



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Andreina de Carvalho Araujo

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Theileria orientalis* EM
BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) DO PARÁ, BRASIL**

Belo Horizonte
2022

Andreina de Carvalho Araujo

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Theileria orientalis* EM
BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) DO PARÁ, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia Veterinária.

Orientadora: Prof. Dra. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira.

Belo Horizonte
2022

043

Araujo, Andreina de Carvalho.

Detecção e caracterização molecular de *Theileria orientalis* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Pará, Brasil [manuscrito] / Andreina de Carvalho Araujo. – 2022.

146 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Theileriose. 3. Genótipo. 4. Filogeografia. 5. Variação Genética. 6. Linfoma. I. Silveira, Júlia Angélica Gonçalves da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Detecção e Caracterização Molecular de *Theileria orientalis* em Búfalos(*Bubalus bubalis*) do Pará, Brasil".

ALUNA: ANDREINA DE CARVALHO ARAUJO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **25 de março de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Daniel Sobreira Rodrigues

EPAMIG

Lívio Martins Costa Junior

UFMA

Ricardo Nascimento Araújo

UFMG

Tiago Facury Moreira

UFMG

Júlia Angélica Gonçalves da Silveira

Orientadora (UFMG)

Belo Horizonte, 25 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Julia Angelica Goncalves da Silveira, Professora do Magistério Superior**, em 28/03/2022, às 08:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Livio Martins Costa junior, Usuário Externo**, em 28/03/2022, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Sobreira Rodrigues, Usuário Externo**, em 28/03/2022, às 12:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Nascimento Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2022, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiago Facury Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 04/04/2022, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1320933** e o código CRC **C47E49D8**.

Com imensurável amor dedico esta conquista à minha família, pelo incentivo, confiança, carinho e apoio incondicional que me encorajaram a superar todos os obstáculos que surgiram nessa trajetória e a focar-me com dedicação e gratidão aos meus objetivos.

Agradecimentos

À CAPES, pela bolsa de doutorado.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao povo brasileiro que financiou a minha formação acadêmica desde o jardim de infância à pós-graduação.

À minha orientadora, professora Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, pelos ensinamentos e confiança durante todos esses anos.

Ao professor José Diomedes Barbosa, pelo interesse, ensinamentos, por atender cada questionamento ou solicitação durante a execução deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental.

À professora Natália Silva da Silveira pelo auxílio durante a obtenção de amostras e realização das análises hematológicas e a sua aluna Raquel Silva. Sua colaboração foi fundamental.

Ao Dr. Cairo Henrique S. Oliveira e ao Prof. Alison M. Santos pelo compartilhamento de parte das amostras deste trabalho.

A Professora Marilene Farias Brito, pela colaboração nas análises histopatológicas.

Ao Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis e a Dra. Cláudia Fidelis, pelo auxílio nas análises moleculares dos agentes virais.

Aos professores da clínica de ruminantes por todo o empenho nas coletas e em especial aos Professores Antônio Último de Carvalho e Elias Jorge Facury Filho por tanta dedicação e trabalho nas coletas das amostras de bubalinos do estado de Minas Gerais e por tanto aprendizado. Muito obrigada.

Ao Prof. Marc Roger Jean Marie Henry (*In memoriam*) pela doação do bezerro de búfalo Ricardo Bruno (que deu sua vida por esse trabalho).

Ao Prof. Ricardo Wagner de Almeida Vitor, pelo interesse, disponibilidade na realização da sorologia para toxoplasmose, sugestões, ensinamentos e por todo carinho nesses anos.

Ao Dr. Antônio A.A. Fonseca-Junior pelo auxílio nas análises iniciais (filogenéticas).

Ao Prof. Rinaldo Aparecido Mota e a Dra. Pollyanna, pela colaboração nas análises sorológicas para neosporose.

À Professora Élide Mara, meu agradecimento especial por me receber tão gentilmente e me agregar ao seu laboratório.

À Professora Maria Norma Melo e em especial a Dra. Soraia Oliveira, por todo suporte financeiro que foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Hudson Andrade, por sua incansável disposição, torcida, apoio incondicional nesses cinco anos, por tanto carinho e amizade. Muito obrigada!!

Aos residentes da clínica de ruminantes (EV/UFMG), João, Pedro, Guilherme, Cleber e ao Alexandre pelo auxílio nas coletas. Muito obrigada!

Aos proprietários das fazendas visitadas, por colaborarem gentilmente neste estudo.

Às alunas de iniciação científica Alexia, Giovanna e Ana Luiza por toda colaboração, aprendizado e amizade.

Aos alunos que passaram pelo Laboratório de Protozoologia Veterinária (ICB) nestes cinco anos, e que contribuíram para que longas jornadas de trabalho fossem prazerosas e aos que além de colegas de trabalho tornaram-se amigos. Em especial, a Andrea Amaral, Mariana Sebastiani, Morgana Resende, Alexia, Giovanna e Ana Luiza.

Aos membros do Laboratório de Parasitologia Molecular (ICB), Celi, Vivian e em especial a Talita, Luís Fernando e Nayara por caminharem ao meu lado durante esses anos, por todo aprendizado, carinho e amizade.

Aos Professores Érika Braga e Múcio Ribeiro pelas excelentes contribuições na qualificação de doutorado.

À secretaria de Pós-Graduação em Parasitologia, Sibele e a querida Sumara pelo carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela minha formação enquanto pesquisadora.

À Coordenação da Pós-Graduação em Parasitologia, representada pela professora Hélida Andrade, que sempre com muito carinho, empatia auxiliou para a finalização deste trabalho.

Aos funcionários do departamento, em especial ao Sr. Nery, Dona Cida, Rosálida (Rosinha) e Elaine por todo carinho e amizade.

Ao inesquecível Ricardo Bruno (búfalo) por tanto carinho, amor e aprendizado.

À Camila Botelho, seu apoio, carinho e amizade foram essenciais no meu caminhar.

À Cíntia Lima, Juliana Assunção e Stephanie, ajuda de vocês na etapa final foi essencial para conclusão da redação desse trabalho, pela amizade e os ensinamentos sobre física.

Aos meus queridos amigos que a parasitologia do ICB me proporcionou, pelo companheirismo, muitas risadas, pão de queijo, doses de café, cachaça e por persistirem ao meu lado e proporcionarem leveza a esses cinco anos. Em especial, Angelina, Carla, Lara Ribeiro, Eduardo, Asmat, Mariana Sebastiani, Salene, Selma, Letícia Estevam, Andréa Amaral, Pedrinho, Adalberto, Andreia, Anisleidy, Ana Mércia.

À minha família, em especial a minha irmã Andryelly. Ninguém disse que seria fácil e não havia expectativas de que fosse, mas caminhar com vocês, mesmo que distantes geograficamente, nada teria sido possível.

A todos que incentivaram, acreditaram, torceram, aos que não atrapalharam e aos que muito atrapalharam, o meu muito obrigada!

“Oh, take your time, don't live too fast
Troubles will come, and they will pass (...)”

“And be a simple kind of man (...)”

Lynyrd Skynyrd

Resumo

No presente estudo, foi investigada a diversidade genética de *Theileria orientalis* que circulam entre populações de búfalos de nove rebanhos com e sem histórico de linfomas do estado do Pará, na região Amazônica, Brasil. Foram avaliadas molecularmente amostras sanguíneas de 500 animais, ao longo dos anos de 2011 e 2020, das raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi, de ambos os sexos, com idade variando entre 2 e 15 anos. Amostras de 135 animais também foram avaliadas através das técnicas parasitológicas diretas de esfregaço sanguíneo, *Buffy coat*, técnica de Woo e Brener para pesquisa direta de hemopatógenos. Seis animais com suspeita de linfoma também foram avaliados através de necropsia, análises histopatológicas, análise molecular das massas tumorais e linfonodos, análise citológica de linfonodo de quatro animais e diagnóstico diferencial para vírus causadores de linfoma das espécies *Bovine leukemia virus*, *Bovine herpesvirus 6* e de *Bovine immunodeficiency virus* e hemopatógenos dos gêneros *Anaplasma*; *Ehrlichia*; *Mycoplasma*; *Babesia* e *Trypanosoma*. Nenhum hemopatógeno foi detectado através das técnicas parasitológicas diretas. Das 500 amostras sanguíneas submetidas às análises moleculares dirigidas ao gene *18S rRNA* do gênero *Theileria* 15,4% (77/500) foram positivas. Essas mesmas amostras foram positivas quando avaliadas para os genes *ITS* e *MPSP*, específicos de *T. orientalis*. Foi possível obter 21 sequências com qualidade referentes ao gene *MPSP* (~770pb) para análises filogenéticas. A análise da sequência de nucleotídeos dos fragmentos do gene *MPSP* de *T. orientalis* amplificados a partir de amostras de DNA de sangue positivas para *T. orientalis* revelaram a presença de três genótipos. Destes, o presente estudo descreveu pela primeira vez a presença de um novo genótipo de parasito do complexo *T. orientalis*, nomeadamente *tipo N4*. Os genótipos consistiram nos tipos *N1*, *N2* e *N4*. Também foram incluídos no presente estudo seis casos de linfomas em bubalinos de duas propriedades localizadas no Pará, onde foi realizado um estudo clínico-anatomopatológico e etiológico desses linfomas. Pelas características anatomopatológicas os linfomas foram caracterizados como multicêntrico acometendo animais com idade entre dez e 11 anos. Não foi detectada a presença de material gênico de vírus e hemopatógenos nos linfomas e sangue desses animais, no entanto foi verificada a presença de DNA de *T. orientalis* pelo gene *ITS*, *18S rRNA* e *MPSP*. Pelas inferências filogenéticas do gene *MPSP* as sequências isoladas dos linfomas apresentaram os genótipos *N2* e *N4*. O novo genótipo *N4* foi o mais frequente nas populações estudadas e parece estar envolvido na etiologia dos linfomas nos animais avaliados. Este é o primeiro relato que descreve a diversidade genética de *T. orientalis* em búfalos de água na América do Sul e seu possível envolvimento etiológico com linfomas em búfalos.

Palavras-chave: Theileriose. gene *MPSP*. Genótipo. Filogeografia. Diversidade genética. Linfoma.

Abstract

In the present study, we investigated the genetic diversity of *Theileria orientalis* circulating among buffalo populations from nine herds with and without a history of lymphoma in the state of Pará, in the Amazon region, Brazil. Blood samples from 500 animals were molecularly evaluated, over the years 2011 and 2020, from Murrah, Mediterranean and Jafarabadi breeds, of both sexes, aged between 2 and 15 years. Samples from 135 animals were also evaluated using the direct parasitological techniques of blood smear, *Buffy coat*, Woo and Brener technique for direct investigation of hemopathogens. Six animals with suspected lymphoma were also evaluated through necropsy, histopathological analysis, molecular analysis of tumor masses and lymph nodes, cytological analysis of lymph nodes from four animals and differential diagnosis for viruses that cause lymphoma of the species *Bovine leukemia virus*, *Bovine herpes virus 6* and *Bovine immunodeficiency virus* and hemopathogens of the *Anaplasma* genera; *Ehrlichia*; *Mycoplasma*; *Babesia* and *Trypanosoma*. No hemopathogens were detected through direct parasitological techniques. Of the 500 blood samples submitted to molecular analyzes directed to the 18S rRNA gene of the genus *Theileria*, 15.4% (77/500) were positive. These same samples were positive when evaluated for *ITS* and *MPSP* genes, specific for *T. orientalis*. It was possible to obtain 21 quality sequences referring to the *MPSP* gene (~770pb) for phylogenetic analysis. Nucleotide sequence analysis of *MPSP* of *T. orientalis* gene fragments amplified from *T. orientalis* positive blood DNA samples revealed the presence of three genotypes. Of these, the present study described for the first time the presence of a new parasite genotype of the *T. orientalis* complex, namely type N4. The genotypes consisted of types N1, N2 and N4. Also included in the present study were six cases of lymphomas in buffaloes from two properties located in Pará, where a clinical, anatomopathological and etiological study of these lymphomas was carried out. Due to the anatomopathological characteristics, the lymphomas were characterized as multicentric, affecting animals aged between ten and 11 years. The presence of genetic material from viruses and hemopathogens was not detected in the lymphomas and blood of these animals, however, the presence of *T. orientalis* DNA was verified by the *ITS* gene, 18S rRNA and *MPSP*. By the phylogenetic inferences of the *MPSP* gene, the sequences isolated from the lymphomas presented the genotypes N2 and N4. The new N4 genotype was the most frequent in the populations studied and seems to be involved in the etiology of lymphomas in the evaluated animals. This is the first report describing the genetic diversity of *T. orientalis* in water buffaloes in South America and its possible etiological involvement with lymphomas in buffaloes.

Keywords: Theileriosis. *MPSP* gene. Genotype. Phylogeography. Genetic diversity. Lymphoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo esquemático de parasitos do gênero <i>Theileria</i> .	32
Figura 2	Mapa do Brasil mostrando o estado do Pará e os municípios onde foram coletadas as amostras.	60
Figura 3	Filograma com base no critério da Máxima Verossimilhança (MV) do gene <i>MPSP</i> de espécies de <i>Theileria orientalis</i> . Suporte nodal ‘bootstrap’/probabilidade posterior estão indicados acima dos nós. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em vermelho e negrito. A barra de escala indica o número de substituições nucleotídicas por local.	82
Figura 4	Análise de distância pelo <i>software SplitsTree4</i> com os parâmetros “Neighbor-Net” e “Uncorrected p-distance” para o gene <i>MPSP</i> de sequências de <i>Theileria orientalis</i> obtidas a partir de búfalos amostrados no presente estudo, em comparação com sequências previamente detectadas em búfalos de água, bovinos (sequências depositadas no <i>GenBank</i>).	84
Figura 5	<i>Network</i> dos haplótipos baseados no gene <i>MPSP</i> de <i>Theileria orientalis</i> de sequências detectadas em búfalos no Brasil e no mundo.	85
Figura 6	Linfoma em búfala da raça Mediterrânea, pertencente a propriedade A-PA, localizada em Castanhal, PA.	87
Figura 7	Linfoma em búfala da raça Murrah, pertencente a propriedade E-PA, localizada em Nova Timboteua, PA.	88
Figura 8	Secção histológica de linfonodo.	92

Figura 9	Seção histológica de rim e fígado.	92
Figura 10	Seção histológica pulmão.	93
Figura 11	Filograma com base no critério <i>Neighbor Joining</i> (NJ) do gene <i>MPSP</i> de espécies de <i>Theileria orientalis</i> . Suporte nodal <i>Bootstrap</i> estão indicados acima dos nós. As sequencias amplificadas no presente estudo estão destacadas em vermelho e negrito. A barra de escala indica o número de substituições por local.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de propriedades amostradas, e distribuição das amostras sanguíneas coletadas ao longo dos anos de 2011 e 2020, no estado do Pará, região Amazônica, Brasil.	59
Tabela 2	Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para ensaios de <i>nested</i> -PCR e cPCR para detecção de <i>Theileria orientalis</i> .	64
Tabela 3	Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para ensaios de PCR e <i>nested</i> -PCR para detecção de hemopatógenos.	74
Tabela 4	Frequência de animais positivos nos testes parasitológicos (esfregaços sanguíneos e <i>Buffy coat</i>) e moleculares (<i>nested</i> -PCR e cPCR) segundo a localização das propriedades, histórico de linfoma ao longo dos anos de 2011 e 2020, no estado do Pará.	78
Tabela 5	Genótipos de <i>Theileria orientalis</i> baseados no gene <i>MPSP</i> em búfalos de água do estado do Pará.	79
Tabela 6	Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências representativas do gene <i>MPSP</i> categorizadas em cada genótipo.	81
Tabela 7	Polimorfismo e diversidade genética de <i>Theileria orientalis</i> detectada em búfalos de água do estado do Pará.	83
Tabela 8	Detecção de <i>Theileria orientalis</i> em fragmentos de tecidos, linfa e sangue de bubalinos submetidos a necropsia, provenientes de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região Amazônica, Brasil.	98

Tabela 9 Genótipos de *Theileria orientalis* baseados no gene *MPSP* em fragmentos 99
de tecidos, linfa e sangue de bubalinos submetidos a necropsia,
provenientes de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região
Amazônica, Brasil.

LISTA DE QUADRO

- | | | |
|----------|--|----|
| Quadro 1 | Resumo dos achados patológicos de seis casos de linfoma em búfalos de água de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região Amazônica, Brasil. | 89 |
| Quadro 2 | Descrição dos achados histopatológicos dos quatros búfalos de água de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região Amazônica, Brasil. | 94 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCB	Associação Brasileira de Criadores de Búfalos
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-cético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
et al.	E colaboradores
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
LIT	<i>“Liver Infusion Tryptose”</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MG	Estado de Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Estado do Pará
pb	Pares de bases
PBS	Solução Fosfato Tamponada
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Padrão de peso molecular
SP	Estado de São Paulo
SSU rDNA	Subunidade menor do gene ribossômico
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris- borato-EDTA

TE	Tampão TRIS HCl- EDTA
TRIS	Tris (hidroximetil) amino metano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetros
cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
M	Molar
mM	Milimolar
U	Unidades
µg	Micrograma
Kg	Quilograma
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
µL	Microlitro
seg.	Segundos
min.	Minutos
=	Igual
x	Vezes
®	Marca Registrada
≥	Maior ou igual
>	Maior
%	Proporção em porcentagem

Sumário

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
3.1	Bubalinos	26
3.2	<i>Theileria</i> em ruminantes	27
3.2.1	Taxonomia de <i>Theileria</i> não transformadoras em ruminantes	28
3.2.2	Ciclo biológico de <i>Theileria</i>	30
3.2.3	Patogenia	32
3.2.4	Transmissão	36
3.2.5	Sinais clínicos	38
3.2.6	Diagnóstico	41
3.2.6.1	Métodos convencionais	41
3.2.6.1.1	Aspectos clínicos	41
3.2.6.1.2	Exame microscópio	42
3.2.6.1.3	Métodos sorológicos	44
3.2.6.1.4	Métodos moleculares	44
3.2.6.1.4.1	Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)	44
3.2.6.1.4.2	<i>Nested</i> -PCR	46
3.2.6.1.4.3	Amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i> (LAMP)	47
3.2.6.1.4.4	PCR em tempo real/quantitativo (<i>q</i> PCR)	48
3.2.6.1.4.5	PCR em <i>tandem multiplex</i> (MT-PCR)	49
3.2.7	Diversidade e distribuição de <i>T. orientalis</i>	50
3.2.8	Tratamento e profilaxia	52
3.3	Linfoma em bovídeos	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	
4.1	Aspectos éticos	58
4.2	Local de estudo	58
4.3	Amostragem	58
4.4	Coleta de amostras sanguíneas	61
4.5	Análises laboratoriais	61
4.5.1	Pesquisa de hemopatógenos	61
4.5.1.1	Pesquisa de <i>Trypanosoma</i> spp	61
4.5.1.2	Confecções de esfregaços sanguíneos	61
4.5.2	Análise molecular	62
4.5.2.1	Extração de DNA das amostras de sangue	62
4.5.2.2	Controle endógeno da PCR	62
4.5.2.3	Deteção molecular de <i>T. orientalis</i> por PCR e <i>nested</i> - PCR	63
4.5.2.4	Eletroforese de DNA em gel de agarose	64
4.5.2.5	Sequenciamento nucleotídico e análise das sequências de nucleotídeos	64
4.5.2.6	Análises filogenéticas	65
4.5.2.6.1	Diversidade de <i>T. orientalis</i>	66
5	Estudo clínico-anatomopatológico de linfomas	66
5.1	Exame clínico	66

5.2	Coleta de amostras sanguíneas	66
5.3	Coleta de amostra de linfonodos	67
5.4	Necropsia e análise histopatológica	67
5.5	Estudo etiológico dos linfomas	67
5.5.1	Extração de DNA	68
5.5.2	Detecção molecular de <i>T. orientalis</i> por PCR e <i>nested-PCR</i>	69
5.5.3	Detecção molecular de <i>Bovine leukemia virus</i> (BLV), <i>Bovine herpesvirus 6</i> (BoHV-6) e <i>Bovine immunodeficiency virus</i> (BIV)	70
5.5.4	Detecção molecular de hemopatógenos por PCR e <i>nested-PCR</i>	72
6	RESULTADOS	
6.1	Análises laboratoriais	76
6.1.1	Pesquisa de hemoparasitos/hemopatógenos	76
6.2	Análises moleculares	76
6.2.1	Controle endógeno da PCR	76
6.2.2	Detecção molecular de <i>T. orientalis</i> por PCR e <i>nested-PCR</i>	76
6.2.3	Análise das sequências de <i>T. orientalis</i> para o gene <i>MPSP</i>	79
6.2.4	Análises filogenéticas	79
6.2.4.1	Diversidade de <i>T. orientalis</i>	83
7	Estudo clínico-anatomopatológico de linfomas	86
7.1	Estudo etiológico dos linfomas	97
8	DISCUSSÃO	101
9	CONCLUSÃO	112
10	REFERÊNCIAS	113

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os búfalos de água (*Bubalus bubalis*) são encontrados em todos os estados brasileiros, constituindo o maior rebanho de búfalos ocidentais (Bernardes, 2007; Silva et al., 2014a). A população mundial de búfalos cresceu 3,29% nos últimos dez anos (FAO, 2015). Atualmente, segundo os dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) são 1.381.395 bubalinos, predominantemente distribuídos na região norte do país (911.166 cabeças) principalmente no estado do Pará (513.406), com os maiores efetivos bubalinos (IBGE, 2017). Isso se deve às vantagens econômicas que esses animais proporcionam, carne e o leite de excelentes propriedades organolépticas (sabor, odor, cor, textura), além de serem rústicos, precoces, férteis e longevos, o que tornam uma atividade economicamente rentável e saudável (Brasil, 2016). Assim, a bubalinocultura vem ganhando destaque no cenário nacional (Silva et al., 2014a).

Os bubalinos são conhecidos pela sua rusticidade e quando comparados com outros animais domésticos, são geralmente mais resistentes às enfermidades (Silva et al., 2014b; Romero-Salas et al., 2016). Embora a razão ainda não tenha sido esclarecida, o efeito de alguns patógenos sobre os búfalos é muitas vezes menos deletério do que nos bovinos (Silva et al., 2014b). No entanto, em alguns países tropicais e subtropicais as doenças parasitárias dos búfalos têm desempenhado um papel importante, visto que esses animais têm sido considerados reservatórios para outros animais (Terkawi et al., 2011; Silva et al., 2013a; Romero-Salas et al., 2016).

Em diversos países, incluindo o Brasil é comum os bovinos e bubalinos compartilharem as mesmas instalações e pastos. Com base nessa observação, tem sido levantada a hipótese de que os búfalos constituem um importante reservatório de infecções parasitárias, potencialmente aumentando os casos de hemoparasitoses nos bovinos e impedindo as medidas de erradicação dos patógenos e dos carrapatos vetores (Gomes et al., 2008; Oura et al., 2011; Silva et al., 2013a; Silva et al., 2013b; Silva et al., 2014a; Silva et al., 2014b; Silva et al., 2014c; Sivakumar et al., 2014a; Sivakumar et al., 2014b; Noé et al., 2016; Romero-Salas et al., 2016; Silveira et al., 2016).

Sabe-se que as doenças causadas por patógenos transmitidos por carrapatos causam impactos adversos na saúde dos animais e impõem consideráveis limitações ao aumento da produtividade dos animais (Galon et al., 2019). A piroplasmose é uma doença causada por protozoários transmitidos por carrapatos, pertencentes a dois gêneros intimamente relacionados, *Theileria* e *Babesia*, afetando vários ruminantes domésticos e selvagens

(Uilenberg, 1995; Makala et al., 2003; Sivakumar et al., 2014a). Os membros do gênero *Theileria* são caracterizados pela biologia complexa, entre várias espécies (Mans et al., 2015); espécies de importância em bovinos são os grupos *T. annulata*, *T. parva* e *T. orientalis* (Sivakumar et al., 2014a). Em geral, os búfalos de água infectados com hemoprotozoários raramente apresentam sinais clínicos. Assim, seu potencial como animais portadores e reservatórios de patógenos é frequentemente negligenciado.

Variações na sequência do gene *MPSP* (*Major piroplasm surface protein*) têm sido utilizadas para determinar a diversidade genética de *T. orientalis* (Kakuda et al., 1998; Gebrekidan et al., 2017a), com base na análise de sequência do gene *MPSP*, 11 genótipos foram relatados: *Chitose* (Tipo 1), *Ikeda* (Tipo 2), *Buffeli* (Tipo 3–8) e *N* (1–3) (Sivakumar et al., 2014a). Vários estudos relataram a presença de genótipos de *T. orientalis* em búfalos de água (Oura et al., 2010; Altangerel et al., 2011; Aparna et al., 2011; Khukhuu et al., 2011; He et al., 2012; Ghaemi et al., 2012; Sivakumar et al., 2013; Sivakumar et al., 2014a; Vinodkumar et al., 2015). Na América, a primeira descrição molecular da *T. orientalis* ocorreu em búfalos no estado do Pará, região Amazônica do Brasil, sugerindo que a infecção por *Theileria* talvez estivesse associada à doença linfoproliferativa (Silveira et al., 2016) caracterizada pelo desenvolvimento de linfoma e linfocitose nos animais, cuja etiologia é desconhecida (Oliveira et al., 2016b). Posteriormente, no estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil, foi relatada a presença de *T. orientalis* na mesma espécie animal (Abate et al., 2018). Até o momento, não são estudadas informações sobre a diversidade genética das espécies de *Theileria* detectadas no país e o possível envolvimento dessas espécies na etiopatogenia de casos de linfomas em búfalos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência e a diversidade genética de *Theileria orientalis* e avaliar a possível associação com os casos de linfomas em búfalos de água provenientes do estado do Pará.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença de DNA de *Theileria orientalis* dirigidas aos genes *18S rRNA*, da região completa *ITS* e do gene *MPSP* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Detectar a presença de linfoma nos animais;
- Pesquisa de hemopatógenos em lâminas de esfregaços sanguíneos, da técnica de Brener, técnica de Woo e pela análise de *buffy coat*;
- Realizar um estudo clínico-anatomopatológico e etiológico de seis casos de linfomas de um rebanho na região Amazônica e verificar associação com a infecção por *T. orientalis*;
- Traçar inferências filogenéticas das sequências de *T. orientalis* obtidas com base no gene *MPSP* por meio da construção de filogramas;
- Investigar a diversidade de genótipos de *T. orientalis* detectados nos animais sob estudo;
- Realizar análises de distância a fim de visualizar eventos mutacionais que ocorreram entre as sequências nucleotídicas de *T. orientalis* ao longo da evolução.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bubalinos

Os búfalos domésticos são animais de origem asiática (domesticados há 7.000 anos), da família Bovidae, gênero *Bubalus*, espécie *Bubalus bubalis* (Linneau 1758), também conhecido como búfalo de água (do inglês “*water buffaloes*”). São divididos em dois grupos, *Bubalus bubalis* var. *bubalis*, conhecidos como búfalos de rio, búfalo aquático (do inglês “*river buffaloes*”) e *B. bubalis* var. *kerebau*, o búfalo de pântano (do inglês “*swamp buffaloes*”). São animais extremamente rústicos e apresentam alta capacidade de adaptação, podendo sobreviver em diversos ambientes, com grandes variedades de clima, relevo e vegetação. Por isso são encontrados praticamente em todos os continentes, particularmente na Ásia (Índia, Paquistão, Tailândia, China e Vietnã), África (Egito), Europa (Itália) e América do Sul (Brasil, Argentina, Venezuela, Peru e Colômbia) (FAO, 2015; Lourenço Júnior; Garcia, 2008; Bernardes, 2011).

