host Cell Invasion. In: [s.l.] Springer, Boston, MA, 2002. p. 1–22.

SILVA, J. B.; VINHOTE, W. M. S.; OLIVEIRA, C. M. C.; ANDRÉ, M. R.; FONSECA, A. H.; MACHADO, R. Z.; BARBOSA, J. D. Molecular and serológica prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in the northern Brazil. *Ticks and Tick Borne Diseases*, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 100-104, mar. 2014.

SILVA, JENEVALDO BARBOSA DA et al. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma marginale* em búfalos na Ilha de Marajó, Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira* [online]. 2014, v. 34, n. 1 [Acessado 11 Julho 2022] , pp. 11-14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000100002>>. Epub 14 Abr 2014. ISSN 1678-5150. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000100002>.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Molecular assays reveal the presence of *Theileria* spp. and *Babesia* spp. in Asian water buffaloes (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Amazon region of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1017–1023, 2016.

SILVEIRA, J. A. G., DE OLIVEIRA, C. H. S., SILVESTRE, B. T., ALBERNAZ, T. T., LEITE, R. C., BARBOSA, J. D., OLIVEIRA, C. M. C., & RIBEIRO, M. F. B. (2016). Molecular assays reveal the presence of *Theileria* spp. and *Babesia* spp. in Asian water buffaloes (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Amazon region of Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 1017–1023. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2016.05.009>.

SINGH, S., KHATRI, N., MANUJA, A., SHARMA, R.D., MALHOTRA, D.V. E NICHANI, A.K. 2001. Impact of field vaccination with a *Theileria annulata* schizont cell culture vaccine on the epidemiology of tropical theileriosis. *Veterinary Parasitology* 101(2): 91-100.

SIVAKUMAR, T. et al. Evolution and genetic diversity of *Theileria*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 250–263, 2014.

SOUZA J.C.P., SOARES C.O., MASSARD C.L., SCOFIELD A. & FONSECA A.H. 2000. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesq. Vet. Bras.* 20:97-101.

SOUZA, R.S., M.F.S. RESENDE, L.C.A. FERREIRA, R.S. FERRAZ, M.V.V.ARAÚJO, C. V. BASTOS, J.A.G. SILVEIRA, T.F. MOREIRA, R.M. MENESES, A.U. CARVALHO, F.O.P. LEME, E.J. FACURY FILHO. 2021. Monitoring bovine tick fever on a dairy farm: Na economic proposal for rational use of medications. **Journal of DairyScience**. v.104, p.5643- 5651, 2021.

SPARE, M. R.; HANZLICEK, G. A.; WOOTTEN, K. L.; ANDERSON. G, A.; THOMSON. D. U.; SANDERSON. M, W.; GANTA. R, R.; REIF. K, E.; RAGHAVAN. R, K. Bovine anaplasmosis herd prevalence and management practices as risk-factors associated with herd disease status. **Veterinary Parasitology**, v. 3, s. n., p. 100021-100027, 2020.

STICH, R.W., KOCAN, K.M., PALMER, G.H., EWING, S.A., HAIR, J.A., BARRON, S.J., 1989. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1377–1380

TANAKA, Y., KIMURA, Y., MITANI, Y., KAWAI, Y., LEZHAVA, A., NOMA, S., TAGAMI, M., KAWAI, J., HAYASHIZAKI, Y. E USUI, K. 2010. Effects of the turn-back primer on intermediate product generation in isothermal DNA amplification. *BioTechniques* 49(6): 888-92.

TERKAWIA, M.A.; HUYENA, X.N.; CAO, S.; IMPANKAEWB,T.; MAKLONC, K.; ABOULALAA, M.; UENOA, A.; GOOA, Y.; YOKOYAMAA, N.; JITTAPALAPONGB, S.; XUANA, X.; IGARASHIA, I. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Veterinary Parasitology*, vol vol.178, pp. 201-207, 2011.

THEILER A. 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle, p 7–46. *First Report of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa*. Johannesburg, South Africa.

TONHATI, H.; VASCONCELLOS, F.B.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetics aspects of productive and reproductive traits in a Murrah buffalo herd in São Paulo, Brazil. *Journal Animal Breeding Genetic*, v. 117, p. 331- 336, 2000.

UETI, M.W., KNOWLES, D.P., DAVITT, C.M., SCOLES, G.A., BASZLER, T.V., PALMER, G.H., 2009. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strainspecific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 77 (1), 70–75.

UILENBERG, G. 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Veterinary Parasitology* 57(1-3): 19-41.

UILENBERG, G. Babesia-A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1–2, p. 3–10, 2006.

URGUHART GM, ARMOUR J, DUNCAN JL, DUNN AM, JENNINGS FW (1998) “Filo PROTOZOA” Parasitologia Veterinária, 2ª Ed., Editora Guanabara Koogan S.A., 210-216.

VALE, W. G.; MINERVINO, A. H. H.; NEVES, K. A. L.; MORINI, A. C.; COELHO, J. A. S. Buffalo under Threat in Amazon Valley, Brazil. *Buffalo Bulletin*, 2013; 32: 121-131.

VENEZIANO, V.; SANTANIELLO, M.; CARBONE, S.; PENNACCHIO, S.; MORGOGNONE, M.E.; SCHIOPPI, M.; CONDOLEO, R.; G. CRINGOLI, G. Lice (*Haematopinus tuberculatus*) in water buffalo farms from central Italy. *Ital.J.Anim.Sci.*, vol.6, pp.926-927, 2007.

VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. **Ciência Rural**, v. 31, s. n., p. 361-368, 2001.

VILLAR, M., LÓPEZ, V., AYLLÓN, N., CABEZAS-CRUZ, A., LÓPEZ, J.A., VÁZQUEZ, J., ALBERDI, P., DE LA FUENTE, J., 2016. The intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum* selectively manipulates the levels of vertebrate host proteins in the tick vector *Ixodes scapularis*. **Parasit. Vectors** **9**, 467.

VINODKUMAR, K. et al. Fatal *Theileria orientalis* N2 genotype infection among Asian water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in a commercial dairy farm in Kerala, India. **Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 69–74, 2016.

WOLDEHIWET, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Vet. Parasitol.** 167 (2–4), 108–122.

ZAEEMI, M., HADDADZADEH, H., KHAZRAIINIA, P., KAZEMI, B. E BANDEHPUR, M. 2010. Identification of different *Theileria* species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis*, and *Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. **Parasitology Research**.

ZAUGG, J.L., 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am. J. Vet. Res.* 46 (3), 570–572.

ZHANG, Z.H. 1997. A general review on the prevention and treatment of *Theileria annulata* in China. **Veterinary Parasitology** 70(1-3): 77-81.