No Brasil a bubalinocultura é uma atividade recente, mas este já é o maior detentor do rebanho da América do Sul, seguido por Venezuela, Argentina e Colômbia (Andrighetto et al., 2005). Os primeiros animais a serem introduzidos no Brasil foram da raça Carabao, estes foram instalados inicialmente na região Norte, na Ilha de Marajó (estado do Pará) em 1890, oriundos da Europa, do Caribe e da Ásia, dando origem ao búfalo negro de Marajó. Em 1920, criadores do estado de Minas Gerais importaram vários animais da Índia e da Itália e dessas importações descenderam grande parte do efetivo bubalino da região Centro-Sul do país, principalmente Minas Gerais e São Paulo. Em 1945, animais da raça Mediterrânea foram importados da Itália e posteriormente, em 1961, mais criadores importaram búfalos das raças Murrah e Jafarabadi. O cruzamento dessas últimas raças com a raça Mediterrânea começou a ser expandido no país (Bernardes, 1997; Lourenço Júnior; Garcia, 2008).

Definiram-se assim, de acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) três raças de búfalos de rio com padrão definido e registro genealógico: Murrah, Mediterrânea e Jafarabadi, além de uma raça de búfalo de pântano, a Carabão (Kierstein et al., 2004; Bernardes, 2007). Dessas raças, as três primeiramente citadas são chamadas de búfalos pretos. A última também é chamada de búfalo rosilho (Kierstein et al., 2004; Bernardes, 2007).

Em 1989 criadores de búfalos da Bahia, Rio Grande do Sul e de São Paulo fizeram a importação de oito búfalos puros de *pedigree* da raça Mediterrânea da Itália, a partir daí houve difusão dessa raça pelo país. Devido a problemas sanitários a última importação de sêmens da Índia e da Itália das raças Mediterrânea e Murrah ocorreram no final do século XX. No Brasil,

a raça Murrah é a que tem crescido nos últimos 30 anos e atualmente supera a população de. Mediterrânea, sobretudo no que se refere a animais puros (ABCB, 2019).

O Brasil é uma demonstração da adaptabilidade do búfalo a condições de manejo e ambientes distintos (Zava, 1984). Os búfalos de água são encontrados em todos os estados brasileiros, constituindo o maior rebanho de búfalos ocidentais (Bernardes, 2007; Silva et al., 2014a). Atualmente, segundo os dados da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) são 1.381.395 bubalinos, predominantemente distribuídos na região Norte do país (911.166 cabeças), maior produtora, com destaque para o Estado do Pará (513.406 cabeças) que responde por 37% do rebanho nacional, que estão distribuídas, basicamente, na ilha de Marajó e no Baixo e Médio Amazonas. Em seguida aparecem o Sudeste e o Nordeste, com 184 e 130 mil cabeças, respectivamente. Na região Sudeste ganham destaque os estados de São Paulo (105.114) e Minas Gerais (66.613), com os maiores efetivos bubalinos (IBGE, 2017). Assim, a bubalinocultura vem ganhando importância no cenário nacional (Silva et al., 2014a), tornando-se uma atividade economicamente rentável e saudável (Brasil, 2016). Esses animais também podem ser utilizados em atividades de tração, transporte e produção de esterco (Oliveira, 2005; IBGE, 2017).

Associado ao elevado crescimento no efetivo bubalino no país, relacionada à produção e fornecimento de produtos pecuários visando atender as necessidades nutricionais dos seres humanos, está à preocupação com o manejo sanitário desses animais, uma vez que, embora apresentem semelhanças genéticas com os bovinos, os bubalinos apresentam algumas divergências, incluindo genes relacionados com a imunidade e doenças (Moaeen-Ud-Din; Bilal, 2015), há uma escassez nos dados sobre os aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos dessa espécie no Brasil (Silva et al., 2014a).

3.2 *Theileria* em ruminantes

Os parasitos deste gênero são categorizados de acordo com a sua ação na célula hospedeira, em dois grupos: espécies transformadoras e não transformadoras. As espécies de *Theileria* consideradas transformadoras induzem os leucócitos parasitados de tal modo que as células infectadas podem proliferar-se indefinidamente em conjunto com os parasitos que ocupam seu citoplasma (Sivakumar et al., 2014a). Tradicionalmente nos ruminantes são descritas como espécies de *Theileria* transformadoras: *T. parva*, *T. annulata*, *T. lestoquardi* e *T. taurotragi* (Dobbelaere; Küenzi, 2004; Sugimoto; Fujisaki, 2002), estas são altamente patogênicas e causam morte (Sivakumar et al., 2014a).

As espécies de *Theileria* infectam uma grande variedade de ruminantes domésticos e selvagens. Sabe-se que *T. parva* e *T. annulata* infectam bovinos (*Bos taurus* / *Bos indicus*) e búfalos (*Syncerus caffer* / *Bubalus bubalis*) (Bishop et al., 2004), enquanto *T. orientalis* também infecta iaques (*Bos grunniens*) bovinos e búfalos (*B. bubalis*) (Fujisaki et al., 1994; Yin et al., 2004). Além disso, várias espécies de *Theileria* (*T. lestoquardi*, *T. separata*, *T. uilenbergi*, *T. luwenshuni*, *T. capreoli* e *T. ovis*) foram relatadas infectando pequenos ruminantes (Ahmed et al., 2006). Ruminantes selvagens, como veados, antílopes e girafas, são infectados com várias espécies de *Theileria* ainda não classificadas, algumas das quais são altamente patogênicas e que frequentemente levam à morte desses animais (Höfle et al., 2004; Nijhof et al., 2005 ; Oosthuizen et al., 2009).

Existem várias espécies de *Theileria* não transformadoras, incluindo *T. orientalis*, *T. mutans*, *T. velifera* e *T. cervi*, consideradas causadoras de doenças assintomáticas em ruminantes (Sivakumar et al., 2014a). Embora os parasitos desta última categoria sejam considerados relativamente benignos, surtos de doenças e perdas econômicas relacionadas a animais infectados já foram descritos (Zweygarth et al., 2009; Aparna et al., 2011; Chaisi et al., 2011; McFadden et al., 2011; Eamens et al., 2013a).

3.2.1 Taxonomia de *Theileria* não transformadoras em ruminantes

Historicamente, a taxonomia de *T. orientalis* (anteriormente denominada grupo *Theileria orientalis* / *sergenti* / *buffeli*) é bastante controversa, devido à semelhança na morfologia das cepas, grande variabilidade de hospedeiros e vetores, ocorrência de infecções mistas, diversidade genética de parasitos e dificuldade em extrair isolados puros para estudos, especialmente em infecções benignas onde a parasitemia é baixa (Chae et al., 1999). Originalmente, esses parasitos foram classificados com base na origem geográfica (Uilenberg et al., 1985; Fujisaki et al., 1994). Tentativas adicionais de classificação levaram a sugestões de que o grupo deveria ser reclassificado em uma espécie (Uilenberg et al., 1985; Fujisaki et al., 1994; Kakuda et al., 1998; Gubbels et al., 2000; Sivakumar et al., 2014a). Variações no gene da principal proteína de superfície do piroplasma (MPSP) foram usadas para classificar membros do grupo *T. orientalis*, separando-o em 11 genótipos (Sivakumar et al., 2014a).

Em 1910 foram identificados os primeiros parasitos do grupo *T. orientalis* em bovinos Australianos sendo então classificado como *T. mutans* (Dodd, 1910) devido à semelhança morfológica com as espécies africanas descritas anteriormente (Theiler, 1906). Alguns anos depois, Wenyon (1926) fez a primeira descrição em ovelha de um parasito sanguíneo semelhante e o nomeou *Babesia sergenti*. No entanto, ao analisarem os desenhos morfológicos

de *B. sergenti* verificaram que correspondiam a protozoários do gênero *Theileria* (Fujisaki et al., 1994). Nos anos seguintes, na Sibéria Oriental, um novo parasito de bovino foi descrito como *T. sergenti* (Yakimoff; Dekhtereff, 1930). O parasito de ovelha, portanto, tem precedência em relação ao nome *T. sergenti*, tornando esse nome inválido para o parasito de bovino. Todavia, o nome *T. sergenti* havia sido amplamente utilizado na literatura para esse protozoário que acometia bovinos (Sivakumar et al., 2014a; Yam et al., 2018). Após a descrição inicial de “*T. sergenti*” em bovinos da Sibéria, um hemoparasito semelhante foi encontrado na mesma área e os autores o denominaram *T. orientalis* (Yakimoff; Soudatschenkoff, 1931).

Posteriormente, estudos morfológicos e sorológicos (Uilenberg et al., 1977) revelaram que o isolado de *T. mutans* identificado na Austrália (Dodd, 1910) era da mesma espécie que “*T. sergenti*” (Yakimoff; Dekhtereff, 1930) e não a *T. mutans* africana descrita por Fujisaki et al. (1994). Os autores Morel e Uilenberg (1981) sugeriram que o isolado australiano era *T. orientalis* (Yakimoff; Dekhtereff, 1930) ou *T. buffeli* (Neveu-Lemaire, 1912). Após estudos sorológicos e morfológicos conduzidos em banco de amostras da Austrália, Grã-Bretanha, Irã, Japão, EUA e um estoque da Coreia de patogenicidade mais alta, os autores concluíram que a nomenclatura da *Theileria* Australiana deveria ser *T. orientalis* (Uilenberg et al., 1985). Porém, outros autores ainda propuseram que o nome *T. buffeli* fosse designado devido à transmissão do parasito ocorrer do búfalo ao bovino e ao fato de que os isolados caracterizados naquele momento eram todos infectantes para o búfalo (Callow, 1984; Stewart et al., 1996; Gubbels et al., 2000). Estudos no Japão sugeriram que *T. orientalis* e *T. buffeli* fossem separados de *T. sergenti* e classificados como um grupo diferente devido às diferenças sorológicas e de transmissibilidade (Fujisaki, 1992; Kawazu et al., 1992; Fujisaki et al., 1994). Logo, concluiu-se que a designação do nome *T. sergenti*, com exceção de ovelhas, não deve ser usada para nenhum hemoparasito de ruminantes (Morel; Uilenberg, 1981; Stewart et al., 1996; Uilenberg, 2011).

Apesar do consenso obtido em relação à *T. sergenti*, como supracitado, as técnicas morfológicas e sorológicas não foram suficientes para distinguir isolados do grupo *Theileria orientalis/sergenti/buffeli*. Nesse contexto, as técnicas moleculares e análises filogenéticas começaram a ser utilizadas como ferramenta mais prevalentes na identificação e diferenciação de espécies de *Theileria* desse grupo. Todavia, as análises subsequentes da taxonomia deste grupo utilizaram sequências dos genes *18S rRNA* e *MPSP* como ferramenta mais prevalentes na identificação e diferenciação de espécies de *Theileria* desse grupo (Yam et al., 2018). Inicialmente às análises moleculares para classificação de *Theileria* baseava-se na genotipagem

da região variável V4 com o gene *18S rRNA* (Allsopp et al., 1993), revelando sete genótipos (genótipos A a G) (Chae et al., 1998).

O gene *MPSP* tornou-se importante nas análises filogenéticas devido à maior variação observada produzindo assim maior suporte de ramificação (Ota et al., 2009; Jeong et al., 2010). A análise inicial do gene *MPSP* revelou quatro genótipos principais, sendo eles denominados *ikeda*, *chitose*, *buffeli* e tipo *thai* (Kubota et al., 1996; Sarataphan et al., 1999). O genótipo tipo *buffeli* também foi separado nos subgenótipos *B1* e *B2* devido à variabilidade observada entre esses isolados (Kubota et al., 1996).

Em 2010, oito genótipos de *MPSP* (1 a 8) foram classificados (Kim et al., 1998; Ota et al., 2009; Jeong et al., 2010). O genótipo tipo 6 da *MPSP* encontrado em bovinos e iaques foi reclassificado e o nome taxonômico *Theileria sinensis* foi sugerido para refletir divergência com os outros membros do grupo *Theileria orientalis* / *sergenti* / *buffeli* (Bai et al., 2002; Liu et al., 2010). Khukhuu et al. (2011) identificaram três novos genótipos de ovinos, búfalos e bovinos no Vietnã (*N1*, *N2* e *N3*, respectivamente), elevando o número atual de genótipos *MPSP* para 11 (Tipos 1–8 e *N1–N3*). Quando realizada a análise retrospectiva dos genótipos previamente identificados com o gene *18S rRNA* (Chae et al., 1998) comparando com o atual esquema de genotipagem *MPSP* evidencia-se que o genótipo A corresponde a *chitose*, enquanto os genótipos B e E correspondem a *ikeda*. Os genótipos C e D de *18S rRNA* correspondem aos genótipos *buffeli* e Tipo 6 *MPSP*, respectivamente. Análises posteriores revelaram os genótipos *18S rRNA* F e G idênticos a *T. cervi* de uma espécie encontrada em alces (Yam et al., 2018). Os subgenótipos de *buffeli* B1 e B2 identificados por Kubota et al. (1996) correspondem ao genótipo de *buffeli* e ao tipo 4 *MPSP*, respectivamente (Sivakumar et al., 2014a; Yam et al., 2018).

3.2.2 Ciclo biológico de *Theileria*

Os ciclos de vida dos protozoários do gênero *Theileria* são indiretos e envolvem carrapatos como vetores. O hospedeiro definitivo são carrapatos do gênero *Rhipicephalus* para *T. parva*; *Hyalomma* para *T. annulata* e *Haemaphysalis* para *T. orientalis*, que ingerem piroplasmas do sangue de um hospedeiro com parasitemia.

No hospedeiro vertebrado ou intermediário ocorrem algumas variações sendo que algumas espécies induzem a transformação e proliferação celular do leucócito parasitado, como *T. annulata* e *T. parva*, enquanto outras espécies como *T. orientalis* não induzem essa transformação. Geralmente, os parasitos apresentam três estágios de multiplicação distintos: (1) esquizogonia (reprodução assexuada), que ocorre em hospedeiros vertebrados; (2) gametogonia

(reprodução sexuada) no qual ocorre o desenvolvimento e união de gametas dentro das células intestinais de carrapatos vetores; e (3) esporogonia (reprodução assexuada), que ocorre nas glândulas salivares de carrapatos vetores (Mehlhorn; Schein 1985; Nene et al., 2016).

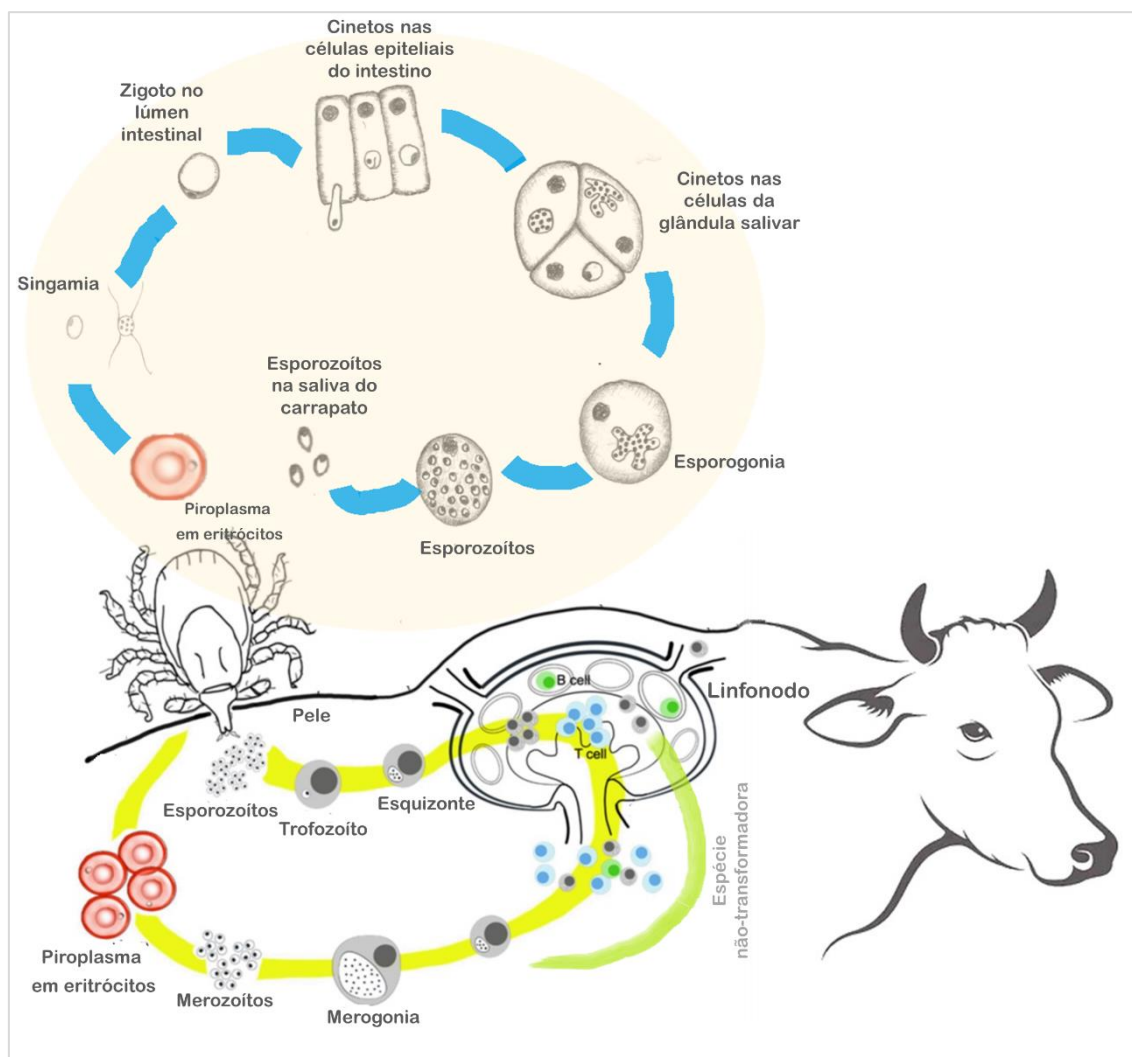
O ciclo nos bovídeos (Figura 1) se inicia quando o carrapato infectado inocula esporozoítos do parasito durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado competente. Esses esporozoítos invadem as células linfoides e dependendo da espécie de *Theileria*, as células hospedeiras suscetíveis podem ser células T (CD4+ e CD8+) (Emery et al., 1988), células B (B1 e B2), monócitos e macrófagos (Moreau et al., 1999). O processo de invasão dos esporozoítos ocorre rapidamente e, uma vez internalizados, os núcleos deles se dividem para formar um esquizonte multinucleado conhecido como macroesquizonte com até 30 núcleos em aproximadamente 20h após a inoculação. A membrana do vacúolo parasitóforo se desintegra minutos após internalização dos esporozoítos, de modo que o esquizonte torna-se circundado apenas pela membrana plasmática do parasito (Shaw, 2003) e o sincício multinucleado está localizado no centro organizador dos microtúbulos, próximo ao núcleo da célula hospedeira. Nas espécies transformadoras, os leucócitos bovinos infectados migram para o linfonodo de drenagem, onde proliferam-se clonalmente e se disseminam em vários tecidos do hospedeiro. Cada leucócito filho abriga parasitos, pois o esquizonte está fortemente ligado aos fusos mitóticos e é dividido na próxima progênie de leucócitos (Von Schubert et al., 2010). Acredita-se que este seja o estágio mais patogênico do ciclo de vida pois induz a transformação celular. Após algum sinal, como o aumento de temperatura para *T. annulata* e um sinal desconhecido para *T. parva*, o esquizonte sofrerá citocinese e se desenvolverá no estágio de merozoíto uninucleado (merogonia/esquizogonia) no interior de eritrócitos (Tarjeri et al., 2021).

Após alguns ciclos de merogonia/esquizogonia, o parasito induz a apoptose das células e os merozoítos são liberados na corrente sanguínea se diferenciando em piroplasmas multinucleados que são infectantes para carrapatos. Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro com parasitemia, os eritrócitos infectados com os piroplasmas são ingeridos e após a ingestão, sobrevivem à presença de enzimas digestivas intestinais e microbiota, se desenvolvem em micro e macrogametas no lúmen intestinal do carrapato, onde ocorre a singamia e, portanto, a recombinação genética, formando um zigoto esférico, o único estágio diplóide. Os zigotos de *Theileria* devem então evadir as células fagocíticas do carrapato e invadir as células epiteliais da lâmina basal, onde se diferenciam no estágio de cineto complexo e móvel (oocineto).

Durante a muda do carrapato, o oocineto migra pela hemolinfa e subsequentemente, e ao atingirem as glândulas salivares do carrapato entram seletivamente nas células acinares. A proliferação resulta em um sincício de esporoblastos. Após a muda e início da alimentação pelo

carrapato, a esporogonia resulta na segmentação dos esporoblastos, formando o estágio de esporozoítos que são infectante ao hospedeiro vertebrado competente e se multiplicam nos ácinos da glândula salivar antes da inoculação no local de alimentação por ninfas ou carrapatos adultos continuando assim o ciclo de vida (Norval et al., 1992; Shaw, 2003; McKeever, 2009; Tretina et al., 2015; Jalovecka et al., 2018; Tajeri et al., 2021; Tajeri; Langsley, 2021).

Figura 1 – Ciclo esquemático de parasitos do gênero *Theileria*.



Fonte: Adaptado Mans et al. (2015) e Tajeri et al. (2021).

3.2.3 Patogenia

Como já mencionado anteriormente no tópico sobre a taxonomia de *T. orientalis*, *Theileria* pode ser agrupada em espécies esquizontes “transformadoras” e “não-transformadoras” (Sivakumar et al., 2014a). A transformação de todos os parasitos e a proliferação descontrolada de esquizontes resulta nas patologias associadas à doença febre da Costa Leste (ocasionada por *T. parva*), teileriose tropical (por *T. annulata*) em bovinos e

teileriose maligna (por *T. lestoquardi*) em caprinos e ovinos (Bishop et al., 2004; McKeever, 2009; Sivakumar et al., 2014a).

Os leucócitos transformados secretam níveis abundantes de citocinas e são drenados para o linfonodo mais próximo, onde induzem a ativação e proliferação de células não infectadas levando a um aumento dos linfonodos superficiais. De fato, o leucócito infectado pelo esquizonte e as alterações inflamatórias induzidas nos tecidos formam a base patológica da teileriose tropical, febre da Costa Leste e da teileriose maligna. Durante cada divisão da célula hospedeira, o esquizonte intracelular está fortemente associado ao centro organizador de microtubos e por isso é particionado em ambos os leucócitos-filhos. Os leucócitos infectados e não infectados que expressam citocinas saem do linfonodo e os leucócitos transformados disseminam-se para órgãos distantes. Em algum momento durante a infecção, uma subpopulação de esquizontes se desenvolve em merozoítos que invadem os glóbulos vermelhos e a anemia contribui para a patologia da teileriose tropical (Tarjeri et al., 2021).

No entanto, *T. taurotragi*, *Theileria* sp. (búfalo) e *Theileria* sp. (bougasvlei) não causam patologia associada ao esquizonte (Young et al., 1977; Bishop et al., 2004; Pienaar et al., 2014). *Theileria* sp. (zibelina) causa hiperplasia linfoide tipicamente associada à transformação de *Theileria* (Nijhof et al., 2005). Isso e a capacidade de cultivar esquizontes (Zweygarth et al., 2009) indicam que nem todos os parasitos transformantes compartilham uma origem monofilética (Sivakumar et al., 2014a), o que sugere que a transformação de esquizontes pode ocorrer mais amplamente do que o esperado (Sivakumar et al., 2014b).

Theileria não transformadoras são consideradas benignas, mas ainda capazes de causar doenças como resultado da anemia induzida pelo estágio intraeritrocítico (Sivakumar et al., 2014a). *Theileria orientalis* é uma espécie reconhecida como um parasito benigno de bovinos (Watts et al., 2016) e embora sua patogênese ainda não seja completamente compreendida (Watts et al., 2016), uma rápida taxa de divisão de macroesquizontes e microesquizontes foi observada em bezerros infectados (Uilenberg et al., 1985). Sato et al. (1993) encontraram células aumentadas contendo estruturas sugestivas de esquizontes identificadas nos linfonodos, baço e fígado de bovinos infectados por *T. orientalis*, o que destaca o potencial de membros de *T. orientalis* serem categorizados como patógenos transformadores de células (Sugimoto; Fujisaki, 2002; Gebrekidan et al., 2020), mas esta hipótese requer mais estudos.

Os búfalos são considerados hospedeiros primordiais para a transformação das espécies de *Theileria* (Bishop et al., 2004). Acredita-se que a evolução da transformação de *Theileria* pode ter sido fortemente influenciada pela resposta imune em búfalos (McKeever, 2009). A virulência de uma espécie de *Theileria* geralmente depende da espécie hospedeira que infecta.

A baixa virulência confere ao parasito maior engajamento imunológico com seu hospedeiro sendo responsável pela alta diversidade genética de *T. orientalis* em búfalos. Já em bovinos esses parasitos causam doença clínica com quadros agudos podendo levar à morte, assim, com uma menor chance de seleção imunomediada agindo sobre essa espécie animal (McKeever, 2009; Eamens et al., 2013a).

Na última década, numerosos surtos de teileriose oriental ocasionados por *T. orientalis* foram registrados em bovinos de corte e leiteiros na região Ásia-Pacífico, principalmente na Austrália e Nova Zelândia (Izzo et al., 2010; Aparna et al., 2011; Islam et al., 2011; Kamau et al., 2011a; Kamau et al., 2011b; McFadden et al., 2011; Perera et al., 2013, Perera et al., 2014; Perera et al., 2015a) e recentemente nos EUA (Oakes et al., 2019).

Com base na caracterização de genótipos de *T. orientalis* de bovinos afetados clinicamente pela teileriose oriental, apenas dois dos 11 genótipos atualmente conhecidos, *chitose* (tipo 1) e *ikeda* (tipo 2) são considerados como patogênicos (Eamens et al., 2013a; Sivakumar et al., 2014a; Kakati et al., 2015; Lawrence et al., 2018; Gebrekidan et al., 2020). Esses dois genótipos foram encontrados associados a centenas de surtos recentes de teileriose oriental na Australásia e nos EUA (Izzo et al., 2010; Islam et al., 2011; McFadden et al., 2011; Perera et al., 2014; Perera et al., 2015a; Gebrekidan et al., 2017a; Oakes et al., 2019) sendo associados a graves alterações hematológicas, perdas de produção, alta morbidade e mortalidade nos bovinos afetados (Izzo et al., 2010; Gebrekidan et al., 2017a; Lawrence et al., 2018; Gebrekidan et al., 2020). A infecção persistente por *T. orientalis* com diferentes genótipos é comum (Eamens et al., 2013c) e o mecanismo imunológico responsável pela resistência à doença ainda não está completamente elucidado. A virulência em *T. orientalis* foi relacionada ao genótipo (Eamens et al., 2013c; Sivakumar et al., 2014a; Kakati et al., 2015; Lawrence et al., 2018; Gebrekidan et al., 2020). No entanto, um dos meios pelos quais esse parasito escapa do sistema imunológico do hospedeiro é através de infecções mistas, ou seja, com mais de um genótipo (Jenkins; Bogema, 2016). Um animal com coinfecção dupla ou tripla de genótipos raramente apresenta quaisquer sinais clínicos da doença, dificultando o diagnóstico de formas subclínicas e leves de teileriose oriental (Gebrekidan et al., 2020).

A anemia é o achado clínico-patológico primário na teileriose oriental e geralmente ocorre devido à hemólise intravascular causada pelos estágios intraeritrocítico (Agina et al., 2020). *Theileria orientalis* também é conhecida por induzir anemia hemolítica imunomediada (Nazifi et al., 2008) sendo que o mecanismo fisiopatológico da anemia na teileriose oriental é complexo (Stockham et al., 2000).

O tempo de vida dos eritrócitos na teileriose oriental causada pelo genótipo *sergenti* é geralmente reduzido, pois o sistema imunológico produz anticorpos direcionados contra os parasitos, bem como contra seus próprios eritrócitos (Kunugiyama et al., 1991; Shiono et al., 2001). A produção de autoanticorpos contra os eritrócitos ocorre devido à alteração da membrana dos eritrócitos, uma vez que as moléculas de fosfatidilserina, normalmente localizadas nos folhetos internos das membranas celulares, translocam-se para a superfície externa dos eritrócitos em bovinos infectados com *Theileria*. A exposição da fosfatidilserina na superfície celular pode induzir uma resposta de anticorpos e funcionar como um marcador da depuração fagocítica de eritrócitos por macrófagos (Shiono et al., 2001; Jalali et al., 2018). Hagiwara et al. (1995) evidenciaram em um modelo experimental com camundongos imunodeficientes que a hemólise dos eritrócitos infectados por *T. orientalis* (genótipo *sergenti*) ocorre sem o envolvimento de anticorpos ou complemento. Shiono et al. (2001) demonstraram que elevações na concentração de metahemoglobina contribuem para a progressão da anemia, pois um aumento dessa substância pode alterar o equilíbrio oxidante-antioxidante causando danos oxidativo das membranas eritrocitárias e consequente remoção da circulação pelos fagócitos (Sugimoto; Fujisaki, 2002).

Geralmente há um baixo nível de parasitemia em animais previamente expostos (Shimizu et al., 1992). Em bovinos infectados, mas não afetados clinicamente, a invasão de eritrócitos pode ser muito baixa, na ordem de 0,02-0,03% (Kamio et al., 1990; Shimizu et al., 1992; Stockham et al., 2000). A infecção eritrocitária geralmente está associada a anemia grave (0,5 a 30% parasitemia) e sinais clínicos relacionados (Izzo et al., 2010; McFadden et al., 2011), onde os valores de hematócrito podem variar de normais até 8% em casos graves (Irwin, 2013).

Na literatura, a única descrição de *T. orientalis* causando doença em búfalos de água ocorreu na Índia. Vinodkumar et al. (2015) descrevem um surto de teileriose oriental fatal em 15 búfalos leiteiros submetidos ao transporte, os quais desenvolveram sinais clínicos dentro de dois meses da sua obtenção. Foram observados piroplasmas típicos de *T. orientalis* nos eritrócitos de todos os animais infectados (parasitemia variou de < 1% a > 10%). A anemia hemolítica aguda foi o achado hematológico predominante nos animais afetados. Comprometimento funcional de órgãos vitais após a leucocitose difusa (infiltração) contribuiu para o agravamento dos sinais clínicos nestes animais. Tais mudanças foram relatadas anteriormente apenas para teileriose tropical. A taxa de letalidade foi de 87,5%. (7/15). O manejo terapêutico com drogas anti-teileriais buparvaquona e oxitetraciclina levou à recuperação de sete animais em estágios menos avançados da doença. Após análises

moleculares, esses autores identificaram o genótipo *N2*, considerado não patogênico, presente nessas infecções.

Os resultados das infecções por *T. orientalis* são altamente dependentes de fatores ambientais, de estresse, do nível de imunidade adquirida no bovino afetado e da genética do rebanho (Hayashida et al., 2018). Além disso, fatores fisiológicos como prenhez, lactação e mudanças bruscas de temperatura e umidade e/ou outros desafios associados ao manejo da fazenda, fatores nutricionais (Watts et al., 2016) podem levar a um aparecimento de sinais clínicos em bovinos cronicamente infectados (Sugimoto; Fujisaki, 2002). As principais perdas econômicas devido à teileriose oriental em bovinos estão relacionadas a abortos, a redução significativa na produção de leite (quantidade e qualidade) e a taxas severas de morbidade e mortalidade em rebanhos afetados (Perera et al., 2014; Lane et al., 2015).

3.2.4 Transmissão

A distribuição de parasitos com ciclos de vida indiretos é restrita pela disponibilidade do hospedeiro intermediário e definitivo. Dessa maneira, a distribuição de *T. orientalis* é limitada pela presença de bovídeos susceptíveis e de carrapatos com potencial vetorial. O espectro completo de hospedeiros vertebrados e vetores biológicos para *T. orientalis* ainda não está totalmente esclarecido. Até o momento, sabe-se que o carrapato trioxeno *Haemaphysalis longicornis* foi confirmado em ensaios de transmissão como um vetor biológico de *T. orientalis* em estudos iniciais (Uilenberg et al., 1985), na Austrália (Marendy et al., 2020) e mais recentemente nos EUA (Dinkel et al., 2021). Esta espécie de carrapato possui uma ampla distribuição em países com climas temperados (Raghavan et al., 2019), incluindo Austrália, Nova Zelândia, Fiji, Nova Caledônia, China, ex-URSS, Coreia, Japão (Hoogstraal et al., 1968; Roberts et al., 1970), EUA e várias outras ilhas do Pacífico, incluindo Havaí (Chomel, 2011).

A competência vetorial de espécies de carrapatos trioxenos varia entre as regiões e a variação pode estar relacionada às adaptações parasito-hospedeiro e ao tipo de genótipo. Quando se refere à *T. orientalis*, Uilenberg et al. (1985) relataram que a maioria das cepas globais desse parasito poderiam ser transmitidas transestadialmente por *H. longicornis* e *H. punctata*, mas não por algumas espécies de *Amblyomma* ou por *Dermacentor reticularis*. Todavia, foi verificado que um isolado americano de *T. orientalis* (genótipo *buffeli*) não foi transmitido por carrapatos *H. longicornis* ou por *H. punctata* da Coreia (Kuttler; Craig, 1975; Uilenberg et al., 1985). Em investigações japonesas, *H. longicornis* australiano poderia transmitir apenas *T. sergenti* (*T. orientalis* genótipos *ikeda/chitose*) e não poderia transmitir *T.*

orientalis (buffeli), enquanto *H. longicornis* oriundos poderia transmitir ambos (Fujisaki et al., 1994).

Os primeiros estudos de vetores na Austrália indicaram que *H. bancrofti* e *H. humerosa* eram prováveis vetores de *T. orientalis (buffeli)* no norte da Austrália (Stewart et al., 1987a; Stewart et al., 1987b). Enquanto ninfas e adultos de *H. longicornis* transmitiram prontamente *T. orientalis (ikeda)* (Marendy et al., 2020; Emery et al., 2021a) estes falharam em duas ocasiões em transmitir *T. orientalis (buffeli)* a bezerros em Sydney (Emery, 2020; Emery et al., 2021a). Quando se correlaciona a distribuição de *H. longicornis* com a presença de infecções por *T. orientalis* na Austrália, pode-se observar que esta espécie ocorre nas áreas costeiras de Victoria e Nova Gales do Sul e se estende para o norte até Gympie em Queensland, mas está ausente em grandes áreas do norte da Austrália, onde *T. orientalis- buffeli* está presente (Stewart et al., 1987a), reafirmando a hipótese de que a competência vetorial está atrelada a adaptações parasito-hospedeiro.

Kakati et al. (2015) propuseram como vetor alternativo de *T. orientalis* em Assam, na Índia o carrapato monoxeno *Rhipicephalus microplus*. Entretanto, estes autores avaliaram apenas a presença de DNA deste parasito por PCR nos ovos de carrapatos alimentados em animais infectados e não foram testadas as larvas eclodidas. Desta forma não há dados sobre a transmissão bem-sucedida por essa espécie de carrapato.

Theileria orientalis também pode ser transmitida mecanicamente pela inoculação de sangue infectado (Uilenberg et al., 1985; Hammer et al., 2016) ou através de outros artrópodes hematófagos, como o piolho sugador (*Linognathus vituli*) (Fujisaki et al., 1993; Heath, 2013) e potencialmente por tabanídeos (*Tabanus trigeninus*) e por mosca-de-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) (Fujisaki et al., 1993; Heath, 2013; Hammer et al., 2016). Além disso, um estudo de xeno-vigilância no Reino Unido revelou DNA de *T. orientalis* em 16 dos 105 (15,2%) mosquitos avaliados (Fernandez et al., 2016).

A transmissão transplacentária também ocorre na infecção por *T. orientalis* (Onoe et al., 1994; Baek et al., 2003; Swilks et al., 2017a). Os primeiros estudos evidenciaram que a transmissão transplacentária ocorre em bezerros com uma taxa de 5% e observaram também abortos com aproximadamente seis a sete meses de gestação (Baek et al., 2003). Lawrence et al. (2016a) realizaram um estudo na Nova Zelândia onde não verificaram transmissão transplacentária. Recentemente, um estudo Australiano avaliando 98 bezerros, baseado em análises moleculares confirmaram a transmissão transplacentária de *T. orientalis* com uma taxa de aproximadamente 2% Swilks et al. (2017a) como verificado por Baek et al. (2003). No Japão, Mekata et al. (2018) avaliando bezerros, relataram que aproximadamente 10% dos

animais nascidos de mães infectadas foram positivos na PCR aos três meses de idade, porém esses autores não mencionam quando ocorreu o quadro clínico.

Estudos têm demonstrado que a infecção bem-sucedida por *T. orientalis*, detectada por meio de esfregaço sanguíneo e PCR, tem sido consistentemente alcançada pela inoculação de aproximadamente 10^8 eritrócitos bovinos infectados contendo vários genótipos (Ishihara, 1962; Baek et al., 1992; Onuma et al., 1997; Hammer et al., 2016; Gibson, 2017; Emery et al., 2021a). Inóculos intravenosos e subcutâneos infectados com cerca de 10^8 *T. orientalis buffeli* ou *T. orientalis ikeda* produziram parasitose detectável por PCR dentro de quatro semanas (Emery, 2020; Emery et al., 2021a), corroborando com achados anteriores (Stewart et al., 1996; Hammer et al., 2016; Gibson, 2017) e atingindo o pico de parasitemia em torno de seis a oito semanas antes de se estabilizar em 2.000 a 10.000 cópias do gene uL-1, independentemente do genótipo. Hammer et al. (2016) verificaram que as infecções com $1,25 \times 10^7$ parasitos tiveram um período pré-patente mais longo.

Além disso, os resultados desses estudos indicaram que parasitemias por *T. orientalis* induzidas pela inoculação de sangue de genótipos benignos e virulentos únicos ou múltiplos não produziram sinais clínicos em bezerros com idade maior que quatro meses ou bovinos adultos (Stewart et al., 1996; Hammer et al., 2016; Gibson, 2017). Outra situação semelhante foi observada nos bezerros infectados por transmissão intrauterina ou colostrar em zonas endêmicas onde esses animais permanecem portadores assintomáticos (Minami et al., 1981; Onoe et al., 1994; Emery et al., 2021b). Não há na literatura as razões exatas para as diferenças na patogênese entre as altas parasitemias ocasionadas por carrapatos ou infecção estabilizada e aquelas induzidas por sangue infectado. Uma vez que os níveis de parasitemia gerados pela inoculação de sangue parasitado permanecem relativamente e persistentemente baixos quando comparáveis aos de animais recuperados e portadores (Emery et al., 2021a).

3.2. 5 Sinais clínicos

Em animais que desenvolvem sinais clínicos pela infecção por *T. orientalis* é descrita uma síndrome caracterizada por fraqueza, letargia, depressão, relutância em andar, inapetência, anemia hemolítica, redução da produção, abortos, natimortos, icterícia e morte em vacas periparturientes e bezerros jovens (Watts et al., 2016). Taxas de crescimento reduzidas foram relatadas no período de convalescença (Kawamoto et al., 1991), bem como diarreia e mortes em bovinos jovens de corte (Lawrence et al., 2017). Ao exame físico pode-se observar palidez de mucosas, pirexia, aumento das frequências respiratória e cardíaca, corrimento nasal e hipertrofia de linfonodos (Izzo et al., 2010; Aparna et al., 2011; Islam et al., 2011; McFadden

et al., 2011; Eamens et al., 2013a, Eamens et al., 2013b; Perera et al., 2014; Watts et al., 2016; Forshaw et al., 2020).

No exame *post mortem* de casos suspeitos de teileriose oriental foi observado icterícia, fígado, rins e baço pálidos, arredondados e aumentados, duodenite hemorrágica, úlceras na mucosa abomasal, edema pulmonar e enterite (Izzo et al., 2010; Aparna et al., 2011; McFadden et al., 2011; Gebrekidan et al., 2015; Gebrekidan et al., 2017a). No entanto, tanto os sinais clínicos quanto os achados *post mortem* são muitas vezes subjetivos e não são específicos da teileriose oriental, pois doenças causadas por outros hemopatógenos podem causar sinais clínicos ou lesões semelhantes em bovinos (Gharbi et al., 2006; Magona et al., 2008).

Os casos clínicos de bovinos infectados por *T. orientalis* tipo *ikeda* geralmente apresentam anemia, e os sinais clínicos incluem letargia, depressão, frequências respiratórias e cardíacas elevadas, icterícia, pirexia e, em casos graves, aborto, natimorto e morte (Pulford et al., 2016; Vink et al., 2016; Lawrence et al., 2016a). O tipo *buffeli* não parece estar associado a quadros anêmicos (Eamens et al., 2013c).

Na Coreia, os genótipos *MPSP tipo 1, 2, 3 e 7* de *T. orientalis* foram detectados por PCR em bovinos Holandeses com infecção natural, esses animais apresentaram uma anemia regenerativa significativamente mais grave em comparação com os animais PCR negativos. A anemia foi a alteração mais frequente e mais grave em indivíduos positivos para o genótipo *tipo 1* (Kim et al., 2017) e anemia macrocítica normocrômica também foi registrada em bovinos da Malásia infectados com esse genótipo (Haron et al., 2014) além de uma vaca com infecção letal por *T. orientalis buffeli* (Stockham et al., 2000).

Em Nova Gales do Sul, Queensland e Victorian na Austrália, os genótipos *chitose* e *buffeli* foram isolados de bovinos clinicamente saudáveis, mas já foi verificado esses mesmos genótipos associados ao genótipo *ikeda* em animais afetados clinicamente (Eamens et al., 2013a). Na Nova Zelândia entre 2012 e 2014, o risco de casos de anemia associada a infecção por *T. orientalis* tipo *ikeda* foi maior em bezerros de rebanhos de corte do que em bezerros leiteiros (Lawrence et al., 2016b). O parto em rebanhos de corte ocorria mais tarde do que em rebanhos leiteiros (McFadden et al., 2015) e bezerros de corte não eram mantidos confinados rotineiramente após o nascimento, o que era frequente para bezerros leiteiros. Como resultado, o período de parto de animais de corte e outros fatores causadores de estresses fisiológicos, como a castração, coincidiram com o pico de atividade das ninfas de *H. longicornis*, levando a altas taxas de infecção por *T. orientalis* em bezerros de corte em regiões onde a infecção por esse parasito é endêmica (Heath, 2016; Swilks et al., 2017b). Estudos anteriores examinaram a disseminação e a prevalência da infecção em bezerros de corte e a interação entre as mães, seus

bezerros e a propagação da doença (Hammer et al., 2016; Swilks et al., 2017b), no entanto, associações entre infecção e taxas de crescimento de bezerros de corte em fazendas comerciais não foi avaliado.

O genótipo *tipo 7* de *T. orientalis* foi diagnosticado como responsável pela mortalidade em bovinos adultos mestiços no sul da Índia. Os sinais clínicos observados foram temperatura corporal elevada, lacrimejamento, secreção nasal, linfonodos edemaciados e hemoglobinúria. As lesões *post mortem* observadas foram úlceras perfuradas no abomaso, aumento do baço, edema pulmonar maciço, exsudatos espumosos na traqueia, hemorragia epicárdica e endocárdica e duodenite hemorrágica (Aparna et al., 2011).

O genótipo *ikedá* de *T. orientalis* foi recentemente identificado em bovinos na Virgínia, Estados Unidos. Os animais foram clinicamente afetados neste surto apresentando uma anemia macrocítica hipocrômica regenerativa, hiperbilirrubinemia e plasma icterico consistente com anemia hemolítica (PCV 14,4%). Com base na análise dos esfregaços sanguíneos desses animais, observou-se uma parasitemia de 16%. Os animais apresentavam ainda icterícia, letargia, mal-estar geral e alguns animais evoluíram ao óbito (Oakes et al., 2019). Neste estudo alguns dos animais reagentes na PCR permaneceram positivos cinco meses após o diagnóstico, sugerindo um estado crônico, embora os animais que inicialmente apresentavam sinais clínicos não estivessem mais clinicamente doentes durante os meses de primavera e verão.

Os búfalos geralmente permanecem assintomáticos quando infectados com espécies de *Theileria* (McKeever, 2009). A primeira descrição de quadros clínicos ocasionados pela infecção por *T. orientalis* (genótipo N2) em búfalos ocorreu no norte da Índia. Quinze búfalos foram transportados de um distrito localizado no norte do país, estado de Punjab para o estado de Kerala, sul da Índia. Os sinais clínicos começaram a se manifestar na oitava semana após a chegada. Os animais apresentaram sinais precoces como letargia, redução no consumo de ração, hipogalactia e despigmentação generalizada da pele. Alguns animais progrediram para linfadenopatia, conjuntivite hemorrágica, lacrimejamento, anemia, anorexia, decúbito esternal, edemas na região do metacarpo de um ou mais membros. Sete animais apresentaram estágios graves da doença, como anemia grave, edema, secreção nasal purulenta, pneumonia, ataxia, dispneia, decúbito lateral, culminando a morte. Nos achados *post mortem* foram observados petéquias e equimoses nos órgãos vitais, lesões primárias na musculatura subcutânea. Derrames torácicos e peritoneais, miopatia, hidropericárdio, enfisema pulmonar, congestão multilobular e consolidação dos pulmões em cinco animais. Múltiplos focos nodulares brancos eram evidentes predominantemente nos rins. Infiltração linfocítica difusa de órgãos vitais, depleção linfóide e edema em linfonodos foram observados em cortes de tecidos dos sete animais.

Hepatocitólise moderada e hemossiderose juntamente com linfangiectasia foram evidentes no fígado. Em todos os animais avaliados, foram observados amplo envolvimento renal como necrose, hialinização e glomerulite (Vinodkumar et al., 2015).

3.2.6 Diagnóstico

Na literatura podemos observar o uso de diversos métodos de diagnóstico empregados para a detecção, identificação, quantificação e caracterização de espécies de *T. orientalis* assim como o diagnóstico diferencial para infecção por outros hemopatógenos, principalmente em áreas endêmicas. Nesta tese, abordamos os métodos categorizados como convencionais (aspectos clínicos, microscopia e sorológicos) e moleculares que são rotineiramente mais utilizados.

3.2.6.1 Métodos convencionais

3.2.6.1.1 Aspectos clínicos

Exames clínicos e *post mortem* auxiliam no diagnóstico da teileriose oriental. Como método diagnóstico, a abordagem clínica pode fornecer algumas informações sobre a ocorrência da doença nos rebanhos afetados, caracterização dela. Da mesma forma, o exame *post mortem* de casos suspeitos também pode auxiliar no diagnóstico. No entanto, tanto os sinais clínicos quanto os achados *post mortem* são muitas vezes subjetivos e não patognomônicos, pois doenças causadas por outras espécies de *Theileria* bem como por outros hemopatógenos como *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale* são responsáveis por quadros clínicos semelhantes em bovinos (Gharbi et al., 2006; Magona et al., 2008; Oakes et al., 2019; Oakes et al., 2022). Dessa maneira, essas abordagens servem como uma metodologia de auxílio no diagnóstico da teileriose oriental.

3.2.6.1.2 Exame microscópico

A teileriose oriental pode ser diagnosticada pela análise microscópica de lâminas de esfregaços sanguíneos ou aspirados de linfonodos com agulha fina, corados com *Giemsa* (Shayan; Rahbari, 2005; Biddle et al., 2013; Irwin, 2013). Esse método permite a identificação do parasito (piroplasmas) no interior de eritrócitos e macroesquizontes (corpos azuis de Koch) em leucócitos (Aktas et al., 2006a; Khattak et al., 2012; Khatoon et al., 2013; Perera et al., 2013; Rajendran; Ray, 2014; Chauhan et al., 2015).

A microscopia também pode ser utilizada para estimar a parasitemia (carga parasitária), particularmente em casos agudos em que os animais apresentam quadros clínicos, onde podemos observar muitos eritrócitos infectados por *T. orientalis* (Izzo et al., 2010; Khatoon et al., 2013; Rajendran; Ray, 2014). No entanto, esfregaços sanguíneos não são úteis quando a parasitemia é baixa ou em portadores assintomáticos, demonstrando uma baixa sensibilidade, logo, não é confiável para o monitoramento e triagem em larga escala em populações de bovinos (Li et al., 2014). Além disso, não permite a diferenciação morfológica dos genótipos de *T. orientalis* ou outras espécies de *Theileria* spp. que infectam bovídeos. As principais limitações do exame microscópico para identificação de *T. orientalis* incluem menor especificidade, sensibilidade, incapacidade de identificar ao nível genotípico, o tempo necessário para leitura das lâminas, bem como um operador com devida experiência na confecção e leitura destas lâminas. Além disso, artefatos (por exemplo, precipitados de coloração) e corpúsculos de *Howell-Jolly* podem ser confundidos com piroplasmas intraeritrocitários por microscopistas inexperientes (Aktas et al., 2006b; Izzo et al., 2010; Aparna et al., 2011; Nayel et al., 2012; Perera et al., 2013; Charaya et al., 2016).

3.2.6.1.3 Métodos sorológicos

O teste de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação em látex e ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido empregados para a detecção de anticorpos anti-*T. orientalis* em bovinos (Uilenberg et al., 1985; Shimizu et al., 1988; Papadopoulos et al., 1996; Jeong et al., 2005; Wang et al., 2010a).

Na década de 70 e 80 muitas técnicas sorológicas foram desenvolvidas para a detecção de anticorpos contra os piroplasmas (Todorovic, 1975; Papadopoulos et al., 1996). Por muitos anos a RIFI era uma das técnicas mais simples, sensível e eficaz para este fim (Johnston et al., 1973; Todorovic; Long, 1976; Kuttler et al., 1977; Bidwell et al., 1978; Gray et al., 1980; Applewhaite et al., 1981; Fusinaga; Minami, 1981; Stewart et al., 1992).

Porém, a RIFI apresenta vários inconvenientes, nomeadamente, interpretação subjetiva dos resultados dependente do operador, baixo rendimento e dificuldade de padronização (Katende et al., 1998). No entanto, o maior problema é a significativa reatividade cruzada observada entre as diversas espécies de *Theileria*. Papadopoulos et al. (1996) durante um levantamento sorológico por RIFI para pesquisa de hemoparasitos da ordem Piroplasmida em bovinos, caprinos e ovinos, na Macedônia, utilizou antígenos de *T. orientalis*, *T. annulata*, *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* e *B. major*. Foi verificada a existência de reações cruzadas de diferentes graus entre as espécies avaliadas. Dessa maneira, ficou evidente que o

uso dessa técnica nem sempre é satisfatório para o diagnóstico de infecções em regiões onde os animais estão infectados com diferentes piroplasmas.

A detecção de anticorpos pela RIFI pode, portanto, ser uma medida ineficaz para atribuir infecções causadas pelas espécies de *Theileria* (Uilenberg, 1981; Uilenberg et al., 1985; Stewart et al., 1996), especialmente quando intimamente relacionadas, como os genótipos encontrados de *T. orientalis*, com *T. mutans* e *T. velifera* em regiões onde essas espécies são comuns (Mans et al., 2015). Mesmo assim, alguns autores consideram essa técnica útil em estudos epidemiológicos (Thompson et al., 2008; Mbizeni et al., 2013).

Um teste de Aglutinação em látex utilizando a proteína *p33* como antígeno foi desenvolvido para monitorar anticorpos anti- *T. sergenti* em 1046 amostras de soro de bovinos de abatedouro e de fazendas na Coreia do Sul. Ao comparar esse teste com qPCR eles encontram uma sensibilidade e especificidade de 86,5% e 92,5%, respectivamente. Este estudo indicou que o teste de aglutinação em látex pode ser utilizado como uma ferramenta para o monitoramento epidemiológico de infecções por *T. sergenti* em campo (Jeong et al., 2005).

Outro método sorológico, o ensaio imunoenzimático (ELISA), com vantagens como fácil execução, baixo custo e boa reprodutibilidade, foi desenvolvido para monitorar a teileriose causada por *T. annulata*, facilitando o estudo de sua epidemiologia (Salih et al., 2005). Katende et al. (1998) e Bakheit et al. (2004) desenvolveram um teste ELISA para detecção de anticorpos anti- *T. parva* e *T. annulata*, respectivamente. No entanto, não havia um teste disponível para detecção de anticorpos para parasitos do grupo *T. orientalis* (Ota et al., 2009).

Em 2010 Wang et al. (2010a) publicaram um estudo sobre o desenvolvimento de um teste ELISA para detecção de anticorpos anti- *T. sergenti* utilizando uma proteína recombinante da superfície do piroplasma (*rp33*) para diagnosticar a infecção em amostras de búfalos da província de Hubei na China. Neste estudo, utilizando essa proteína específica de *T. sergenti*, eles observaram uma alta especificidade do teste, não sendo verificada reação cruzada com anticorpos anti-*Babesia orientalis*, *Schistosoma japonicum*, *A. marginale* e *Toxoplasma gondii* com uma taxa de positividade maior (27,5%) em relação a PCR (22,5%) e pela microscopia (12,9%). Os autores sugerem que essa técnica de sorodiagnóstico parece ser adequada para realizar inquéritos sorológicos em pesquisas epidemiológicas para fornecer uma visão abrangente da prevalência da doença e monitorar o curso da infecção conforme avaliado pelos títulos de anticorpos.

Um ELISA com antígeno recombinante baseado na proteína *MPSP* de *T. orientalis* foi desenvolvido para investigar se a soroconversão para *MPSP* estava associada a anemia, carga parasitária e genótipo do parasito em animais agudamente infectados com *T. orientalis*. O

estudo demonstrou que a soroconversão estava significativamente associada à anemia do hospedeiro, carga parasitária e ao genótipo do parasito. Animais agudamente infectados soroconverteram rapidamente dentro de duas a três semanas após a infecção e a resposta humoral ao parasito foi mantida por pelo menos 10 semanas. Essa proteína representa um alvo vacinal promissor, uma vez que a variabilidade genética dentro da *MPSP* resulta em patogenicidade diferencial de *T. orientalis* (Jenkins; Bogema, 2016).

Todos esses testes sorológicos supracitados são direcionados às proteínas de superfície de *T. orientalis*. De todos os métodos sorológicos disponíveis, o ELISA é uma técnica relativamente sensível para estudar a prevalência de infecções por *T. orientalis* em populações de bovinos (não sendo tão eficaz na avaliação individual). Os métodos sorológicos são relatados como mais sensíveis em comparação com outros métodos diagnósticos tradicionais (sinais clínicos, necropsia e exames microscópicos) usados para *T. orientalis*. No entanto, essas técnicas também têm limitações, como a incapacidade em discriminar entre os diferentes genótipos de *T. orientalis* ou diferenciar entre infecções atuais e passadas e a reatividade cruzada com outras *Theileria* spp. (Mans et al., 2015). Assim, nenhum dos métodos convencionais utilizados para detecção de *T. orientalis* permite a diferenciação de genótipos conhecidos, ou fornece informações genéticas sobre o (s) parasito (s) que está (s) presente (s) na infecção (s).

3.2.6.1.4 Métodos moleculares

Os métodos de diagnóstico baseados nas análises moleculares podem preponderar muitas das limitações dos métodos convencionais (Conraths; Schares 2006). Até o momento, vários ensaios moleculares foram utilizados para detectar, caracterizar, diferenciar e quantificar membros do complexo de *T. orientalis*, incluindo reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR), *nested*-PCR (nPCR), amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), PCR em tempo real/quantitativo (qPCR) e ensaios de PCR em *tandem multiplex* (MT-PCR).

3.2.6.1.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)

A cPCR é amplamente utilizada para detectar e caracterizar *T. orientalis*. Ao compararmos esta técnica com os métodos diagnósticos tradicionais utilizados para diagnosticar infecções por *T. orientalis*, a cPCR demonstrou alcançar maior sensibilidade e especificidade diagnóstica aos diferentes marcadores genéticos (Perera et al., 2013; Mans et al., 2015; Gebrekidan et al., 2016; Gebrekidan et al., 2017a; Gebrekidan et al., 2017 b; Gebrekidan et al., 2017c; Gebrekidan et al., 2017d). Para este ensaio, marcadores incluindo *SSU*, *MPSP*,

proteína de membrana de piroplasma de 23 kDa (*p23*), proteína de membrana de piroplasma de 32 kDa (*p32*), proteína de membrana de piroplasma de 33 kDa (*p33*), proteína de membrana de piroplasma de 34 kDa (*p34*), *COX-III*, genes *β -tubulina* ou *ITS*, têm sido usados para detectar, diferenciar e caracterizar *T. orientalis* de diferentes países (Tanaka et al., 1993; Kawazu et al., 1995; Kubota et al., 1996; Sarataphan et al., 1999; Govaerts et al., 2002; Sarataphan et al., 2003; Ota et al., 2009; Liu et al., 2010; Islam et al., 2011; Liu et al., 2011; Mans et al., 2015). Destes marcadores, o gene *MPSP* é o mais comumente aplicado ao complexo de *T. orientalis* (Kim et al., 1998; Ota et al., 2009).

A utilização do gene *MPSP* nos ensaios de cPCR oferece a vantagem de amplificar regiões de DNA de *T. orientalis* relativamente longas, particularmente para caracterizar novas espécies e/ou genótipos pela primeira vez em comparação com ensaios de qPCR estabelecidos, que geralmente amplificam apenas fragmentos curtos de DNA (~ 70-200 pares de bases) (Kubota et al., 1996; Kim et al., 2004). Este método pode detectar a infecção em bovinos duas semanas antes da visualização por microscopia de luz (Ota et al., 2009). Além disso, esses métodos foram sendo performados, resultando em testes altamente sensíveis e específicos (Perera et al., 2015b).

Apesar de ser uma técnica com excelente desempenho, a cPCR apresenta algumas limitações, tais como incapacidade em diferenciar os genótipos nas situações em que há infecções mistas com *T. orientalis*, bem como, potencialmente, a presença de alguns constituintes sanguíneos que inibem a reação, como a lactoferrina, hemoglobina e alguns reagentes e produtos químicos que são utilizados na extração de DNA (Perera et al., 2015b). Pode-se ainda observar ao compararmos os ensaios de cPCR e a qPCR para a detecção de *T. orientalis* que este último método apresenta uma sensibilidade maior. Além disso, no ensaio de cPCR, as etapas pós-PCR, como a preparação de gel para eletroforese e purificação de produtos de PCR para sequenciamento, são onerosas, trabalhosas e demoradas (Gebrekidan et al., 2020). Com base no tamanho molecular dos produtos de PCR em géis de agarose, é difícil discriminar entre os genótipos do complexo *T. orientalis*.

Para contornar esse problema, a técnica de varredura de mutação, como polimorfismo de conformação de fita simples (*SSCP*), tem sido usada para discriminar sequências complexas e intimamente relacionadas (de um parasito distinto), mesmo que difiram apenas por um único nucleotídeo acima de 500 pb (Gasser et al., 2006). *SSCP* também tem sido usado para identificar a variação de sequência dentro e entre genótipos de *T. orientalis* (Cufos et al., 2012; Perera et al., 2013). A sensibilidade da detecção de diferenças de nucleotídeos depende do tamanho dos produtos de PCR e das condições de *SSCP* (Gasser et al., 2006).

3.2.6.1.4.2 *Nested-PCR*

Membros do complexo *T. orientalis* foram detectados em amostras de sangue de bovinos no Irã, África do Sul, Uganda e EUA usando ensaio de PCR semi-*nested* ou *nested* (nPCR) empregando os *loci* *SSU* ou *ITS* (Chae et al., 1998; Oura et al., 2011; Ghaemi et al., 2012; Chaisi et al., 2014). Os *primers* internos ligam-se a sequências no DNA alvo que estão dentro do fragmento de DNA amplificado pelos *primers* externos. A vantagem desta técnica é que, se os *primers* externos se ligam e amplificam regiões não-alvo da sequência de DNA, é raro que os *primers* internos se liguem nas regiões incorretas do DNA (Odongo et al., 2010).

Uma limitação da nPCR pode ser a maior probabilidade de contaminação, pois os *amplicons* da primeira reação de PCR são diluídos para a segunda reação de PCR, e a chance de contaminar a reação é alta, o que pode levar a resultados falso-positivos (Cox-Singh et al., 2000). Além disso, nPCR requer mais tempo que cPCR devido às duas rodadas de amplificação (Janardhanan et al., 2014). A estimativa de sensibilidade e especificidade diagnóstica do ensaio nPCR é difícil de mensurar. No entanto, alguns estudos compararam sensibilidade e especificidade diagnóstica do ensaio nPCR com os de ensaios de cPCR, descobriram que a sensibilidade diagnóstica da nPCR foi maior que o da cPCR. No entanto, devido à maior probabilidade de resultados falso-positivos, a especificidade diagnóstica da nPCR pode ser inferior ao da cPCR (Rigotto et al., 2005; Kim et al., 2008; Kim et al., 2011).

Visando a identificação e diferenciação de genótipos de *T. orientalis* em bovinos que podem estar infectados com *T. annulata* simultaneamente, Ghaemi et al. (2012) desenvolveram uma PCR semi-*nested*. Um conjunto de *primers* (Tbs-S/Tbs-A), derivado do gene codificador de *rRNA 18S* foi desenhado e usado neste estudo para amplificar o gênero de *Theileria* e espécies de *Babesia* na etapa de PCR convencional. Após a purificação dos produtos amplificados na primeira reação que foram positivas, todas foram amplificadas por PCR semi-*nested* utilizando um conjunto de *primers* específico para *T. orientalis* (To-S/Tbs-A) derivado do gene codificador de *rRNA 18S*. Assim, eles avaliaram 160 amostras de sangue coletadas de bovinos nativos aparentemente saudáveis na província de Golestan no norte do Irã, durante 2009 a 2011. Das 160 amostras de sangue, 13 (8,12%) foram positivas para *Theileria* sp. Enquanto isso, realizando a semi-*nested* com os *primers* específicos para *T. orientalis*, nove das 13 amostras de sangue (5,62%) foram positivas e realizando PCR semi-*nested* com *primers* específicos para *T. annulata*, 12 de 13 amostras de sangue (7,5%) também foram positivas. Resultados de PCR semi-*nested* por *primers* específicos para *T. orientalis* em comparação com PCR semi-*nested* por *primers* específicos para *T. annulata* mostraram que havia infecções

mistas de *T. orientalis* e *T. annulata* em oito amostras. A semi-nested nesse estudo demonstrou ser um método altamente específico e sensível para a identificação das espécies de *T. orientalis* e *T. annulata* na triagem de bovinos e nos levantamentos epidemiológicos.

3.2.6.1.4.3 Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)

LAMP é uma técnica simples, sensível, rápida e econômica que amplifica diferentes *templates*, incluindo DNA genômico, sangue tratado termicamente e sangue seco em papel filtro sob condições isotérmicas (Notomi et al., 2000; Kuboki et al., 2003; Poon et al., 2006; Thekisoe et al., 2010). Essa técnica é um método diagnóstico útil para ser empregado em laboratórios com escassez de recursos, uma vez que não requer equipamentos laboratoriais caros, como termocicladores, geladeiras e/ou refrigeradores, os reagentes são estáveis à temperatura ambiente (25 a 37 °C), o que torna esse método adequado para uso em condições de campo (Thekisoe et al., 2009).

O uso de LAMP na detecção de piroplasmidas já foi utilizado em diversos estudos para detecção de *Theileria* spp. e *Babesia* spp. em amostras de bovinos (Iseki et al., 2007; Salih et al., 2008; He et al., 2009; Thekisoe et al., 2010; Liu et al., 2012). No entanto, apenas dois estudos relataram o uso de LAMP para o diagnóstico de infecção por *T. orientalis* na China (Wang et al., 2010b; Liu et al., 2013). Uma das principais limitações do LAMP para *T. orientalis* foi o desafio de desenhar *primers* confiáveis para genótipos intimamente relacionados, além disso, em alguns países a importação dos reagentes ainda possuem elevados custos (Torres et al., 2011).

Wang et al. (2010b) desenvolveram o LAMP para detecção de *T. orientalis* (*T. sergenti*) em 313 amostras de campo (154 de búfalos de água e 159 de bovinos) coletadas em oito propriedades pertencentes a quatro províncias (Hubei, Henan, Jiangxi e Jilin) na China. Quatro *primers* foram desenhados a partir de seis regiões distintas do gene alvo, proteína de superfície do piroplasma de 33 kDa (*p33*) de *T. orientalis* (*T. sergenti*). O ensaio de especificidade mostrou-se específico para *T. orientalis*, o LAMP foi capaz de detectar um nível de parasitemia de 0,000002% que foi mais sensível que a cPCR. Cerca de 60,4% (96/159) das amostras de bovinos foram positivas pelo LAMP, em comparação com 30,0% (46/154) das amostras de búfalos. O ensaio LAMP mostrou-se tão específico e mais sensível que a cPCR. Os autores consideraram esta técnica molecular como adequada para realizar uma visão abrangente da prevalência da doença em inquéritos epidemiológicos e recomendaram o uso em laboratórios com financiamento limitado por se caracterizar como uma ferramenta diagnóstica rápida, simples, econômica, e conveniente para a teileriose em búfalos e bovinos.

Foi desenvolvido e validado um ensaio LAMP espécie-específico da região ITS para detecção e diferenciação rápida de duas espécies benignas de *Theileria* morfologicamente indistinguíveis que infectam bovinos e iaques, *T. orientalis* (*T. sergenti*) e *T. sinensis*. Na análise de 594 amostras de sangue de bovinos coletadas de seis províncias diferentes na China o LAMP apresentou ideais condições para um ensaio, tais como não exibição de reação cruzada com outros parasitos transmitidos por carrapatos intimamente relacionados (*T. annulata*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. major*, *B. ovata*, *A. marginale*) ou entre as duas espécies de *Theileria* de interesse desse estudo. O ensaio demonstrou uma excelente sensibilidade, aproximadamente 10 vezes maior do que o ensaio de cPCR específico. O ensaio LAMP foi validado usando amostras de DNA já padronizadas e avaliado quanto à sua utilização diagnóstica usando amostras de sangue coletadas de bovinos e iaques infectados experimentalmente e naturalmente na China. Esses achados indicam que este ensaio LAMP específico para espécies de *Theileria* pode ter potenciais aplicações clínicas para a detecção e diferenciação das espécies *T. orientalis* e *T. sinensis* e em investigações epidemiológicas, devido a sua sensibilidade, especificidade, custo, rapidez e fácil execução e, portanto, pode contribuir para o controle efetivo de infecções por *Theileria* em bovinos e iaques, especialmente em países endêmicos (Liu et al., 2013).

3.2.6.1.4.4 PCR em tempo real/quantitativo (qPCR)

Das técnicas moleculares utilizadas, a qPCR é um ensaio com excelente confiabilidade para aferir a expressão gênica, quantificar a intensidade do parasito e realizar análises de polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphism* -SNP). Em comparação com outras ferramentas de diagnóstico molecular comumente usadas, como cPCR, nPCR e ensaios LAMP, a qPCR é mais sensível e menos demorada e, uma vez padronizada e validada criteriosamente, não requer análises pós-PCR, como eletroforese em gel e sequenciamento de DNA (Francino et al., 2006; Abda et al., 2011).

Diversos estudos avaliaram o ensaio de qPCR para a detecção, identificação e quantificação de *Theileria* spp. infectando bovinos (Sibeko et al., 2008; Papli et al., 2011; Ros-García et al., 2012; Chaisi et al., 2013). Ensaio *TaqMan* qPCR foram desenvolvidos para genótipos de *T. orientalis*, visando o gene *MPSP* para uso diagnóstico na Austrália (Bogema et al., 2015) e na Nova Zelândia (Pulford et al., 2015). Esses dois ensaios tiveram desempenho semelhante, em termos de especificidade e sensibilidade, mas não foram capazes de detectar todos os genótipos atualmente conhecidos de *T. orientalis* ou permitirem a identificação de novos genótipos nesses países.

No entanto, uma das vantagens dessa técnica é a capacidade em distinguir entre as infecções agudas e crônicas pela quantificação do número de cópias do gene usando (Bogema et al., 2015). Apesar disso, os custos iniciais ligados à criação e padronização da *qPCR* podem ser relativamente altos (Mackay et al., 2002). Devido à alta sensibilidade analítica dos ensaios de *qPCR*, desenho experimental sólido, a inclusão de controles internos adequados e normalização de dados são cruciais para alcançar resultados confiáveis (Wong; Medrano, 2005).

3.2.6.1.4.5 PCR em *tandem multiplex* (MT-PCR)

Vários ensaios de *qPCR duplex* e/ou *multiplex* foram desenvolvidos para a detecção simultânea de diferentes espécies de patógenos de bovídeos incluindo *Theileria* spp. (Criado-Fornelio et al., 2009; Peleg et al., 2010; Bilgiç et al., 2013; Junlong et al., 2015).

O ensaio envolve amplificação primária usando *primers* desenhados para cada um dos genótipos de *T. orientalis* dirigidos, e amplificação secundária para quantificação usando *primers* alinhados para regiões internas de marcadores específicos. As amostras testadas neste ensaio são registradas como teste positivo ou teste negativo usando uma função automática no *software Easy-Plex*. Da mesma forma, a intensidade da infecção (números de cópias de DNA) para cada genótipo em cada amostra é determinada por comparação com os dados de limiar de ciclo pre-determinados para um controle interno de pico contendo um número de cópias de DNA conhecido (10.000) fornecido pelo AusDiagnostics Pty. Ltd., Austrália (Perera et al., 2015b). Embora este ensaio seja um método sensível e econômico em termos de tempo e custo para detectar simultaneamente vários genótipos de *T. orientalis*, ele requer reagentes e equipamentos específicos e, portanto, pode ser relativamente uma técnica cara (Gebrekidan et al., 2020).

Um ensaio MT-PCR foi desenvolvido para a detecção simultânea dos quatro genótipos comuns (*buffeli*, *chitose*, *ikeda* e *tipo 5*) do complexo *T. orientalis* conhecido por ocorrerem na Austrália (Perera et al., 2015b). Este ensaio utilizou vários marcadores, incluindo o gene *MPSP* para os genótipos *chitose* e *tipo 5*, o gene *p23* para *buffeli* e *ITS-1* para *ikeda* (Perera et al., 2015b). No entanto, posteriormente, Gebrekidan et al. (2017d) detectaram a amplificação cruzada do gene *p23* e *ITS-1* de ambos os genótipos *buffeli* e *ikeda*. Consequentemente, o ensaio MT-PCR foi modificado para detectar os quatro genótipos comuns (*buffeli*, *chitose*, *ikeda* e *tipo 5*) de *T. orientalis* usando apenas *MPSP* como marcador no ensaio (Gebrekidan et al., 2018).

3.2.7 Diversidade e distribuição de *T. orientalis*

Theileria orientalis é um parasito cosmopolita (Uilenberg et al., 1985). As infecções foram relatadas na Austrália (Kamau et al., 2011a; Eamens et al., 2013a,b,c), Nova Zelândia (McFadden et al., 2011), Sudeste Asiático (Inoue et al., 2001; Govaerts et al., 2002; Sarataphan et al., 2003; Khukhuu et al., 2011; BAWM et al., 2014; Gebrekidan et al., 2017a), Leste Asiático (Kim et al., 1998; Ota et al., 2009; Jeong et al., 2010; Liu et al., 2010; Altangerel et al., 2011), Sul da Ásia (Aparna et al., 2011; Sivakumar et al., 2013; Kakati et al., 2015; Vinodkumar et al., 2015), Oriente Médio (Aktas et al., 2006ab; Ghaemi et al., 2012; Elsify et al., 2015), África (Kiltz et al., 1986; Adjou et al., 2015; Gebrekidan et al., 2016), Europa (Minami et al., 1980; Fujisaki et al., 1993; Papadopoulos et al., 1996; Savani et al., 1998; García-Sanmartín et al., 2006; Gomes et al., 2013; Hornok et al., 2014) e Américas (Kakuda et al., 1998; Sivakumar et al., 2014a; Silveira et al., 2016; Oakes et al., 2019).

Vários estudos relataram a presença de genótipos de *T. orientalis* em búfalos de água (Ferreri et al., 2008; McKeever, 2009; Oura et al., 2010; Altangerel et al., 2011; Aparna et al., 2011; Khukhuu et al., 2011; He et al., 2012; Ghaemi et al., 2012; Sivakumar et al., 2013; Sivakumar et al., 2014a; Vinodkumar et al., 2015).

Nas Américas, a primeira descrição na literatura de parasitos do complexo *T. orientalis* ocorreu em um bovino no Texas, EUA, o qual o isolado foi caracterizado como o genótipo do tipo 6 (Kakuda et al., 1998). Posteriormente, bovinos foram diagnosticados com *T. orientalis*, genótipo tipo 3 (*buffeli*) no Texas, Missouri e Carolina do Norte, EUA (Chae et al., 1999; Stockham et al., 2000), sendo que desses casos, apenas um apresentou sinais clínicos consistentes com Teileriose. Cossio-Bayugar et al. (2002), descreveram infecção por *T. orientalis* também com o genótipo tipo 3 em uma vaca no estado de Michigan, EUA. Recentemente um dos genótipos considerado mais patogênico (*ikedai*) foi detectado em casos de mortalidade em bovinos de corte em uma fazenda na Virgínia e posteriormente esse patógeno foi detectado em estados vizinhos, mas nenhuma mortalidade resultante da infecção foi relatada (Oakes et al., 2019; Thompson et al., 2020; Oakes et al., 2022).

Na América do Sul, o primeiro relato de *T. orientalis* foi em bovinos no sertão baiano, no entanto, sem descrição desses casos, apenas depósito de sequências de DNA do gene *MPSP* no *GenBank* (Sivakumar et al., 2014b). Posteriormente, houve a descrição molecular em búfalos de água no estado do Pará, região Amazônica do Brasil, no qual encontraram uma prevalência de 3,5% pelo gene *18S rRNA* de *Theileria* spp. verificando similaridade com *T. buffeli* (Silveira et al., 2016). Abate et al. (2018) identificaram um animal positivo também pelo gene *18S rRNA* de *Theileria* spp., com similaridade *T. buffeli* na mesma espécie animal no estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil, proveniente de uma fazenda localizada no Bioma Amazônico.

Apesar desse parasito estar globalmente disperso, na análise dos estudos é observado que na maioria dos países a identidade genotípica do complexo *T. orientalis* e a relevância clínica dos distintos genótipos ainda não está esclarecida, incluindo o Brasil. A distribuição genotípica de *T. orientalis* tem sido investigada em diferentes animais hospedeiros. Diferenças nos tipos *MPSP* foram encontradas não apenas entre as espécies hospedeiras, mas também entre regiões geograficamente diferentes.

O *tipo-6* foi detectado em bovinos e iaques, mas não em búfalos, enquanto o *tipo N1* foi detectado em búfalos, mas não em bovinos (Sarataphan et al., 2003; Liu et al., 2010; Sivakumar et al., 2014a). O *tipo N1* da sequência do gene *MPSP* é 3 pb mais longo do que outros tipos de *MPSP*, exceto o *tipo 6* (Kawazu et al., 1999; Sivakumar et al., 2014a). Com base na especificidade do hospedeiro e na variação genética, Kawazu et al. (1999) propuseram que o genótipo *N1* deveria ser classificado como uma espécie diferente de *Theileria*.

Os *tipos 2 e 8* são predominantes entre as populações de bovinos (Yokoyama et al., 2011; Kang et al., 2012; Perera et al., 2013), embora esse genótipo (*tipo 2*) foi detectado em um búfalo criado no Egito (Sivakumar et al., 2014b). No entanto, não foram realizados estudos visando a detecção de genótipos de *T. orientalis* baseados no gene *MPSP* nas populações de búfalos de água de países endêmicos para o genótipo *tipo 2* e, portanto, mais estudos são essenciais para confirmar a especificidade do hospedeiro dos *tipos 2 e 8*. Dessa maneira, Sivakumar et al. (2014b) sugerem que, em geral, existe uma relação entre a especificidade do hospedeiro e os tipos *MPSP* em *T. orientalis*.

Embora vários genótipos de *T. orientalis* ocorram comumente entre bovinos e búfalos, os perfis de infecção cruzada entre esses hospedeiros foram diferentes em alguns países endêmicos, possivelmente devido às diferenças nos hospedeiros vetores. Populações de bovinos do Sri Lanka foram descritas infectadas com os *tipos 1, 3, 5 e 7*, já os búfalos, também analisados nesse estudo, estavam infectados somente com *N1 e N2* (Sivakumar et al., 2013; Sivakumar et al., 2014b). Acredita-se que não haja uma barreira específica para a transmissão de tipos de *MPSP* derivados de bovinos para búfalos, os *tipos 1, 3, 5 e 7* também foram encontrados em búfalos criados em outros países (Mongólia, Vietnã) (Altangerel et al., 2011b; Khukhuu et al., 2011), a transmissão desses genótipos foi de alguma forma limitada ao Sri Lanka (Sivakumar et al., 2014b). As diferenças nas espécies de carrapatos que se alimentam de bovinos e búfalos (Dovaudi et al., 2008) podem explicar as diferenças nos genótipos que infectam esses hospedeiros no Sri Lanka. Mais estudos são essenciais para identificar as espécies de carrapatos que podem transmitir *T. orientalis* para bovinos e bubalinos.

No Brasil, existe uma diversidade de genótipos de *T. orientalis* MPSP (tipos 1, 2, 3, 4, 5, 7, N2 e N3), incluindo genótipos patogênicos isolados de bovinos do estado da Bahia (Sivakumar et al., 2014b).

3.2.8 Tratamento e profilaxia

A oxitetraciclina e o cloridrato de imidocarb são usados para o tratamento de casos clínicos de *T. orientalis* (Schein; Voigt, 1979; Morgan; Mchardy, 1982). A quimioterapia é empregada para prevenir o desenvolvimento e persistência da infecção por *T. orientalis*.

As indústrias voltadas para bovinocultura em regiões endêmicas para *T. orientalis* se beneficiariam substancialmente de medidas para reduzir o impacto da infecção inicial, seja por meio do controle do vetor ou dos estágios iniciais da patogênese da infecção. Se isso puder ser gerenciado no estado de portador os animais sob criação convencional pareceriam estar protegidos de manifestações clínicas (Emery, 2020).

Enquanto acaricidas tradicionais eficazes previnem o desenvolvimento de espécies patogênicas no hospedeiro definitivo, o controle no hospedeiro intermediário pode evitar o desenvolvimento de esquizontes ou remover estágios sanguíneos que poderiam ser ingeridos pelo carrapato durante repasto sanguíneo. Na prevenção ou retardo de o desenvolvimento de *T. parva* no protocolo “infectar e tratar”, oxitetraciclina e “GUTS” (*ground-up tick sobrenate* – sobrenadante de macerados de carrapatos) são administrados simultaneamente (Mutugi et al., 1989; Kubota et al., 1996). Devido às dificuldades na produção de GUTS derivados de carrapatos, esse protocolo não foi experimentado para *T. orientalis*.

Evidências anedóticas sugeriram que o toltrazuril pode atenuar o desenvolvimento de esquizontes em bezerro (Emery, 2020). Quanto a prevenção do estabelecimento de protozoários o toltrazuril é conhecido por ser ativo contra os estágios de esquizontes de *Eimeria* e *Isospora* spp., que estão relacionados com *Theileria* (Jonsson et al., 2011). Esta droga permanece em níveis terapêuticos em bezerros por aproximadamente oito dias (Dirikolu et al., 2008), o que coincidiria com o desenvolvimento inicial do esquizonte. No entanto, Lawrence et al. (2020) na Nova Zelândia administraram uma dose de 15 mg/kg desse fármaco em 20 bezerros leiteiros durante quatro semanas após o nascimento, verificando que o toltrazuril não preveniu ou melhorou significativamente as parasitemias. Da mesma forma, também na Austrália, esse fármaco foi administrado na mesma posologia a 15 bezerros, quatro dias após o desafio com a infestação de carrapatos *H. longicornis* adultos (aproximadamente 50 exemplares) não alimentados que haviam sido infectados com *T. orientalis ikeda* quando ninfas. Esse protocolo foi estabelecido para que coincidisse com os estágios iniciais de esquizonte incluindo os três

dias de alimentação necessários para amadurecer os esporozoítos nos carrapatos antes da inoculação (Marendy et al., 2020). Ao comparar os bezerros infectados, mas não tratados, o toltrazuril não teve efeito significativo no desenvolvimento de parasitemia (De Burgh; Emery, 2021).

Outra maneira profilática de interromper a transmissão de *T. orientalis* em regiões endêmicas é curar o estado de portador nos animais assintomáticos. Experimentalmente no campo, isso se desenvolve após a transferência mecânica de sangue infectado após o primeiro quadro de parasitemia. Alguns compostos foram utilizados para um ensaio quimioterápico com seleções baseadas na premissa de que a doença clínica de *T. orientalis* coincidiu com o aparecimento de piroplasmas em lâminas de esfregaços sanguíneos, febre e parasitemia, e que esses estágios de merozoítos se multiplicaram em eritrócitos como observado com hemoparasitos dos gêneros *Babesia* e *Plasmodium*. Assim, drogas com atividade contra outros hemoprotozoários com estágios eritrocitários importantes para o desenvolvimento assexuado podem ser eficazes contra *T. orientalis*. Em Queensland, *T. orientalis (buffeli)* pode ser curado pela administração de primaquina e halofuginona ou primiquina e buparvaquona (Stewart et al., 1990).

Em regiões endêmicas com desafio sazonal contínuo de carrapatos vetores, o estado de portador parece prevenir a recorrência da teileriose clínica sem reduzir a produtividade, de modo que a cura do estado de portador pode não ser benéfica (Bailey, 2012; Perera et al., 2014; Swilks et al., 2017a). Atualmente, restringir os níveis de infestação de carrapatos é a opção mais viável para a prevenção da teileriose clínica em bezerros recém-nascidos em regiões endêmicas (Emery, 2021).

Apesar da baixa eficiência, o uso de vacinas de sangue total foi empregado como tentativa de evitar a transmissão de *T. orientalis* (Ishihara, 1962; Minami, et al., 1981; Baek et al., 1992; Onuma et al., 1997). Os estudos de dose-resposta em vacinas de sangue não foram concluídos devido ao histórico bastante *ad hoc* desses ensaios (De Vos, 2011), mas vários resultados enfatizam que a dose pode influenciar os níveis de proteção gerados. Tanto a infecção passiva no útero quanto a transferência de anticorpos não parecem fornecer imunidade protetora após o nascimento (Minami, et al., 1981; Onuma et al., 1997), e isso pode estar relacionado à infecção de baixa dose e ao período transitório de anticorpos maternos sob desafio consistente de carrapatos. No entanto, Emery et al. (2021b) verificaram que o intervalo entre a infecção passiva e o desafio do carrapato, a intensidade do desafio do carrapato e a nutrição podem afetar o resultado, com bezerros constantemente parasitados por 3 a 4 semanas de idade.

Perante toda essa problemática, estudos foram surgindo na tentativa de encontrarem antígenos protetores e formulações vacinais baseadas nos estágios sanguíneos do parasito. No entanto, esses estágios são considerados responsáveis pelas sequelas clínicas da infecção e a partir da genotipagem do gene *MPSP*, ficou evidente a diversidade genética dentro dos genótipos e que existem genótipos mais virulentos (Sugimoto; Fujisaki, 2002; Sivakumar et al., 2014a; Bogema et al., 2018) o que implica na ineficiência desses protocolos. Além disso, a cinética temporal para genótipos de *T. orientalis* durante infecções em curso tem sido atribuída ao “escape” de anticorpos protetores específicos de *MPSP* (Jenkins et al., 2015; Masatani et al., 2016).

Dois estudos investigaram a eficácia do *MPSP* recombinante em vacinas. Bezerros imunizados com *MPSP* recombinante dos genótipos *ikeda* e *chitose* em adjuvante ou lipossomas mostraram efeitos vacinais após desafio com um estabilizado contendo ambas as variantes (genótipos) (Baek et al., 1992). Este estudo foi o primeiro a indicar que a imunidade de proteção cruzada pode ser gerada contra genótipos de *T. orientalis*, mas os níveis de parasitemia não foram relatados. Uma vacina *MPSP* recombinante para *T. orientalis* (*sergenti*) utilizou três vacinações em intervalos de três semanas, produzindo uma resposta de anticorpos, mas sem proteção contra o desafio (Park et al., 1999). Devido à falta de geração consistente de imunidade protetora, essas vacinas recombinantes não foram mais estudadas até o momento.

3.3 Linfoma em bovídeos

Linfoma é uma neoplasia maligna do sistema imune caracterizada pela proliferação neoplásica de linfócitos, que provoca a formação de massas tumorais em diversos órgãos. Os linfócitos podem ser do tipo B, T e células NK, de forma que qualquer um dos três pode sofrer transformação neoplásica resultando em linfoma (Campo et al., 2011; Oliveira et al., 2016a).

Os linfomas são amplamente estudados na espécie humana. A etiologia pode envolver fatores genéticos, hábitos alimentares e de saúde, porém grande parte deles estão associados a infecção por alguns vírus (Pasqualucci, 2013; Castillo et al., 2014). Nos animais domésticos, linfomas infecciosos são observados com maior frequência na espécie felina e bovina, também associados a infecções virais (Beatty, 2014; Panziera et al., 2014).

Em bovinos o surgimento de linfomas geralmente está associado à infecção pelo *Bovine leukemia virus (BLV)* causador da leucose enzoótica bovina (EBL), onde de 1 a 5% dos animais infectados desenvolvem linfoma, de 20 a 30% linfocitose persistente e a maioria permanece assintomática por longos períodos (Ghysdael et al., 1984; Bartlett et al., 2013). Os linfomas são multicêntricos podendo ser observados em diversos locais e órgãos o que provoca sinais clínicos variados. Os sinais clínicos mais observados são linfadenomegalia e emagrecimento progressivo. Alterações podem ser observadas nos locais onde as massas tumorais se localizam. No canal medular pode-se observar sinais neurológicos pela compressão de nervos, no globo ocular exoftalmia e distúrbios digestivos são gerados pelas massas tumorais no abomaso e intestinos. Os animais podem evoluir para estados de caquexia e morte (Grimshaw et al., 1979).

Outra causa infecciosa de linfomas em ruminantes são parasitos protozoários do gênero *Theileria* nos quais os esquizontes têm a capacidade de transformar o leucócito hospedeiro em uma célula tumoral em constante proliferação (linfoproliferação) com potencial de hiperdisseminação. Por isso essas espécies são conhecidas como transformadoras (Sivakumar et al., 2014a). Em ruminantes as espécies sabidamente transformadoras são *T. parva* e *T. annulata* em bovinos e *T. lestoquardi* em caprinos e ovinos (Bishop et al., 2004; McKeever, 2009; Sivakumar et al., 2014).

Na literatura são poucos os relatos de linfomas em búfalos, sendo descritos um caso na Venezuela (Vale-Echeto et al., 2009) e a maior concentração dos casos na Índia (Bhattacharya, 1967; Singh, 1968; Singh et al., 1973; Gupta et al., 1977; Singh et al., 1979; Singh et al., 1980; Chand et al., 2012; Kumar et al., 2012) e recentemente no Brasil foram descritos alguns casos no estado do Pará (Oliveira et al., 2016ab).

O primeiro relato de lesões compatíveis com linfoma em búfalos foi realizado na Índia em 1960, no entanto, esse achado foi acidental (Bhattacharya, 1967). Inicialmente foram observadas patologias do trato respiratório em 646 búfalos abatidos em abatedouro, 11 animais apresentando lesões compatíveis com linfoma. Nos anos seguintes 1961, 1962 outros 217 casos envolvendo pericárdio e epicárdio foram observados entre 2.306 animais. De 1962 a 1967 observou-se uma ocorrência de 10% (826 de 6745) entre búfalos abatidos em diferentes abatedouros da Índia. As lesões variavam de nódulos miliares, nódulos e papilas de crescimento contínuo e aspecto aveludado nas superfícies parietal e visceral de membranas serosas. O envolvimento de linfonodos variava de discreta tumefação até diversos graus de aumento de volume. No ano seguinte, Singh (1968) descreveu a presença de linfomas em búfalos de abatedouros também na Índia. As lesões foram semelhantes às observadas por Bhattacharya (1967), de forma que os linfonodos envolvidos estavam de 10 a 20 vezes aumentados e lesões de crescimento contínuo e com aspecto aveludado ou de couve-flor cresciam em membranas serosas de diversos órgãos e omento.

Em um estudo clínico-patológico avaliando 50 casos clínicos e 283 casos de linfomas em búfalos de abatedouros, na Índia, os autores descrevem diversos graus de envolvimento dos linfonodos e em alguns casos foram observados nódulos no tecido subcutâneo em diferentes localizações. Microscopicamente, os linfonodos afetados apresentaram proliferação de células linfoides, principalmente linfoblastos e/ou linfócitos, substituindo a arquitetura normal do órgão, resultando em completa desorganização. Observaram ainda infiltrados neoplásicos no coração, rins, fígado, abomaso, intestinos, hipófise, adrenal, nervos periféricos, diafragma, rúmen, uretra, úbere, vesícula seminal, testículos, epidídimo, retículo, tireoide, glândula bulbouretral, glândula salivar, traqueia, próstata, esôfago, laringe, omaso, língua, vesícula biliar, pâncreas, artéria pulmonar e pele. Os autores acreditavam que a neoplasia teria origem multicêntrica, sugerida pela proliferação de células mesenquimais indiferenciadas do sistema retículo endotelial (Singh et al., 1979).

Massas tumorais com grande envolvimento dos pulmões foram relatadas na Índia em búfalos. As lesões microscópicas foram caracterizadas por grandes agregados linfo-foliculares formados por linfoblastos e linfócitos, substituindo a estrutura alveolar normal dos pulmões (Singh et al., 1973). O infiltrado de células neoplásicas apresentava várias figuras de mitose. Lesões também foram observadas em linfonodos e outros órgãos. Outros relatos, também na Índia, incluem um caso de leucemia linfoide em que a contagem de leucócitos foi de 50050/ μ L de sangue, juntamente com a presença de linfoma em diversos órgãos (Gupta et al., 1977). Esses autores também relataram uma forma tímica da doença em uma búfala com oito anos de idade.

Em outro estudo observou-se casos envolvendo o sistema endócrino e reprodutivo (Singh et al., 1980).

A etiologia dos linfomas em búfalos ainda não foi elucidada, no entanto devido ao caráter multicêntrico dos tumores, alguns autores sugerem o envolvimento de agentes virais (Singh et al., 1973). Vale-Echeto et al. (2009) descreveram um caso de linfoma de caráter multicêntrico em uma búfala na Venezuela. Esses autores ao longo da discussão mencionam como um caso de EBL. Semelhantemente, em 2012, na Índia, Chand et al. (2012) e Kumar et al. (2012) relataram um caso de linfoma multicêntrico em uma búfala com cinco anos de idade e outra búfala com dez anos de idade apresentando nódulo único de aproximadamente 10 e 20 cm de diâmetro na região escapular, respectivamente. O primeiro caso além das alterações patológicas apresentou alterações hematológicas, no entanto, no segundo relato o animal não apresentou nenhuma alteração hematológica e bioquímica. Entretanto, nos três estudos os autores mencionam que esses linfomas multicêntricos teriam etiologia viral, ou seja, seriam ocasionados pelo *BLV* e os caracterizaram como quadros de EBL, contudo, não foi comprovado à existência do *BLV* nesses animais.

No Brasil Oliveira et al. (2016b) durante dez anos observaram a ocorrência de uma doença linfoproliferativa em bubalinos na região Amazônica, estado do Pará. Foram avaliados quatro animais de um mesmo rebanho, apresentando emagrecimento progressivo, hipertrofia dos linfonodos periféricos e nodulações de coloração esbranquiçada no tecido subcutâneo, nódulos miliares nas superfícies serosas de órgãos abdominais, caracterizando um linfoma multicêntrico de células B. Não foi verificada a presença de material gênico do *BLV* e do *Bovine herpesvirus 6* nos linfomas, sendo detectado apenas em amostras de um animal o *Bovine immunodeficiency virus* (BIV), no entanto, o papel oncogênico desse vírus precisa ser estudado, e a etiopatogenia dos linfomas nesses animais ainda não está esclarecida.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo de nº 133/2012 e nº 38/2017.

4.2 Local de estudo

O estudo foi realizado nos municípios de Abaetetuba, Castanhal, Ipixuna do Pará, Nova Timboteua, Soure e Vigia (Figura 2), que estão localizados no Estado do Pará, na Amazônia (S 1°21'4" e O 47°34'20"). O Pará, segundo maior estado do Brasil, possui uma área de 1.247.950 km², clima equatorial úmido, que possui altas temperaturas e altos índices pluviométricos e uma população estimada de 8.513.497 de habitantes (IBGE, 2017). A principal atividade econômica do estado do Pará é a bubalinocultura, este detém o maior número de animais do país, são 513.406 cabeças correspondendo a 37% do rebanho nacional, que estão distribuídos, basicamente, na ilha de Marajó e no Baixo e Médio Amazonas (IBGE, 2017).

4.3 Amostragem

O tamanho da amostra foi calculado através de uma amostra simples randomizada. Adotou-se uma prevalência esperada de 50%, segundo Stevenson (2008), com precisão absoluta de 5% e intervalo de confiança de 95%, conforme demonstrado a seguir:

$$n = z^2 (1 - Py) \times Py / d^2$$

n = tamanho da amostra;

z = coeficiente de confiança;

Py = prevalência esperada;

d = precisão absoluta desejada.

Portanto, foram colhidas amostras de 500 animais. Os animais eram das raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi, de ambos os sexos, com idade variando entre 2 a 15 anos.

Foram escolhidas por conveniência nove propriedades localizadas no estado do Pará, região Norte do país (região Amazônica). Sendo que quatro propriedades se localizam no arquipélago de Marajó e cinco no continente (Tabela 1).

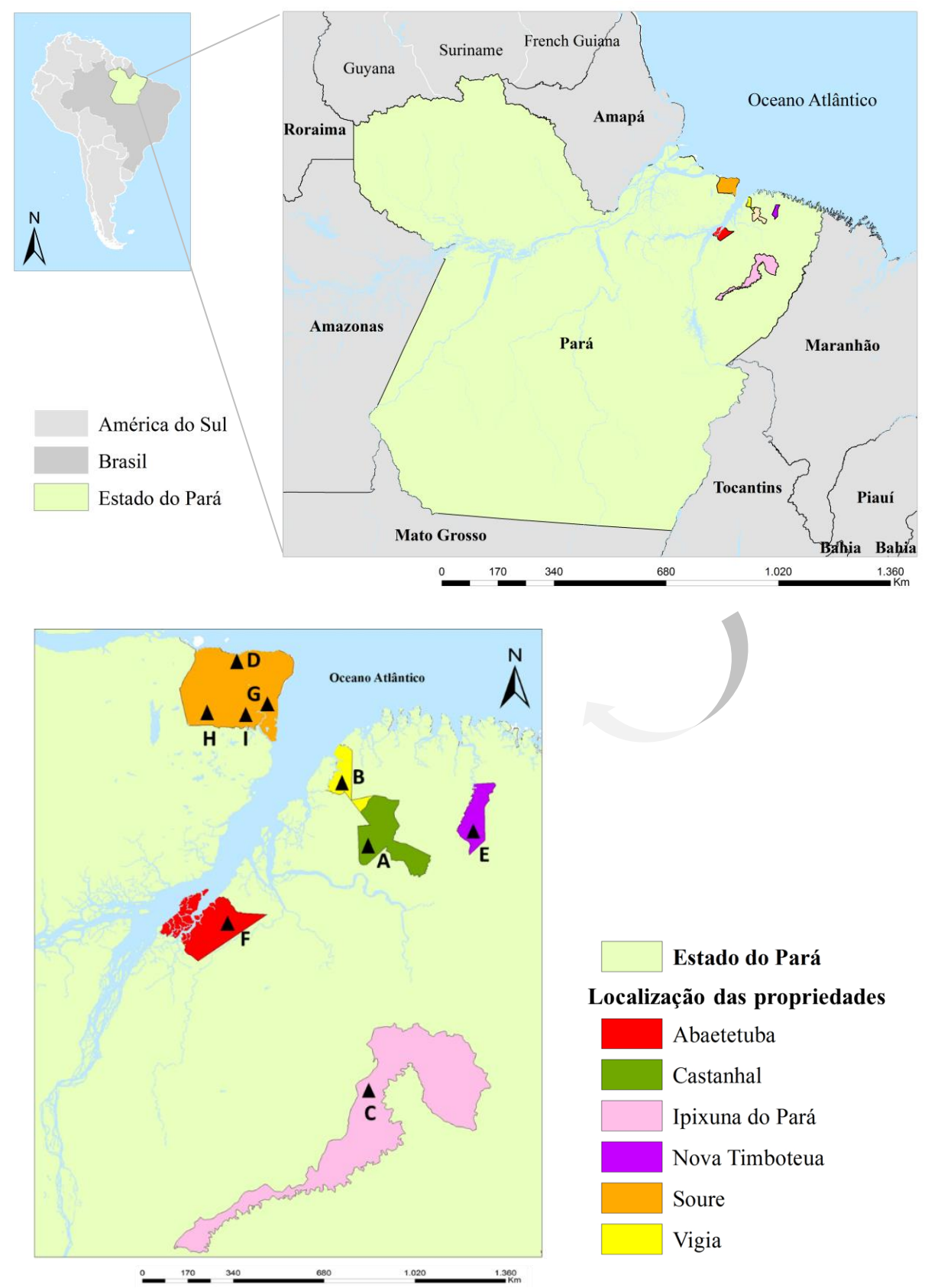
Os animais da propriedade A-PA eram destinados a reprodução na Central de biotecnologia da reprodução animal (Cebran), localizada em Castanhal. Esses animais são criados conjuntamente com bovinos em sistema semi-intensivo. As propriedades B-PA, C-PA, D-PA e F-PA eram de criação do tipo mista, onde o rebanho era explorado para corte e leite. Na propriedade E-PA os animais eram destinados a exploração leiteira. Os animais dessa propriedade são criados com bovinos, equídeos. Nas propriedades G-PA, H-PA e I-PA o sistema de criação era extensivo, as búfalas tinham contato com outros animais da fauna, além de equídeos, suínos e caprinos. A-PA e E-PA eram propriedades com histórico de linfomas no rebanho.

Tabela 1 – Número de propriedades amostradas, e distribuição das amostras sanguíneas coletadas ao longo dos anos de 2011 e 2020, no estado do Pará, região Amazônica, Brasil.

Propriedade	Município	Nº de animais amostrados
A-PA	Castanhal	104
B-PA	Vigia	13
C-PA	Ipixuna do Pará	82
D-PA ^a	Soure	72
E-PA	Nova Timboteua	74
F-PA	Abaetetuba	28
G-PA ^a	Soure	95
H-PA ^a	Soure	5
I-PA ^a	Soure	27
Total		500

ID identificação; N número; % percentual; a propriedades localizadas no arquipélago de Marajó.

Figura 2 – Mapa do Brasil mostrando o estado do Pará e os municípios onde foram coletadas as amostras.



Fonte: ARAUJO (2022).

4.4 Coleta de amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas foram colhidas ao longo dos anos de 2011 e 2020 por venopunção jugular, utilizando tubos com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra – Acético Sódico 300 mmol/L), por meio do sistema de colheita a vácuo. Os tubos foram armazenados a 8°C até a realização da técnica de Brener, Técnica de Woo, confecções dos esfregaços sanguíneos e *Buffy coat* e a extração de DNA para posterior realização das análises moleculares.

4.5 Análises laboratoriais

4.5.1 Pesquisa de hemopatógenos

4.5.1.1 Pesquisa de *Trypanosoma* spp.

Em 135 (135/500) amostras foi realizada a pesquisa de *Trypanosoma* spp. utilizando as técnicas de Brener (Brener, 1961), microhematócrito descrita por Woo (1970) e análise de *buffy coat*, descritas abaixo:

- **Técnica de Brener (1961):** utilizou-se uma alíquota de 5 µL de sangue disperso em lâmina de microscopia, sob lamínula de 22 x 22 mm. Deste modo, foram examinados 50 campos microscópicos, sob objetiva de 40 (*Olympus* BX40).

- **Técnica de Woo (1970):** os tubos de microhematócrito (Perfecta®, Mooca, São Paulo) foram lidos em microscópio óptico (*Olympus* BX40) em objetiva de 10 e 40 vezes para procura dos parasitos, que se concentram entre o plasma e a camada leucocitária.

- **Técnica de *Buffy coat* (Harvey, 2012):** após a leitura do Woo os microcapilares (Perfecta®, Mooca, São Paulo) foram seccionados acima da camada leucocitária e o conteúdo foi depositado em lâmina para a produção de um esfregaço. Posteriormente foram fixados com Metanol (Synth®, São Paulo, SP) e corados com *Giemsa* (*May-Grunwald-Giemsa* e *Wright Giemsa*) (*Sigma-Aldrich*®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). A leitura foi realizada em microscópio óptico (*Olympus* BX40) sob imersão em óleo com aumento de 1000X.

4.5.1.2 Confecções de esfregaços sanguíneos

A busca por hemopatógenos em células sanguíneas foi realizada pela leitura de campos homogêneos de esfregaços sanguíneos (135/500) (sangue total) corados com *Giemsa* (*May-Grunwald-Giemsa* e *Wright Giemsa*) (*Sigma-Aldrich*®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), previamente fixados com Metanol (Synth®, São Paulo, SP), utilizando microscópio óptico com

aumento de 1000X (*Olympus BX40*), sob imersão em óleo. Foram avaliados no mínimo 40 campos (aproximadamente 200 células por campo) (Ribeiro; Reis, 1981).

4.5.2 Análise molecular

4.5.2.1 Extração de DNA das amostras de sangue

O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando o kit comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanha). As amostras de DNA extraídas foram então identificadas e armazenadas a -20°C até a realização das PCRs. Os valores de concentração de DNA, assim como os de absorbância (260/280 nm), foram obtidos utilizando espectrofotômetro (Nanodrop®, Term Scientific, EUA).

4.5.2.2 Controle endógeno da PCR

Com o objetivo de avaliar a qualidade do material genômico extraído, as amostras de DNA foram submetidas à PCR objetivando a amplificação do gene *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*) de bovinos utilizando oligonucleotídeos iniciadores segundo Pinheiro de Oliveira et al. (2013), GAPDH F GGTGATGCTGGTGCTGAGTA e GAPDH R CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT. Foi utilizado 5µL de GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), 0,2µM de concentração de cada oligonucleotídeo iniciador, 1µL do DNA-amostra e água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p.10µL. Como controle negativo foi utilizado apenas o *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 1,0 µL de água. As reações foram conduzidas de acordo com a sequência térmica desnaturação inicial de 95°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 95° C durante 30 segundos, hibridização de 54°C durante 30 segundos, extensão de 72° C durante 50 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 7 minutos, amplificando um fragmento de 709 pb.

Após as amplificações realizou-se a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com GelRed™ (Biotium, Fremont, USA), em tampão TAE 0,5X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM). Uma alíquota de 3 µL de DNA adicionada de 2,0 µL de tampão de amostra (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) foi aplicada no gel. O DNA foi submetido à eletroforese por 45 minutos a uma voltagem constante de 100 V e corrente de 400mA. Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta.

4.5.2.3 Detecção molecular de *T. orientalis* por PCR e *nested-PCR*

Todas as amplificações de DNA foram realizadas para um volume final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra (com concentração entre 30 e 60ng), 0,2µM de concentração de cada oligonucleotídeo iniciador, 5µL de GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e água ultrapura esterilizada (*Nuclease-Free Water*, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p.10µL. As reações de *nested-PCR* (nPCR) foram realizadas seguindo as mesmas especificações citadas anteriormente, utilizando 1µL de produto amplificado da primeira reação.

Para detecção de DNA de parasitos do gênero *Theileria* as amostras de DNA foram submetidas a ensaios de PCR dirigidos aos genes *18S rRNA* utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Zahler et al. (2000). Reações de *nested-PCR* para região completa de *ITS* (*ITS1-5.8S-ITS2*) de *T. orientalis* foram conduzidas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Chaisi et al. (2014), cujas descrições também constam na Tabela 2. Visando a detecção de genótipos de *T. orientalis*, as amostras de DNA foram submetidas a ensaios de PCR baseados no gene *MPSP* (*Major Piroplasm Surface Protein*), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Ota et al. (2009), cujas descrições também constam na Tabela 2.

As reações de amplificação para os genes *18S rRNA* foram conduzidas de acordo com sequência térmica: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final a 72°C por 2 minutos. Para o gene *ITS*: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 29 ciclos a 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos e 68°C por 2 minutos e 30 segundos, seguidos de uma extensão final a 68°C por 5 minutos. No segundo ciclo a sequência térmica de amplificação consiste de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, e extensão final de 72°C por 5 minutos.

As condições de amplificação para o gene *MPSP* de *T. orientalis* consistiram em desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 2 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para ensaios de *nested*-PCR e PCR para detecção de *Theileria orientalis*.

	Sequência dos Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	Região gênica	Referência
1ª reação	1055F GGTGGTGCATGGCCG LSUR300 TWGCGCTTCAATCCC3	1500	Região completa <i>ITS</i> (<i>ITS1</i> -5.8S- <i>ITS2</i>)	Chaisi et al. (2014)
2ª reação	ITSF GAG AAGTCGTAACAAGGTTTCCG LSUR50 GCTTCACTCGCCGTTACTAGG	1200		
	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC CCGAATTCCTTGTACGACTTCTC	1514	18S rRNA	Zahler et al. (2000)
	MPSF (GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC) MPSPR (CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC)	776	MPSP	Ota et al. (2009)

pb pares de base.

4.5.2.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados por meio dos ensaios de PCR e nPCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% (m/v) corado com GelRed™ (Biotium, Fremont, USA), em tampão de corrida TAE 0,5X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM). A eletroforese foi realizada a 100V/400mA durante 60 minutos. Para a determinação do tamanho em pares de pb dos produtos amplificados de interesse utilizou-se um marcador de peso molecular de 1kb DNA *Ladder* (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta.

4.5.2.5 Sequenciamento nucleotídico e análise das sequências de nucleotídeos

Para garantir a recuperação de uma quantidade suficiente do fragmento de DNA amplificado para o gene *MPSP*, as amostras positivas foram amplificadas em duplicatas, para um volume total de 25 µL de cada amostra, utilizando 50 µL do produto amplificado para a purificação. Após a reação de cPCR os produtos amplificados de interesse foram purificados através de Polietilenoglicol (PEG) (20% PEG 8.000 em solução de NaCl 2,5M) (Promega, EUA) (www.icb.ufmg.br/lbem) e com *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Alemanha).

Para confirmação da purificação do material genômico, as amostras foram submetidas a uma nova eletroforese em gel de agarose como descrito no item 4.5.2.4. A quantificação de

material genômico total do produto purificado foi realizada como descrita no item 4.5.2.1, por meio da leitura da absorbância de cada amostra. Os produtos purificados foram preparados para sequenciamento segundo as recomendações da empresa Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, MG Brasil) (<https://www.myleus.com/>) e ACTGENE - Análises moleculares Ltda (Alvorada, RS Brasil) (<https://actgene.com.br/>), sendo sequenciadas por eletroforese capilar com o sequenciador automático ABI3730, utilizando-se polímero BigDye v3.1 e POP7, utilizando os mesmos oligonucleotídeos empregados nos ensaios de PCR para o gene *MPSP*, em duplicatas, sendo uma vez com o iniciador direto, e uma com o reverso permitindo uma maior confiabilidade das sequências consenso que serão obtidas.

Os eletrocromatogramas foram avaliados quanto à qualidade e foram editados nos programas MEGA XI (Tamura et al., 2021) e ChromasPro (Technelysium Ltd). Em seguida, as sequências foram submetidas à procura de identidade com as sequências depositadas em banco de dados. Para isso, utilizou-se o programa *Basic Alignment Search Tools* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (*National Library of Medicine*, EUA). Após a comparação no *BLASTn*, as sequências analisadas foram caracterizadas em espécie, de acordo com o grau de similaridade com os dados já depositados no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

4.5.2.6 Análises filogenéticas

Os contíguos das sequências foram alinhados por correspondência nucleotídica no programa MAFFT versão 7 (Katoh et al., 2019) e as regiões complementares aos iniciadores foram excluídas. As sequências geradas, novamente foram alinhadas com aquelas selecionadas do *GenBank* publicadas em estudos prévios (Kim et al., 1998; Zakimi et al., 2006; Ota et al., 2009), após uma análise filogenética prévia e que permitisse uma comparação com os genótipos de *T. orientalis* disponíveis usando o algoritmo E-INS-i do programa MAFFT (Katoh et al., 2019). Foram utilizadas as sequências de *T. annulata* e *T. parva* como grupos externos. Lacunas nas extremidades das sequências, devido a dados não amplificados ou por variação natural do comprimento, foram substituídas por 'n'. A reconstrução filogenética foi estimada usando os critérios de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) com base no modelo evolutivo GTR + I + Γ (tempo reversível generalizado com variação gamma e proporção de sítios invariáveis) selecionado pelo programa jModelTest 2 (Darriba et al., 2012), utilizando o Critério de Informação de Akaike (AIC). A melhor topologia da análise de MV foi gerada pelo programa RAxML-HPC BlackBox (7.6.3.) (Stamatakis et al., 2008), permitindo a parada automática de réplicas não paramétricas de *bootstrap*. A análise de IB foi construída usando

MrBayes versão 3.2. (Ronquist et al., 2012) em duas buscas independentes de MCMC, executando quatro cadeias (uma ‘fria’ e três ‘quentes’) por cinco milhões de gerações (ngen = 10,000,000), amostradas a cada 1,000 (samplefreq = 1,000) com os primeiros 25% descartados como “*burn-in*” (burninfrac = 0.25). O programa Tracer 1.7 (Rambaut et al., 2014) foi utilizado para checar a convergência e a homogeneização de diferentes parâmetros e para confirmar que o ESS dos parâmetros foi adequado para fornecer estimativas razoáveis de variância, isto é, ESS > 200.

A matrix de distância entre os grupos foi estimada utilizando o MEGA XI (Tamura et al., 2021) com o modelo *Maximum Composite Likelihood +G*.

4.5.2.6.1 Diversidade de *T. orientalis*

O alinhamento das sequências do gene *MPSP* amplificadas no presente estudo juntamente com as sequências de *T. orientalis* depositadas no *Genbank* foram utilizados para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), nível de polimorfismo (diversidade de haplótipo – [dh]), número de haplótipos (h) e a média do número de diferenças nucleotídicas (K) utilizando o *Software* DnaSP v5 (Librado; Rozas, 2009).

Foi realizada a análise de distância *Network*, utilizando o *Software* *Splitstree*, com os parâmetros *Neighbour-Net* e *Uncorrected p-distance*, das sequências *MPSP* detectadas no presente estudo em conjunto com aquelas obtidas via *GenBank*, cujo polimorfismo foi avaliado pelo *Software* DnaSP5 (Librado; Rozas, 2009).

5 Estudo clínico-anatomopatológico de linfomas

Quatro búfalos apresentando sinais clínicos indicativos de linfoma, pertencentes a propriedade A-PA (Caso 01, 03, 05 e 06) localizada no município de Castanhal, PA e dois pertencentes a propriedade E-PA (Caso 02 e 04) localizada no município de Nova Timboteua, região nordeste do estado do Pará, PA foram incluídos neste estudo.

5. 1 Exame clínico

Os dados epidemiológicos, clínicos e patológicos dos animais estudados foram obtidos por meio de visitas a duas propriedades localizadas nos municípios de Castanhal (A-PA) e Nova Timboteua (E-PA). Foi realizado exame clínico dos animais segundo Dirksen et al. (1993).

5.2 Coleta de amostras sanguíneas

Nos animais com sinais clínicos da enfermidade coletaram-se amostras de sangue por venopunção da jugular, em tubos estéreis a vácuo, com anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) para obtenção de sangue total. As amostras de sangue total foram congeladas a -20°C e posteriormente submetidas à realização da extração de DNA e as análises moleculares.

5.3 Coleta de amostra de linfonodos

Na fazenda localizada no município de Castanhal onde foram estudados quatro búfalos procedeu-se a punção pela técnica de citologia aspirativa com agulha fina - CAAF dos linfonodos pré-escapulares de três bubalinos (3, 5 e 6) com manifestação clínica sugestiva de linfoma utilizando-se o citoaspirador de Valeri®, agulhas hipodérmicas (30x7mm), seringas descartáveis e individuais para cada colheita.

O primeiro material colhido de cada linfonodo pela CAAF, contido tanto na agulha quanto na seringa, foi transferido para microtubos de 1,5 mL estéreis (livres de *DNase* / *RNase*), acondicionados sob refrigeração, e posteriormente, armazenados a -20°C até a realização da extração de DNA e as análises moleculares.

O segundo material citológico obtido de cada linfonodo dos três animais, foi imediatamente distendido em seis lâminas de microscopia (duplicata), secas, fixadas em Metanol (Synth®, São Paulo, SP), submetidas posteriormente às colorações com *Giemsa* (*May-Grunwald-Giemsa*) (*Sigma-Aldrich*®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

5.4 Necropsia e análise histopatológica

Realizou-se a necropsia dos búfalos 01, 03, 05 e 06 pertencentes a fazenda A-PA e dos bubalinos 2 e 4 oriundos da fazenda E-PA. Fragmentos de diversos órgãos foram fixados em formalina a 10% tamponada e encaminhados ao Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para avaliação histopatológica. Os fragmentos foram seccionados a 5 µm, corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e avaliados em microscopia óptica (*Olympus BX41TF*).

Adicionalmente, foram coletados durante a necropsia fragmentos de massas tumorais e de linfonodos que foram armazenados em microtubos de 1,5mL estéreis (livres de *DNase/RNase*), acondicionados sob refrigeração, e posteriormente, armazenados a -20°C até a realização da extração de DNA e as análises moleculares.

5.5 Estudo etiológico dos linfomas

Os fragmentos das massas tumorais, amostras sanguíneas e linfa dos animais submetidos ao estudo anatomopatológico foram submetidos às reações de PCR e *nested*-PCR para *Theileria orientalis*.

Para verificar a presença de material viral nas amostras supracitadas, três agentes, *Bovine leukemia virus* (BLV) (região do gene *env gp51*), *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) (dirigidas as regiões gênicas que codificam a polimerase e a glicoproteína B *gB* do BoHV-6) e *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) (gene *pol*), foram pesquisados através da PCR e *seminested*-PCR.

Adicionalmente, para verificar a presença de infecção por outros hemopatógenos as amostras também foram submetidas a reações de PCR e *nested*-PCR para detecção de DNA de *Anaplasma marginale* (dirigidas ao gene *msp4* e *msp1a*), agentes Anaplasmataceae dirigidas ao gene *16S rRNA Anaplasma* spp. (granulócitos e plaquetas) / *Ehrlichia* spp. (monócitos), gene *16S rRNA* de hemoplasmas (*Mycoplasma* spp., ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ e *M. weyonii*), para tripanosomatídeos dirigidos aos genes da *Catepsina L* de *Trypanosoma vivax* e *VSG* de *T. evansi*, *Babesia* spp./*Theileria* spp. baseada no gene *18S rRNA* e aos genes *SS rRNA* de *Babesia bovis* e *B. bigemina*.

5.5.1 Extração de DNA

Os fragmentos de tecido em parafina do animal 01 foram seccionados a 5 µm e submetidos a extração de DNA usando o Kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante para amostras FFEP (*formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*). Amostras congeladas de fragmentos de tumor, tecidos e as amostras de sangue total de todos os animais submetidos ao estudo anatomopatológico foram submetidas a extração de DNA total utilizando o kit citado acima, de acordo com as recomendações do fabricante para amostras de tecido fresco e amostras sanguíneas, respectivamente.

Visando obter uma segurança quanto a qualidade da extração de DNA, tanto nas extrações de amostras de sangue total, linfa, quanto as amostras de tecidos, a cada 12 amostras de DNA extraída, havia duas amostras controle (água ultrapura esterilizada) (*Nuclease-Free Water*, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA) que foram extraídas simultaneamente com as amostras a serem analisadas.

As amostras de DNA extraídas foram armazenadas a -20°C até a realização das PCRs. Os valores de concentração de DNA, assim como os de absorbância (260/280 nm), foram obtidos utilizando espectrofotômetro (Nanodrop®, Term Scientific, EUA), segundo instruções do fabricante. E posteriormente, para avaliar a qualidade e eficiência da extração do DNA, todas

as amostras foram submetidas a uma PCR para amplificação do gene constitutivo *GAPDH* (Pinheiro De Oliveira et al., 2013), conforme descrito no item 4.5.2.1.

Para verificar a qualidade e a comparação do cálculo estimado da quantidade de DNA nas amostras submetidas a extração de DNA, realizou-se eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com *GelRed*TM (Biotium, Fremont, USA), em tampão TAE 0,5X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM). Uma alíquota de 3 µL de DNA adicionada de 2,0 µL de tampão de amostra (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) foi aplicada no gel. Para comparação visual e cálculo estimado da quantidade de DNA, foi utilizado um marcador padrão de tamanho molecular de 100 pb (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e os resultados foram comparados segundo Oliveira et al. (2016a) para amostras que foram submetidas as análises de material viral e para às amostras submetidas a análises para detecção de *T. orientalis* para uma concentração de 60ng. O DNA foi submetido à eletroforese por 45 minutos a uma voltagem constante de 100 V e corrente de 400mA. Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta. A quantidade ótima de DNA utilizada para as análises moleculares dirigidas aos agentes virais foi definida entre 200 e 300 ng por reação.

5.5.2 Detecção molecular de *T. orientalis* por PCR e *nested*- PCR

Os fragmentos das massas tumorais, amostras sanguíneas e linfa dos animais submetidos ao estudo anatomopatológico foram submetidos às reações de PCR e *nested*-PCR para *T. orientalis* seguindo a mesma metodologia utilizada para amplificação das amostras de sangue descritas no item 4.5.2.3.

As amostras positivas para o gene *MPSP* foram submetidas às reações de sequenciamento nucleotídico para tal, as amostras foram amplificadas em duplicatas para um volume total de 25 µL de cada amostra. Posteriormente, os amplicómeros foram purificados com *DNA Cleanup Exo + SAP* (Cellco Biotech, Brasil). Para confirmação da purificação do material genômico purificado, as amostras foram submetidas a uma nova eletroforese em gel de agarose como descrito no item 4.5.2.4. A quantificação de material genômico total do produto purificado foi realizada como descrita no item 4.5.2.1.

Os produtos purificados foram preparados para sequenciamento segundo as recomendações da empresa CT Vacinas (Belo Horizonte, MG Brasil) (<http://www.ctvacinas.ufmg.br/>), utilizando os mesmos oligonucleotídeos empregados nos ensaios de PCR para o gene *MPSP*, em duplicatas, sendo uma vez com o iniciador direto, e uma com o reverso permitindo uma maior confiabilidade das sequências consenso que serão obtidas.

Os eletrocromatogramas foram avaliados quanto à qualidade e foram editados nos programas MEGA XI (Tamura et al., 2021) e ChromasPro (Technelysium Ltd). Em seguida, as sequências foram submetidas à procura de identidade com as sequências depositadas em banco de dados. Para isso, utilizou-se o programa *Basic Alignment Search Tools* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (*National Library of Medicine*, EUA). Após a comparação no *BLASTn*, as sequências analisadas foram caracterizadas em espécie, de acordo com o grau de similaridade com os dados já depositados no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Os contíguos das sequências foram alinhados seguindo a mesma metodologia descrita no item 4.5.2.6.

A reconstrução filogenética foi estimada utilizando diferentes modelos para se averiguar o agrupamento das amostras. O modelo de substituição de nucleotídeos Tajima-Nei com distribuição em gama foi utilizado para construção das árvores em *Neighbor Joining* (NJ) e *Maximum Likelihood* (ML) com 1000 réplicas de *Bootstrap* no programa MEGA XI (Tamura et al., 2021).

Além das sequências de amostras de *T. orientalis* detectadas nesse trabalho, foram utilizadas sequências provenientes de publicações prévias (Kim et al., 1998, Kawazu et al., 1999; Zakimi et al., 2006; Ota et al., 2009) e as sequências do grupo *N4* detectadas neste estudo. Sequências de *T. parva* e *T. annulata* foram utilizadas como grupos externo.

5.5.3 Detecção molecular de *Bovine leukemia virus* (BLV), *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) e *Bovine immunodeficiency virus* (BIV)

Todas as amplificações de DNA visando a detecção de material viral foram realizadas para um volume de 25µL, contendo 1U de *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega, USA), 1x de 5X *Green GoTaq® Flexi Buffer*, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP mix (Invitrogen, USA), 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, 300 ng de DNA e água ultrapura livre de *DNase* e *RNase* (Invitrogen-Life Technologies®, EUA) q.s.p. 25µL. As reações de *seminested-PCR* foram realizadas seguindo as mesmas especificações citadas anteriormente, utilizando 2 µL de produto amplificado da primeira reação.

Para detecção de DNA proviral para a região do gene *env* (*gp51*) do BLV as amostras de DNA foram submetidas a ensaios de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BLV-gp51-F 5'TCACCTTTCTGTGCCAAGTCT3' e BLV-gp51-R 5'TGGTGTTAAACGAGGACGTGT3' descritos por Oliveira et al. (2016a), que amplificam um fragmento de 568pb desse gene. Como controle positivo das reações foi utilizado DNA

obtido a partir de células FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas com BLV (Oliveira et al., 2016a), e como controle negativo água ultrapura livre de *DNase* e *RNase* (Invitrogen-Life Technologies®, EUA). Os ciclos para amplificação foram constituídos de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 51°C por 30s e extensão a 72°C por 30s, seguido de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Duas PCRs foram realizadas para amplificar as regiões gênicas que codificam a polimerase e a glicoproteína *B* (*gB*) do BoHV-6. O gene *pol* foi testado por meio de *seminested* PCR (BoHV6-*pol*-PCR), que amplifica um fragmento de 551 pb na reação externa (BoHV6-F 5'ACAGACGGGCAGCAGATAAG3' e BoHV6-R 5'ATGGTTCGCCCCTGTAGAGT3') e 166 pb na reação interna (BoHV6-F e Snested R 5'AGTCTACCACGAGCACAGGA3') seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2015). Os ciclos para amplificação foram constituídos de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 51°C por 30s e extensão a 72°C por 30s, seguido de extensão final a 72°C por 5 minutos.

A PCR convencional (BoHV6-*gB*-PCR) amplifica um fragmento de 665 pb do gene *gB* do BoHV-6 (BoHV6-*gB*-F 5'AGGCGACGCTATCTCAGTGT3' e R 5'TGATAAGCCCGAAGACCAACA3'). A reação foi conduzida com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial de 94°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° C durante 30 segundos, hibridização de 58°C durante 30 segundos, extensão de 72° C durante 30 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 4 minutos. Um clone obtido a partir de um bovino do estado do Pará (BOVBR8-2, *GenBank*: KM438003 e KM438007) foi utilizado como controle positivo nas PCRs (Oliveira et al., 2015).

As amostras de DNA foram submetidas a *seminested*-PCR para o BIV para amplificar parte da região conservada do gene *pol* que codifica a enzima DNA polimerase do BIV, empregando os iniciadores BIV F (5' CCCTCCAGGAATTAAGGAATG 3') e BIV R (3' TCACTTTCTCTTCCTGGACCTT 5') amplificando um fragmento de tamanho 385pb na primeira reação. Essas reações foram conduzidas de acordo com sequência térmica: desnaturação inicial de 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, hibridização de 54°C durante 40 segundos, extensão de 72° C durante 40 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 4 minutos.

A PCR *seminested* foi conduzida empregando o iniciador interno BIV SNested (5' AGCCACCCAGACATCATGTT 3') e o externo BIV R, amplificando um fragmento da região mais interna do gene de tamanho 154pb. A reação foi conduzida com as seguintes condições de

amplificação: desnaturação inicial de 94°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° C durante 30 segundos, hibridização de 58°C durante 30 segundos, extensão de 72° C durante 30 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 4 minutos. Como controle positivo para a *seminested*-PCR para o BIV foi utilizado DNA plasmidial contendo parte do gene *pol* (Rodrigues et al., 2014) e controle negativo água ultrapura livre de *DNase* e *RNase* (Invitrogen-Life Technologies®, EUA).

Os produtos amplificados por meio dos ensaios de PCR e *seminested*- PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% (m/v) corado com GelRed™ (Biotium, Fremont, USA), em tampão de corrida TAE 0,5X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM). A eletroforese foi realizada a 120V/400mA durante 45 minutos. Para a determinação do tamanho em pares de pb dos produtos amplificados de interesse utilizou-se um marcador de peso molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta.

5.5.4 Detecção molecular de hemopatógenos por PCR e *nested*-PCR

Todas as amplificações de DNA dos hemopatógenos pesquisados foram realizadas para um volume final de 10µL, contendo uma mistura de 1µL do DNA-amostra (com concentração entre 25 a 50ng), 0,2µM de concentração de cada oligonucleotídeo iniciador, 5µL de GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e água ultrapura esterilizada (*Nuclease-Free Water*, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p.10µL. As reações de *nested*-PCR (*nPCR*) foram realizadas seguindo as mesmas especificações citadas anteriormente, utilizando 1µL de produto amplificado da primeira reação.

Para pesquisa de DNA de *Anaplasma marginale* (dirigidas ao gene *msp4* e *msp1a*), agentes Anaplasmataceae dirigidas ao gene *16S rRNA Anaplasma* spp. (granulócitos e plaquetas) / *Ehrlichia* spp. (monócitos), gene *16S rRNA* de hemoplasmas (*Mycoplasma* spp., ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ e *M. wenyonii*), para tripanosomatídeos dirigidos aos genes da *Catepsina L* de *Trypanosoma vivax* e *VSG* de *T. evansi*, *Babesia* spp./*Theilerias* spp. baseada no gene *18S rRNA* e aos genes *SS rRNA de Babesia bovis* e *B. bigemina* as reações foram realizadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores já descritos na literatura e utilizados rotineiramente no Laboratório de Protozoologia Veterinária- PROTOVET , cuja região gênica, sequências dos oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos estão demonstrados na tabela 3.

As condições de amplificação para cada oligonucleotídeos foi conduzida seguindo as descrições de cada referência, respectivamente.

As amostras de DNA controles positivos para cada reação foram utilizados do banco de DNA do laboratório PROTOVET, onde o trabalho foi realizado.

Os produtos amplificados por meio dos ensaios de PCR e *n*PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% e 1,5% (para os fragmentos de *T. evansi*) (m/v) corado com GelRed™ (Biotium, Fremont, USA), em tampão de corrida TAE 0,5X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM). A eletroforese foi realizada a 100V/400mA durante 60 minutos. Para a determinação do tamanho em pares de bases (pb) dos produtos amplificados de interesse utilizou-se um marcador de peso molecular de 1kb DNA *Ladder* (Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta.

Tabela 3 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, região gênica para ensaios de PCR e *nested*-PCR para detecção de hemopatógenos.

Hemopatógeno	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5'- 3')	Nome do oligonucleotídeo	Região gênica	Tamanho do produto amplificado (pb)	Referência
<i>Anaplasma marginale</i>					
1ª reação	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGATTGTTTAC CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC	MSP45 MSP43	<i>msp4</i>	872	de la Fuente et al. (2008)
2ª reação	CGCCAGCAAACCTTTTCCAAA ATATGGGGACACAGGCAAAT	AnapF AnapR	<i>msp4</i>	294	Silveira et al. (2011)
<i>Anaplasma marginale</i>					
1ª reação	GCTTTACGCCGCCGCTGCGCCG CATTACAACGCAACCGTTGA	MSP1aP MSP1a3	<i>msp1a</i>	2000	de la Fuente et al. (2001)
2ª reação	TGTGGTTGTCCTCTTTCCCGATGTC ACCGCCAAACATGAAGTCGACAA	MSP1aNF MSP1aNR	<i>msp1a</i>	800	Bastos et al. (2009)
Agentes Anaplasmataceae de granulócitos					
1ª reação	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	GE3a GE10r	<i>16S rRNA</i>	932	Massung et al. (1998)
2ª reação	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	GE9f GE2	<i>16S rRNA</i>	546	
Agentes Anaplasmataceae de monócitos					
1ª reação	ACGGACAATTGCTTATAGCCTT ACAACCTTTATGGATTAGCTAAAT	NS16SCH1F NS16SCH1R	<i>16S rRNA</i>	1195	Kawahara et al. (2009)
2ª reação	GGGCACGTAGGTGGACTAG CCTGTTAGGAGGGATACGAC	NS16SCH2F NS16SCH2R	<i>16S rRNA</i>	443	
<i>Mycoplasma spp.</i>	ATACGGCCCATATTCCTACG TGCTCCACCACTTGTTCA	HBTF5 HBTR5	<i>16S rRNA</i>	595	Criado-Fornelio et al. (2003)

'Candidatus Mycoplasma haemobos'	ATCTAACATGCCCCTCTGTA GTAGTATTCGGTGCAAACAA	F R	16S rRNA	500	Nishizawa et al. (2010)
Mycoplasma Wenyonii	ACTTTTACGAGGAGGATAGC TGATTAACTCTAGGGAGGCG	F R	16S rRNA	600	Nishizawa et al. (2010)
Trypanosoma vivax	ACAGAATTCCAGGGCCAATGCGGCTCGTGCTG GTTAGAATTCCCAGGAGTTCTTGATGATCCAGTA	DTO 154 DTO 155	Domínio Catalítico <i>Catepsina L- like</i>	500	Cortez et al. (2006) (2009)
Trypanosoma evansi	TGCAGACGACCTGACGCTACT CTCCTAGAAGCTTCGGTGTCTCT	TevF TevR	VSG <i>Trypanosoma evansi</i>	227	Omanwar et al. (1999) e Ravindran et al. (2008)
Babesia/Theileria spp.					
1ª reação	CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC CCGAATTCCTTGTTACGACTTCTC	RIB-19 RIB-20	18S rRNA	1700	Zahler et al. (2000)
2ª reação	ACCTCACCAGGTCCAGACAG GTACAAAGGGCAGGGACGTA	BAB-rumF BABrumR	18S rRNA	430	Silveira et al.(2011)
Babesia bovis	CTGTCGTACCGTTGGTTGAC CTGGCCGCGAGCGGCGA	GAU9 GAU13	SS rRNA	883	Linhares et al. (2002)
Babesia bigemina	TGGCGGCGTTTATTAGTTTCG GCCAGCGAAAAGACCCAAC	GAU5 GAU8	SS rRNA	458	Linhares et al. (2002)

F= Forward; R= Reverse; pb – pares de base.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Análises laboratoriais

6.1.1 Pesquisa de hemoparasitos/hemopatógenos

Não foram detectados tripomastigotas de *T. vivax* circulantes nas amostras dos 135 búfalos avaliados, tanto no teste de Brener, Woo e *buffy coat*.

Na leitura das lâminas de esfregaços sanguíneos, não foram detectados corpúsculos sugestivos de agentes Anaplasmataceae, *Mycoplasma* spp., bem como a presença de estruturas de parasitos do gênero *Babesia*, *Theileria* e *Trypanosoma*.

6.2 Análises moleculares

6.2.1 Controle endógeno da PCR

Para avaliar a eficácia da extração de DNA, o material genético extraído das amostras de sangue dos búfalos foi submetido a uma PCR convencional para detecção do gene *GAPDH*. O produto da amplificação deste gene resultou em uma única banda em gel de agarose, correspondente a um fragmento de 709 pb, como o esperado. Através da análise dos resultados obtidos, a detecção do gene *GAPDH* foi possível em todas as 500 amostras testadas. Como o *GAPDH* é um gene constitutivo e estável, expresso em altos níveis em quase todos os tecidos e células, este resultado com alta porcentagem de amplificação sugere que a extração de DNA obteve sucesso, aumentando assim a confiabilidade dos testes e diminuindo a possibilidade de resultados falsos negativos por ausência ou degradação de DNA.

O ensaio foi realizado após a avaliação espectrofotométrica da concentração média e das relações de absorbância (260/280 e 260/230nm) das amostras de DNA extraídas, as quais assumiram valores de 221,14 ng/μL, 1,8 e 1,33, respectivamente.

6.2.2 Detecção molecular de *T. orientalis* por PCR e *nested-PCR*

Das 500 amostras sanguíneas submetidas às análises moleculares dirigidas ao gene *18S rRNA* do gênero *Theileira* 15,4% (77/500) foram positivas. Essas mesmas amostras foram positivas quando avaliadas para genes específicos de *T. orientalis* (*ITS* e *MPSP*), obtendo-se 15,4% (77/500), respectivamente.

Foi verificado uma frequência maior de animais positivos para *T. orientalis* na propriedade E-PA localizada no município de Nova Timboteua. Dos 74 animais avaliados 33

(44,59%) foram positivos (gene *18S rRNA*, *ITS* e *MPSP*), seguido da propriedade A-PA, localizada em Castanhal com 35,58% (37/104). Três propriedades localizadas em Soure (Ilha de Marajó), D-PA, G-PA e I-PA tiveram animais positivos, correspondendo a 1,39% (1/72), 1,05% (1/95) e 18,52% (5/27), respectivamente (Tabela 4).

Ao avaliarmos o histórico de linfoma nas propriedades, detectamos que em três (0,6%) A-PA, E-PA e G-PA, localizadas nos municípios de Castanhal, Nova Timboteua e Soure, respectivamente, ocorreram casos de linfomas. No momento da coleta das amostras sanguíneas dois (0,4%) animais da propriedade A-PA apresentavam diagnóstico para presença de linfomas. As amostras sanguíneas destes animais quando submetidas às análises moleculares para detecção de *T. orientalis*, estas foram positivas (1,92%; 2/104).

Tabela 4 - Frequência de animais positivos nos testes parasitológicos (esfregaços sanguíneos e *Buffy coat*) e moleculares (*nested*-PCR e PCR) segundo a localização das propriedades, histórico de linfoma ao longo dos anos de 2011 e 2020, no estado do Pará.

ID Propriedade	Localização	N de animais avaliados	Histórico de linfoma	N de animais positivos (%)					
				Presença de linfoma	<i>Buffy coat</i>	Esfregaços sanguíneos	<i>Nested</i> PCR/PCR		
							<i>Theileria</i> spp.	<i>Theileria orientalis</i>	
							<i>18S rRNA</i>	<i>ITS</i>	<i>MPSP</i>
A-PA	Castanhal	104	sim	2 (1,92%)	0	0	37 (35,58%)	37 (35,58%)	37 (35,58%)
B-PA	Vigia	13	não	0	-	0	0	0	0
C-PA	Ipixuna do Pará	82	não	0	-	0	0	0	0
D-PA ^a	Soure	72	não	0	-	0	1 (1,39%)	1 (1,39%)	1 (1,39%)
E-PA	Nova Timboteua	74	sim	0	0	0	33 (44,59%)	33 (44,59%)	33 (44,59%)
F-PA	Abaetetuba	28	não	0	-	0	0	0	0
G-PA ^a	Soure	95	sim	0	-	0	1 (1,05%)	1 (1,05%)	1 (1,05%)
H-PA ^a	Soure	5	não	0	0	0	0	0	0
I-PA ^a	Soure	27	não	0	0	0	5 (18,52%)	5 (18,52%)	5 (18,52%)
Total		500		2 (0,4%)	0	0	77 (15,4%)	77 (15,4%)	77 (15,4%)

ID identificação; N número; PCR Reação em Cadeia da Polimerase; % percentual; a propriedades localizadas no arquipélago de Marajó; - não foi realizado.

6.2.3 Análise das sequências de *T. orientalis* para o gene *MPSP*

Devido à fraca intensidade da banda formada, só foi possível submeter às análises de sequenciamento nucleotídico, 35/77 amostras, destas, foi possível obter 21 sequências com qualidade referentes ao gene *MPSP* (~770pb).

A análise das 21 sequências obtidas quando submetidas ao *BLASTn* revelou porcentagens de identidade variando entre 99 a 100% com sequências de *T. orientalis* isoladas de búfalos (Índia, Siri Lanka e Vietnam) previamente depositadas no *GenBank*, com valores de cobertura das sequências variando de 99% a 100% e *E-value* de 0.

6.2.4 Análises filogenéticas

As sequências do gene *MPSP* de isolados de *T. orientalis* derivados de búfalos de água (21) foram filogeneticamente analisados para identificar os genótipos de *T. orientalis* circulantes nos animais das nove propriedades avaliadas, pertencentes ao estado do Pará, região Amazônica. Três genótipos (*N1*, *N2* e *N4*) foram identificados nas populações analisadas, sendo *N1* e *N2* já descritos na literatura e *N4* um novo genótipo detectado no presente estudo (Tabela 5).

Tabela 5 – Genótipos de *Theileria orientalis* baseados no gene *MPSP* em búfalos de água do estado do Pará.

ID propriedade	Localização	N de amostras coletadas	N de amostras positivas (%)	Genótipo
A-PA	Castanhal	104	37 (35,58)	<i>N1</i> (1), <i>N2</i> (2), <i>N4</i> (10)
B-PA	Vigia	13	0	0
C-PA	Ipixuna do Pará	82	0	0
D-PA ^a	Soure	72	1 (1,39)	<i>N4</i> (1)
E-PA	Nova Timboteua	74	33 (44,59)	<i>N1</i> (1), <i>N4</i> (5)
F-PA	Abaetetuba	28	0	0
G-PA ^a	Soure	95	1 (1,05)	<i>N4</i> (1)
H-PA ^a	Soure	5	0	0
I-PA ^a	Soure	27	5 (18,52)	<i>N1</i> (1)

ID identificação; N número; % percentual; a propriedades localizadas no arquipélago de Marajó.

Entre os três genótipos detectados na população bubalina, o *tipo N4* foi encontrado em quatro das cinco propriedades onde foi verificada infecção por *T. orientalis* no presente estudo. O *tipo N1* foi encontrado em três propriedades localizadas em Castanhal (A-PA), Nova Timboteua (E-PA) e Soure (I-PA), enquanto *N2* foi detectado apenas em Castanhal (A-PA). Verificou-se na população de bubalinos da propriedade A-PA a presença dos três genótipos detectados neste estudo (*N1*, *N2* e *N4*) e na propriedade E-PA a presença de dois genótipos (*N1* e *N4*) (Tabela 5).

As reconstruções filogenéticas geradas pelo método IB e MV mostraram uma clara separação, constituindo um novo grupo monofilético formado por 16 sequências, bem suportados com altos valores de probabilidade posterior e de *bootstrap*, que o denominamos de *MPSP tipo N4* amplamente distribuído entre as populações avaliadas, agrupadas próximas às espécies do grupo *N2* (Tabela 6 e Figura 3). As reconstruções filogenéticas usando os critérios da MV e IB produziram topologias semelhantes (Figura 3).

Os tipos genéticos de *T. orientalis* foram divididos em grupos bem definidos na árvore filogenética com a distância genética média entre eles de 0,213 (excluindo *outgroup*). Os cálculos de distância entre eles demonstraram a definição distinta com um valor mínimo de distância de 0,0805 entre os tipos 4 e 8. O tipo *N4* encontrado neste estudo teve a menor distância genética, 0,2339, com o tipo *N2* (Tabela 6).

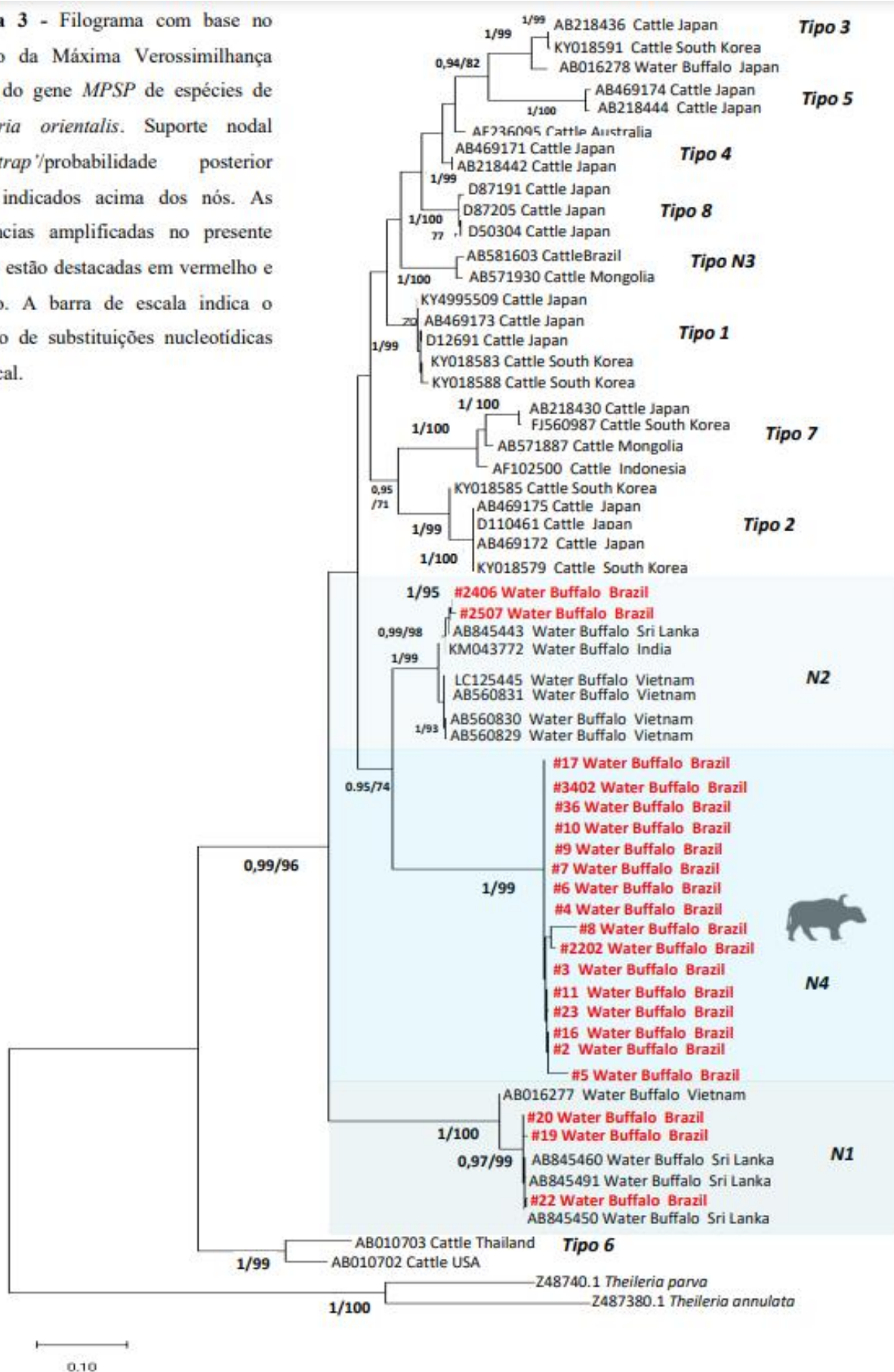
As sequências do tipo *N1* encontradas nesse estudo agruparam-se com sequências desse genótipo provenientes de búfalos de água do Sri Lanka. Houve a formação de um ramo contendo as duas sequências do genótipo *N2* do presente estudo e búfalos de água do Sri Lanka, Índia.

Tabela 6- Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências representativas do gene *MPSP* categorizadas em cada genótipo.

Grupos	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 4	Tipo 3	Tipo 5	Tipo 6	Tipo 7	Tipo 8	N 1	N 2	N 3	N4
Tipo 1	-											
Tipo 2	0,1617	-										
Tipo 4	0,1025	0,1664	-									
Tipo 3	0,1948	0,2533	0,1232	-								
Tipo 5	0,2091	0,2966	0,1623	0,1779	-							
Tipo 6	0,3729	0,3901	0,3918	0,4266	0,4047	-						
Tipo 7	0,1716	0,1765	0,1968	0,2595	0,2834	0,4035	-					
Tipo 8	0,1119	0,1727	0,0805	0,1736	0,1720	0,3769	0,2125	-				
N 1	0,2941	0,3288	0,3210	0,3659	0,4026	0,4752	0,3288	0,3421	-			
N2	0,1700	0,2081	0,1595	0,2741	0,3000	0,4102	0,2521	0,1989	0,3205	-		
N3	0,1174	0,1697	0,1151	0,2192	0,2379	0,4141	0,2335	0,1116	0,3227	0,1868	-	
N4	0,2369	0,2533	0,2492	0,2735	0,3266	0,4453	0,3041	0,2735	0,4185	0,2339	0,2873	-
Outgroup	0,9877	0,9783	1,0566	1,1310	1,0597	0,9897	1,1523	1,0434	1,1406	1,0842	1,0869	1,0197

As análises foram conduzidas utilizando o modelo *Maximum Composite Likelihood* +G.

Figura 3 - Filograma com base no critério da Máxima Verossimilhança (MV) do gene *MPSP* de espécies de *Theileria orientalis*. Suporte nodal 'bootstrap'/probabilidade posterior estão indicados acima dos nós. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em vermelho e negrito. A barra de escala indica o número de substituições nucleotídicas por local.



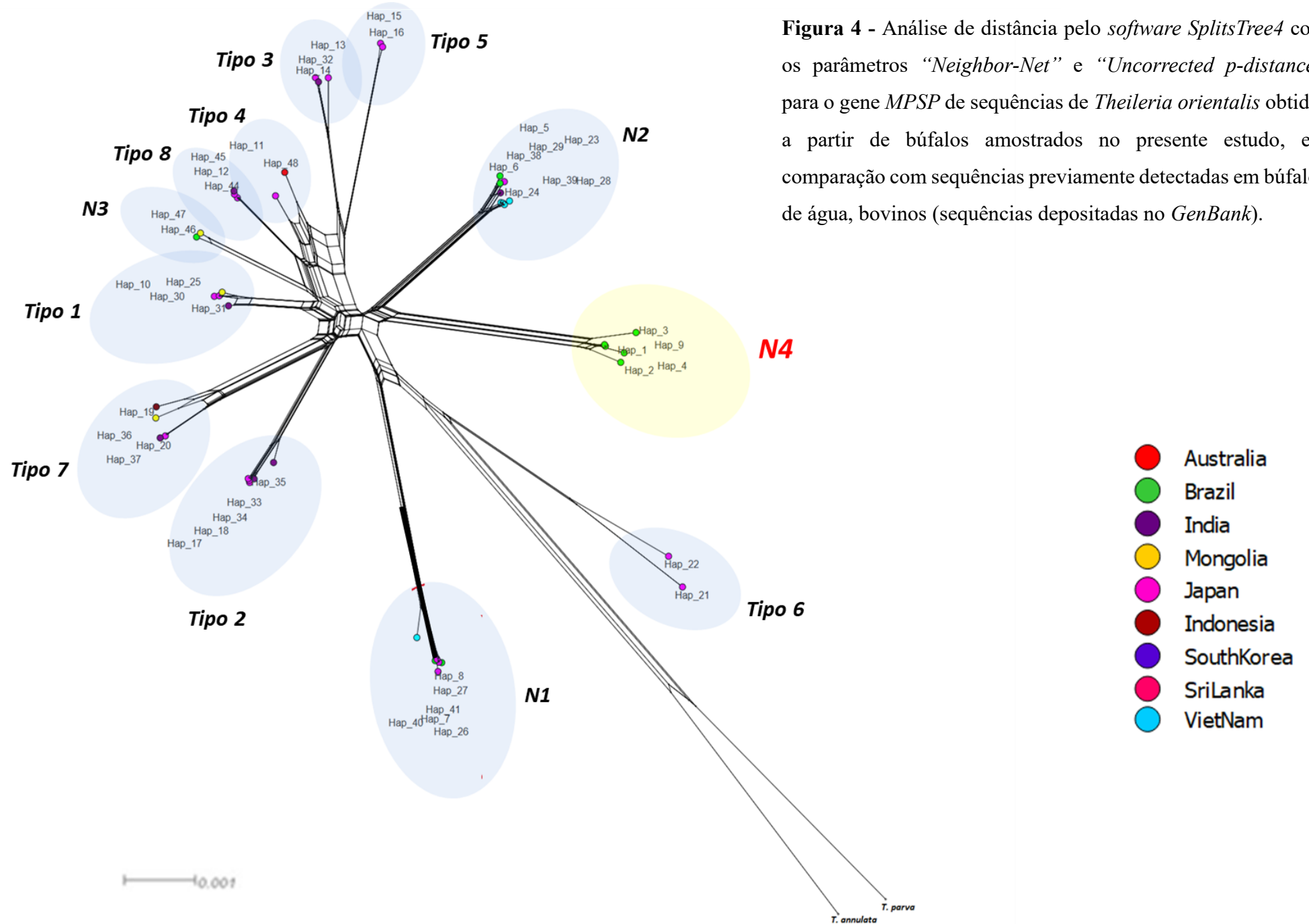
6.2.4.1 Diversidade de *T. orientalis*

Entre as 43 seqüências do gene *MPSP* analisadas (distribuídas em 11 locais diferentes), foram identificados 48 haplótipos mostrando um $\pi = 0,32414$, $DH = 0,928$ e $K = 36,75$. Todos os haplótipos identificados foram exclusivos de cada grupo (Figura 4-5). Ao analisar entre os grupos, observamos que o grupo *N4* apresentou cinco haplótipos, sendo que o haplótipo 1 foi o mais frequente, presente em dez amostras. Pela análise de distância com os parâmetros *Neighbor-Net* e *Uncorrected p-distance* observa-se que o grupo *N4* é mais próximo do grupo *N2*. O resultado da diversidade genética do gene *MPSP* pode ser visibilizado na Tabela 7.

Tabela 7 - Polimorfismo e diversidade genética de *Theileria orientalis* detectada em búfalos de água do estado do Pará.

Gene	Tamanho do fragmento (pb)	N	V	GC (%)	H	DH (MEAN $\pm$ DP)	π (MEAN $\pm$ DP)	K
<i>MPSP</i>	~776	43	375	41,7	48	0,928 $\pm$ 0,032	0,42447 $\pm$ 0,32414	36,75

N número de seqüências analisadas; **SV** número de sítios variáveis; **GC** conteúdo G + C; **H** número de haplótipos; **DH** diversidade de haplótipos; **DP** desvio padrão; **π** diversidade de nucleotídeos (por local = PI); **K** número médio de diferença de nucleotídeos.



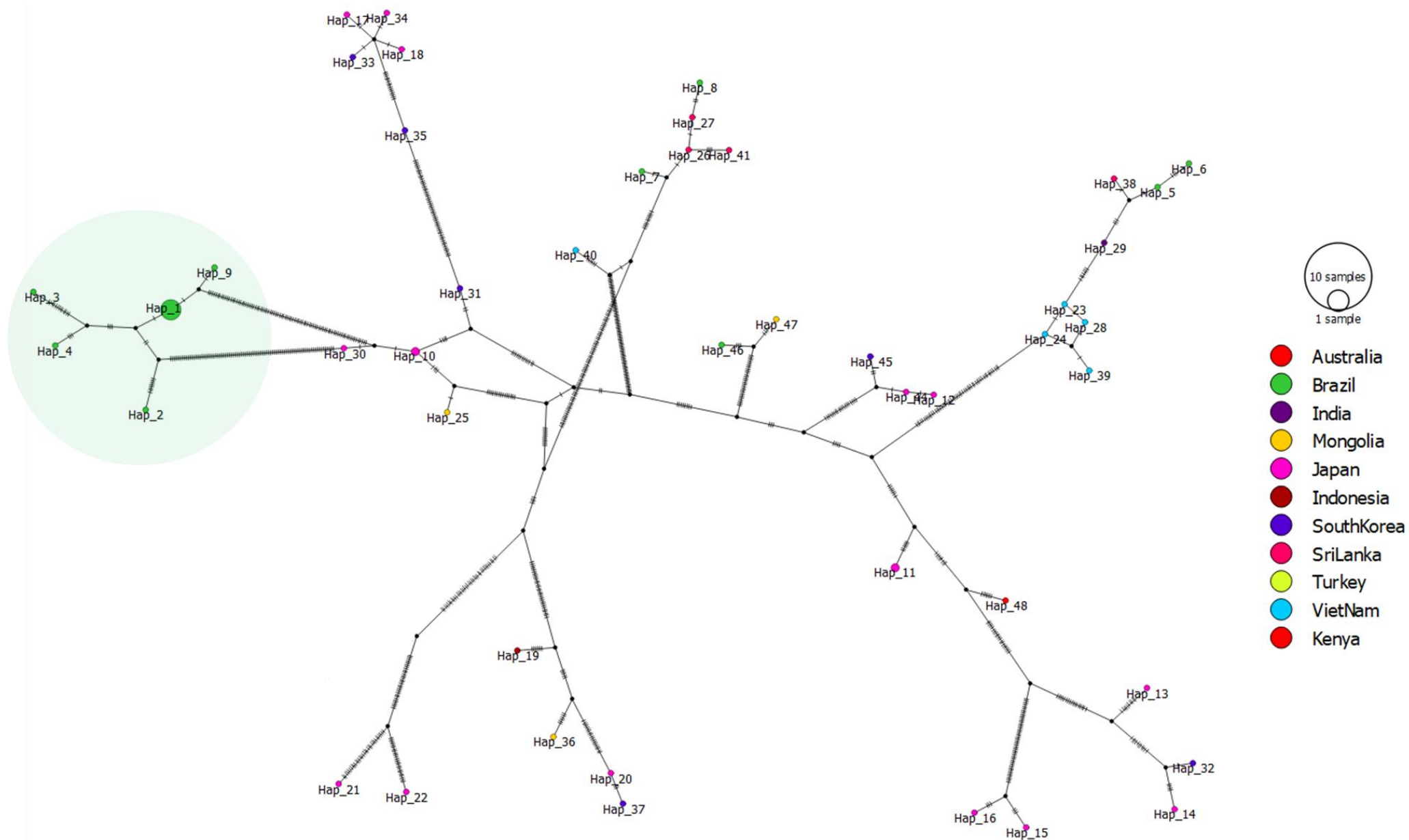


Figura 5 - Network dos haplótipos baseados no gene *MPSP* de *Theileria orientalis* de sequências detectadas em búfalos no Brasil e no mundo.

7. Estudo clínico-anatomopatológico de linfomas

Dos seis bubalinos estudados dois eram machos (Búfalos 01 e 03) e quatro eram fêmeas (Búfalas 02, 04, 05 e 06). Quatro pertenciam a raça Mediterrânea (Búfalos 01, 03, 05 e 06) e dois a raça Murrah (Búfalos 02 e 04), todos com idade acima de 10 anos. As búfalas 02 e 04 pertenciam a uma fazenda de exploração leiteira, localizada no município de Nova Timboteua e os bubalinos 01, 03, 05 e 06 a uma fazenda localizada no município de Castanhal, PA, destinada a biotécnicas reprodutivas.

O sinal clínico que mais chamou a atenção foi o emagrecimento progressivo (Figura 6A) em todos os animais que evoluiu para prostração na búfala 02. Porém, outros sinais clínicos foram observados como apatia, relutância a se movimentar, aumento dos linfonodos pré-escapular e pré-cural e abdômen distendido. O búfalo 01 durante a palpação retal evidenciou-se uma massa tumoral na entrada da cavidade pélvica do lado direito o que dificultava o animal defecar e urinar. No búfalo 03 os sinais clínicos apresentados estavam relacionados ao sistema nervoso central (medula). O animal apresentava dificuldade de se levantar quando estimulado. Em locomoção apresentava incoordenação caracterizada por arrastar das pinças, cruzamento dos membros posteriores com contato entre eles o que causava lesão da pele nas regiões posteriores. Evidenciou-se também diminuição da sensibilidade periférica a partir da nona vertebra torácica.

Os tumores tinham distribuição multicêntrica. Os sítios afetados incluíam serosa do rumen, retículo, intestino, fígado, vesícula biliar, peritônio, omento, diafragma, coração, pulmão, pleura parietal e visceral; baço, rim, útero (Quadro 1). No animal 02 e 03 foi evidenciada uma massa tumoral na medula espinhal.

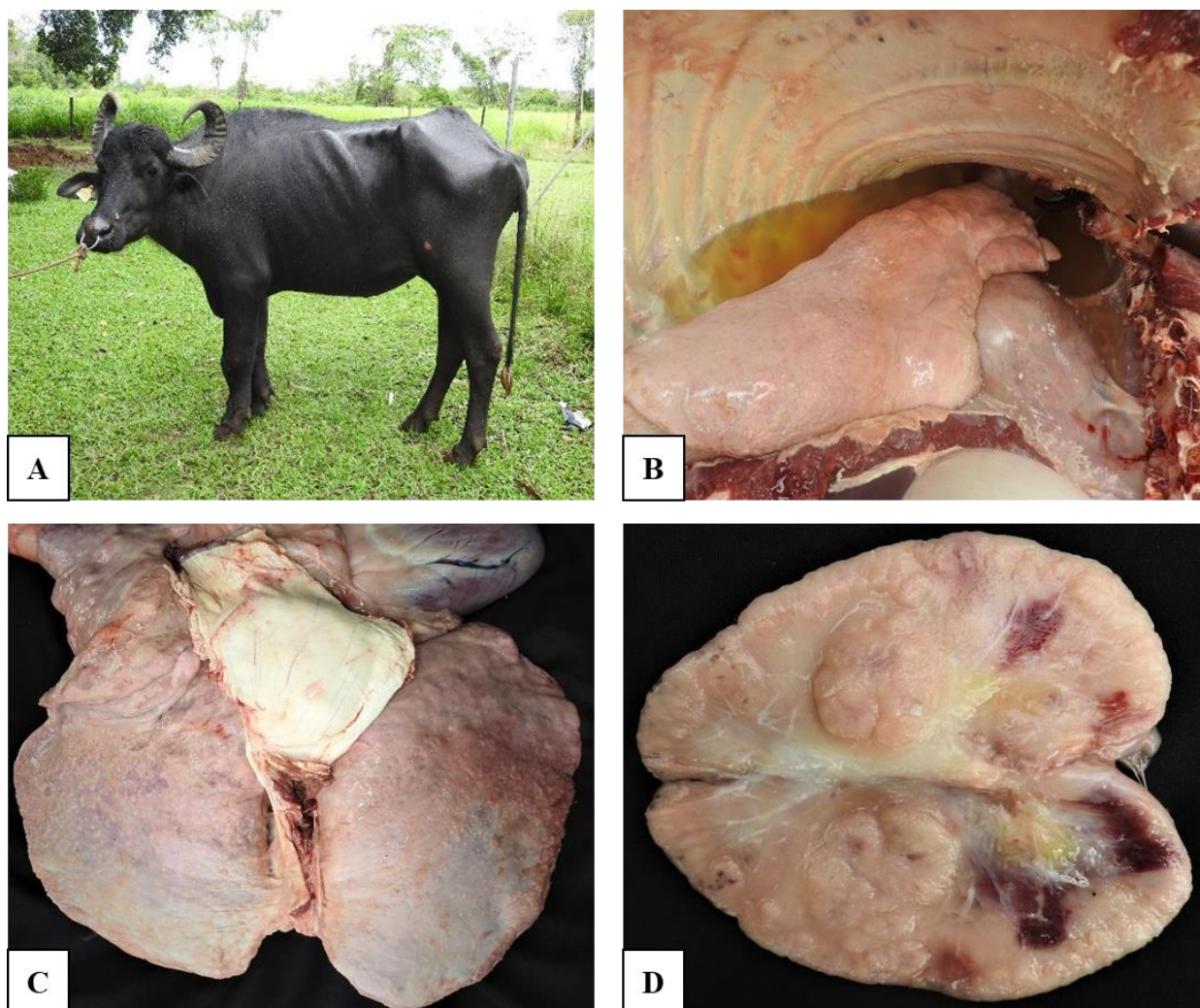
Nos achados macroscópicos os linfonodos mais acometidos foram íleo-femural, pré-escapular, mediastínico, mesentérico. Dentre as principais alterações observadas na macroscopia foram excesso de líquido na cavidade torácica (Figura 6B) presente em cinco animais (5/6;83,33%), presença de tumores no saco pericárdico (5/6;83,33%) pulmão (5/6;83,33%) (Figura 6C), rim (3/6;50%), omento (3/6;50%) e linfonodos (3/6;50%).

Os linfonodos afetados apresentavam-se aumentados de volume e com arquitetura substituída, com áreas de hemorragia e presença de tumor (Figura 6D).

No animal 04 observou-se um comprometimento acentuado do sistema digestivo como evidenciado na Figura 7 e cardiorrespiratório.

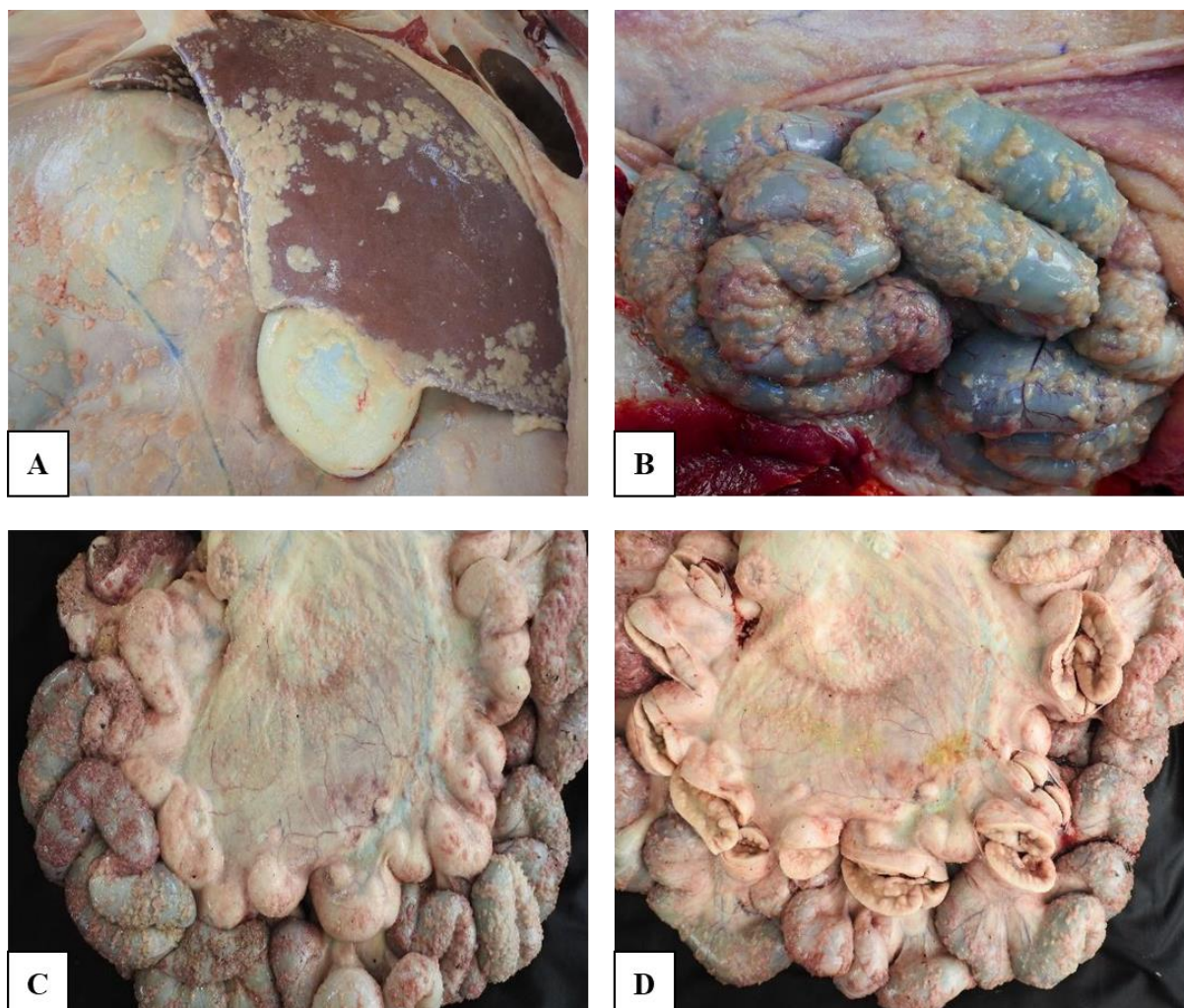
No quadro 1 encontra-se os dados referentes a raça, sexo, idade, datas das necropsias, localização das lesões observadas durante as necropsias.

Figura 6 – Linfoma em búfala da raça Mediterrânea, pertencente a propriedade A-PA, localizada em Castanhal, PA.



Búfala 05 **(A)** animal com estado nutricional ruim. **(B)** Aumento de líquido na cavidade torácica. **(C)** Massas tumorais multifocais no pulmão. **(D)** Superfície de corte de linfonodo, com áreas de hemorrágicas e massa tumoral.

Figura 7 – Linfoma em búfala da raça Murrah, pertencente a propriedade E-PA, localizada em Nova Timboteua, PA.



Búfala 04 **(A)** Massa tumoral na serosa do fígado, vesícula biliar e omento. **(B)** Massas tumorais na serosa do intestino delgado. **(C)** Aumento dos linfonodos mesentéricos e massas tumorais na serosa do intestino delgado. **(D)** Superfície de corte de linfonodo da figura anterior com parênquima destruído por massa tumoral.

Quadro 1- Resumo dos achados patológicos de seis casos de linfoma em búfalos de água de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região Amazônica, Brasil.

Caso clínico	01	02	03	04	05	06
Sexo	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Fêmea	Fêmea
Raça	Mediterrânea	Murrah	Mediterrânea	Murrah	Mediterrânea	Mediterrânea
Idade aproximada	11 anos	10 anos	11 anos	10 anos	10 anos	10 anos
Município	Castanhal	Nova Timboteua	Castanhal	Nova Timboteua	Castanhal	Castanhal
Procedência - Fazenda	A	E	A	E	A	A
Data da necropsia	02/08/2013	08/03/2020	01/06/2020	17/07/2020	27/11/2020	9/07/2021
Estado nutricional	Ruim	Ruim	Bom	Regular	Ruim	Ruim
Localização de massa tumoral de coloração esbranquiçada e de consistência firme						
Sistema digestivo						
Serosa do rúmen	++			+++		
Serosa do retículo				+++		
Serosa do omaso						
Mucosa do abomaso						
Serosa do intestino				+++	+	
Fígado				++	+	
Vesícula biliar				++		
Peritônio				+++		
Omento			+	+++	+	
Aumento de líquido na cavidade abdominal				+++		+++

Diafragma						++
	01	02	03	04	05	06
Sistema linfático						
Linfonodo parotídeo						
Linfonodo sub-mandibular						
Linfonodo pré-escapular			+			
Linfonodo pré-cural						
Linfonodo íleofemural	++					
Linfonodo mediastínico				+++		
Linfonodos mesentéricos				++		
Sistema Cardio-respiratório						
Coração	+++					
Saco pericárdico	++	+++	+	++	++	
Pulmão		++	++	++	+	
Pleura parietal			++		++	++
Pleura visceral		+	+			+
Baço				++		
Diafragma						++
Aumento de líquido na cavidade torácica		+++	+++	+++	++	++
Sistema reprodutor						
Útero				++	++	

(+) pouco acometido, (++) moderadamente acometido e (+++) muito acometido.

Dos seis casos avaliados, foi realizada análise histopatológica de fragmentos de tecidos de quatro animais (Caso 01, 02, 03 e 06). No Quadro 2 estão as descrições dos achados histopatológicos dos búfalos estudados.

Em casos de linfonodos, frequentemente a arquitetura do órgão ficava obliterada e não se observava distinção entre a cortical e a medular, substituída pelas massas neoplásicas, caracterizada pela proliferação de células redondas, discretamente pleomórficas. Foi evidenciado invasão vascular por células neoplásicas nas massas tumorais (Figura 8).

Nas análises histopatológicas do rim dos três animais avaliados, evidenciou-se proliferação neoplásica maligna de células redondas formando um manto denso, e ainda infiltrado histiocítico multifocal intersticial (Figura 9A).

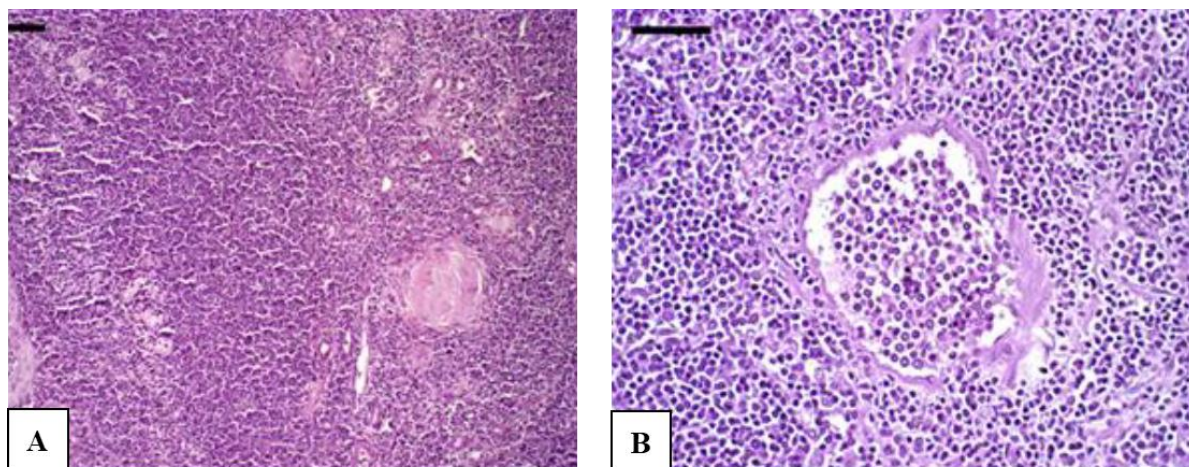
No animal 03 foi evidenciado na medula espinhal proliferação neoplásica maligna de células redondas formando um manto denso, circundando as fibras nervosas e adjacentes à meninge, com taxa mitótica moderada.

Proliferação neoplásica de células redondas, com distribuição multifocal pelo parênquima com infiltrado linfocítico multifocal associado a hepatócitos com vacuolização clara bem delimitada foram evidenciadas no fígado (Figura 9B).

Evidenciou-se no pulmão e pleura proliferação neoplásica de células redondas com distribuição difusa por todo o órgão e focos eventuais de infiltrado linfocítico discreto. Havia ainda leve deposição de material fibrilar eosinofílico multifocal (fibrina) (Figura 10).

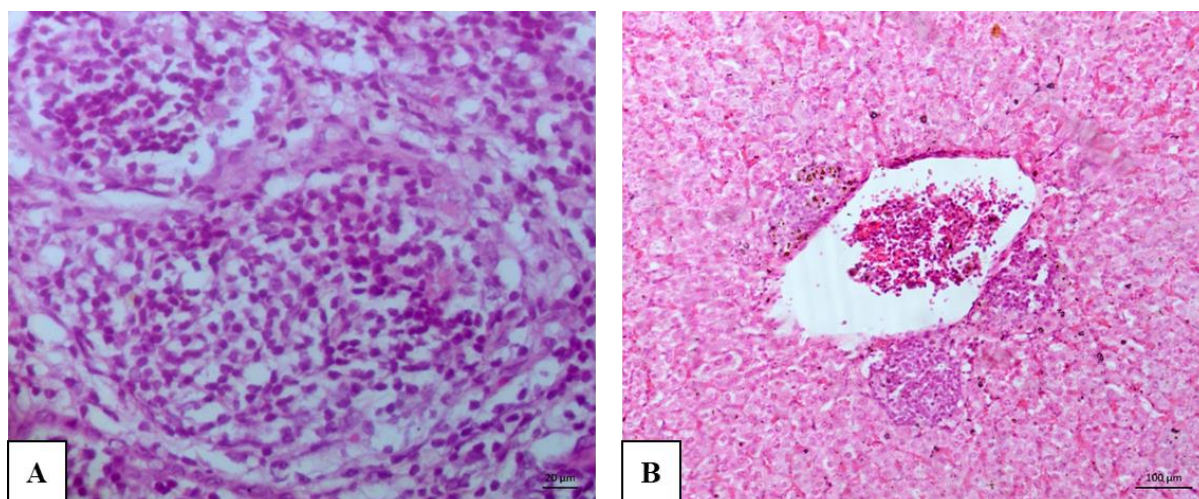
Foi verificado uma polisserosite linfocítica difusa acentuada na serosa, pulmão e coração no animal 06.

Figura 8 - Secção histológica de linfonodo.



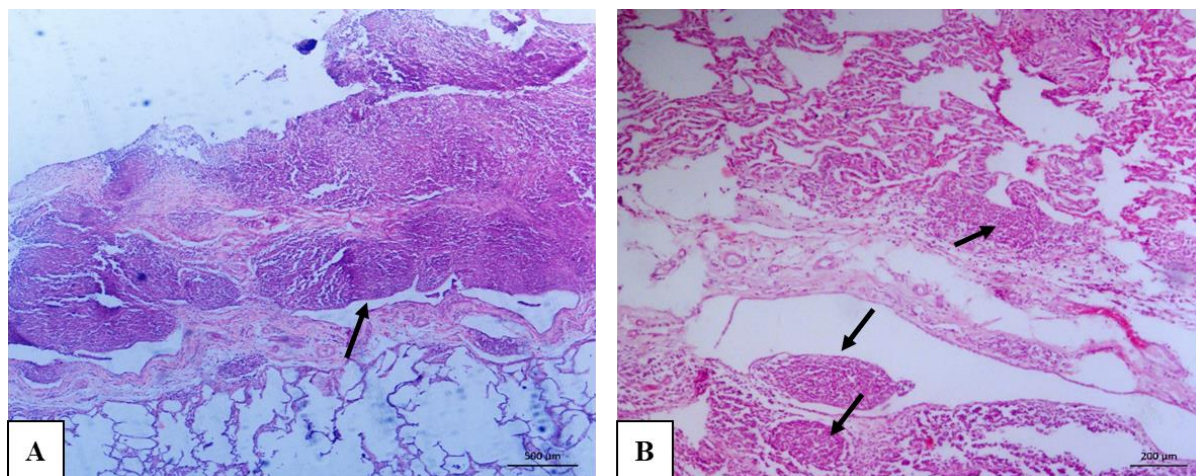
(A) Linfonodo apresentando linfócitos neoplásicos, com perda da arquitetura do órgão. HE, obj.25x. **(B)** Massa tumoral apresentando área de invasão vascular por células neoplásicas. HE, obj.25x.

Figura 9 – Secção histológica de rim e fígado.



(A) Rim: densa proliferação neoplásica de linfócitos no parênquima renal. Os linfócitos possuem núcleos redondos a ovais, hipercromáticos, nucléolos por vezes evidentes e citoplasma bem delimitado, escasso e basofílico. HE, obj. 40. **(B)** Fígado: proliferação de linfócitos neoplásicos multifocais, com distribuição predominantemente perivascular, formando discretas estruturas nodulares. HE, obj. 25.

Figura 10 – Seção histológica pulmão.



(A) Pleura: densa proliferação de linfócitos neoplásicos na pleura, dispostos em mantos sólidos delimitados por delicado estroma de tecido conjuntivo. HE, obj. 10. **(B)** Pulmão: múltiplos pequenos focos de proliferação neoplásica de linfócitos, com distribuição aleatória. HE, obj. 10.

Pela avaliação citológica das biópsias dos linfonodos pré-escapulares dos três animais avaliados (03, 05 e 06) não foi detectado nenhuma estrutura compatível com parasitos do gênero *Theileria*.

Quadro 2- Descrição dos achados histopatológicos dos quatros búfalos de água de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região Amazônica, Brasil.

Caso clínico	Dados histopatológicos
01	Descrição microscópica: a análise histopatológica dos nódulos e linfonodos revelou a presença de massa tumoral, caracterizada pela proliferação de células redondas, discretamente pleomórficas, com citoplasma escasso, núcleos grandes, ovoides, arredondados, basofílicos, por vezes com cromatina frouxa e nucléolos proeminentes, compatíveis com linfócitos. Havia a presença de delicado tecido fibrovascular entremeando o processo neoplásico. Observaram-se áreas eosinofílicas com células em cariólise e cariorrexe, caracterizando necrose de coagulação. A arquitetura normal dos linfonodos estava completa ou parcialmente substituída pelas massas neoplásicas. Também foi observada invasão vascular por células neoplásicas nas massas tumorais.
02	Descrição microscópica: Observa-se proliferação neoplásica maligna de células redondas, distribuídas ao redor do nervo e, por vezes, infiltrando-o. As células apresentam moderado pleomorfismo, com formato redondo a oval, núcleo grande redondo a oval com cromatina densa e basofílica, citoplasma escasso e eosinofílico e nucleolo por vezes evidentes. A taxa mitótica é moderada, com figuras típicas. Há ainda leve quantidade de material fibrilar eosinofílico (fibrina) e material amorfo homogêneo eosinofílico multifocal leve (edema). No fígado observou-se células tumorais no interior dos vasos, com distribuição multifocal (êmbolos neoplásicos), infiltrado linfohistiocítico multifocal associado a hepatócitos com vacuolização clara bem delimitada citoplasmática leve (degeneração vacuolar). No pulmão evidenciou-se proliferação neoplásica de células redondas semelhantes à anterior, com distribuição aleatória. Havia ainda leve deposição de material fibrilar eosinofílico multifocal (fibrina). O rim apresentava leve infiltrado histiocítico multifocal no córtex, moderada quantidade de material fibrilar eosinofílico no endotélio

vascular multifocal. No linfonodo observou-se células redondas tumorais, entremeadas por leve quantidade de neutrófilos e células gigantes. O baço apresentava leve quantidade de pigmento marrom no interior de macrófagos (hemossiderose).

03

Descrição microscópica: Na medula espinhal observou-se proliferação neoplásica maligna de células redondas formando um manto denso, circundando as fibras nervosas e adjacentes à meninge. As células apresentam moderado pleomorfismo, com formato redondo a oval, núcleo grande redondo a oval com cromatina densa e basofílica, citoplasma escasso e eosinofílico e nucléolo por vezes evidentes. A taxa mitótica é moderada, com figuras típicas. Havia ainda leve quantidade de material fibrilar eosinofílico (fibrina) e material amorfo homogêneo eosinofílico multifocal leve (edema). No rim evidenciou-se proliferação neoplásica maligna de células redondas semelhantes às observadas na medula espinhal, e ainda leve infiltrado histiocítico multifocal intersticial. No baço observou-se moderada diminuição dos sinusoides preenchidos por hemácias (depleção polpa vermelha).

06

Descrição microscópica: Na serosa observou-se proliferação acentuada de células mesoteliais formando projeções papiliformes, entremeadas por acentuada quantidade de infiltrado mononuclear, predominantemente linfocítico, por vezes formando eventuais estruturas foliculares distribuídas multifocalmente no tecido, em associação a pequena quantidade de material fibrilar eosinofílico (fibrina). No pulmão evidenciou-se na pleura proliferação semelhante à descrita na serosa, com distribuição difusa por todo o órgão. Há ainda eventuais focos com infiltrado linfocítico discreto. No epicárdio, observa-se pequena quantidade de folículos multifocais, formados por discreto infiltrado linfocítico. No fígado observou-se proliferação neoplásica de células redondas, formando discretas estruturas nodulares com distribuição multifocal pelo parênquima. As células apresentam moderado pleomorfismo, com formato redondo a oval, citoplasma escasso, núcleo redondo a oval com cromatina frouxa, nucléolo inconspícuo. Foram observadas 2 figuras de mitose em 10 campos de maior aumento (Obj. 40). No rim foram evidenciados

discretos focos de proliferação de células neoplásicas redondas, semelhantes às descritas no fígado, com distribuição predominantemente perivascular. Pele - seção histológica contendo epiderme e derme. Na epiderme, observa-se proliferação de queratinócitos, formando projeções irregulares, com moderado aumento do número de grânulos de queratohialina nas células da camada granulosa (hipergranulose). Intestinos, baço e pré-estômagos sem alterações microscópicas significativas.

7.1 Estudo etiológico dos linfomas

Todas as amostras de DNA de sangue, linfa e dos tecidos quando submetidas a amplificações para avaliar a eficácia da extração de DNA pela detecção do gene *GAPDH*, o produto da amplificação deste gene resultou em uma única banda em gel de agarose, correspondente a um fragmento de 709 pb, como descritos por Pinheiro de Oliveira et al., (2013).

Quando submetidos as reações de amplificações para detecção de DNA de parasitos do gênero *Theileria*, dirigidos ao gene *18S rRNA*, *ITS* e *MPSP* de *T. orientalis*, fragmento de tumor congelado e de tecidos parafinados dos órgãos fígado, rins, baço, linfonodo, testículos e fragmento tumoral do animal 01, os fragmentos das massas tumorais (animal 06), amostras sanguíneas dos seis animais, linfa dos linfonodos pré-escapulares de três bubalinos (3, 5 e 6) e fragmentos de linfonodos frescos de todos os animais foram positivas (100%) (Tabela 8).

Quando as amostras positivas foram submetidas a novas amplificações de DNA dirigidas ao gene *MPSP* visando sequenciamento nucleotídico, seguidos de purificação dos produtos amplificados, estes mostraram bandas de fraca intensidade, impossibilitando o sequenciamento desses fragmentos. Assim, com base na intensidade de bandas obtidas na eletroforese em gel de agarose, apenas 57,14% (12/21) *amplicons* obtidos de sangue (4/6), linfonodo (4/5), linfoma (2/2) linfa (1/3) e baço (1/1) foram submetidos ao sequenciamento pelo método de *Sanger*.

A análise das 12 sequências do gene *MPSP* (~749 pb) quando submetidas ao *BLASTn* mostrou identidade variando de 84 a 100% com outras sequências de *T. orientalis* detectadas em búfalos de água na Índia e no Vietnam (KM043772, AB560831, LC125445) e *E-value* de 0. A cobertura das sequências analisadas variou de 97% a 100%.

As sequências do gene *MPSP* de isolados de *T. orientalis* derivados de búfalos de água (12) foram filogeneticamente analisados para identificar os genótipos de *T. orientalis* circulantes nos animais. Foram identificados os genótipos *N2* e *N4* nessas amostras. A identificação de cada amostra e seu respectivo genótipo estão na tabela 9 e figura 11.

As reconstruções filogenéticas geradas pelo método MV e NJ mostraram o agrupamento das sequências do genótipo *N4* identificadas nas amostras de tecidos com as sequências do mesmo genótipo oriundas das amostras sanguíneas identificadas anteriormente neste estudo. Os ramos foram bem suportados com altos valores de probabilidade posterior e de *bootstrap*. As demais sequências obtidas agruparam-se às espécies do grupo *N2* (Figura 11). As

reconstruções filogenéticas usando os critérios da MV e NJ produziram topologias semelhantes, assim iremos apresentar somente a NJ (Figura 11).

Não foi detectado DNA dos vírus BLV, BoHV-6 e BIV, bem como dos hemopatógenos, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., hemoplasmas (*Mycoplasma* spp., ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ e *M. weyonii*), tripanosomatídeos (*Trypanosoma vivax*, *T. evansi*), *Babesia* spp., nas amostras dos fragmentos de massa tumoral, sangue, linfa dos animais avaliados.

Tabela 8 - Detecção de *Theileria orientalis* em fragmentos de tecidos, linfa e sangue de bubalinos submetidos a necropsia, provenientes de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região Amazônica, Brasil.

ID animal	Amostra	Nested PCR/cPCR		
		<i>Theileria</i> spp.	<i>Theileria orientalis</i>	
		18S rRNA	ITS	MPSP
01	fragmento de tumor (congelado)	+	+	+
	fragmento de tumor (parafina)	+	+	+
	fígado	+	+	+
	rins	+	+	+
	baço	+	+	+
	testículos	+	+	+
	linfonodos	+	+	+
	sangue	+	+	+
02	sangue	+	+	+
03	linfa	+	+	+
	linfonodo	+	+	+
	sangue	+	+	+
04	linfonodo	+	+	+
	sangue	+	+	+
05	linfa	+	+	+
	linfonodo	+	+	+
	sangue	+	+	+
06	fragmento de tumor	+	+	+
	Linfa	+	+	+
	linfonodo	+	+	+
	sangue	+	+	+

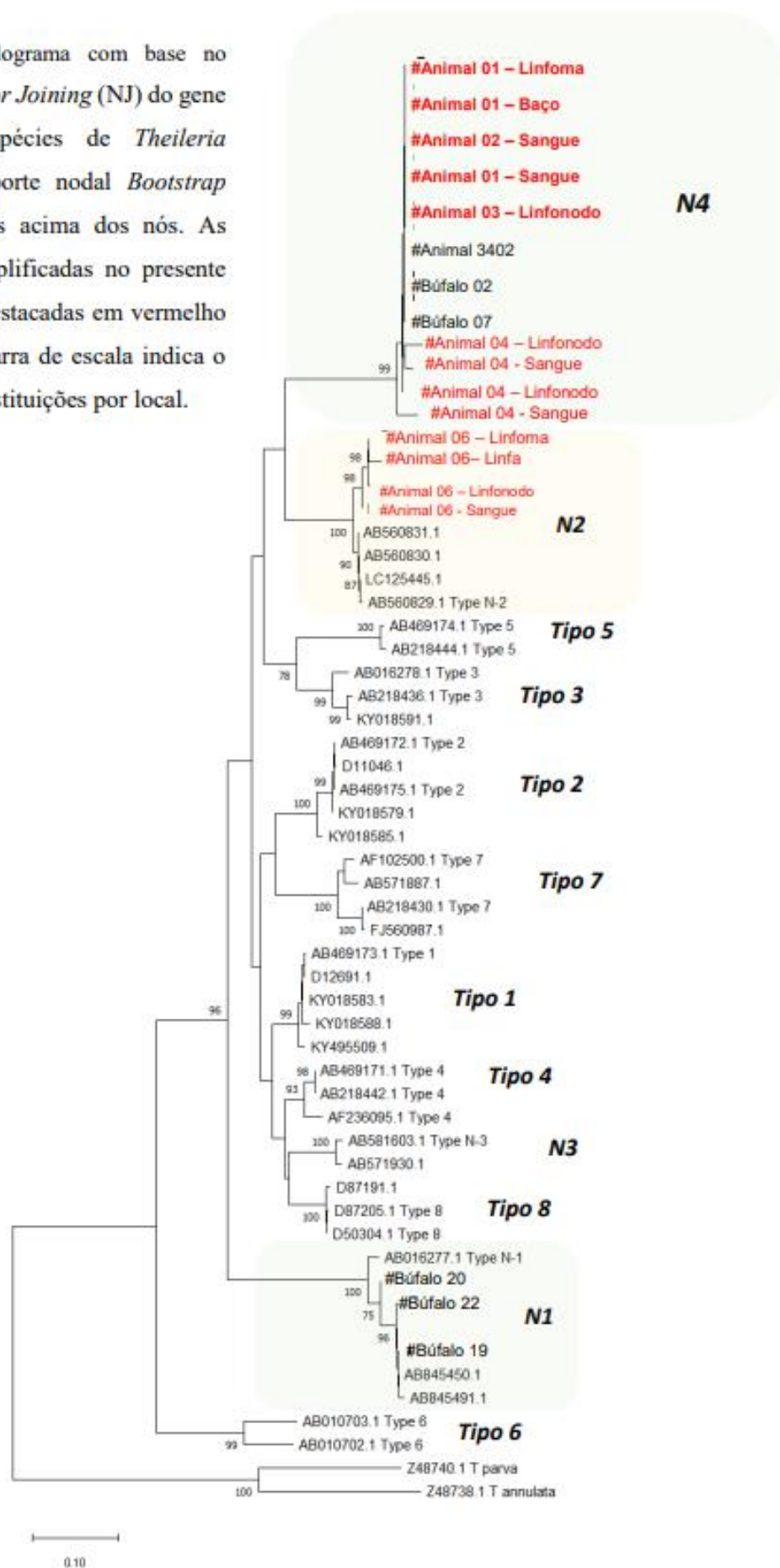
ID identificação; PCR Reação em Cadeia da Polimerase; + positivo.

Tabela 9 - Genótipos de *Theileria orientalis* baseados no gene *MPSP* em fragmentos de tecidos, linfa e sangue de bubalinos submetidos a necropsia, provenientes de duas propriedades localizadas no estado do Pará, região Amazônica, Brasil.

ID animal	Amostra	<i>Theileria orientalis</i>	
		<i>MPSP</i>	Genótipo
01	fragmento de tumor (congelado)	+	N4
	fragmento de tumor (parafina)	+	
	fígado	+	
	rins	+	
	baço	+	N4
	testículos	+	
	linfonodos	+	
	sangue	+	
02	sangue	+	N4
03	linfa	+	N4
	linfonodo	+	
	sangue	+	
04	linfonodo	+	N4
	sangue	+	N4
05	linfa	+	N2
	linfonodo	+	
	sangue	+	
06	fragmento de tumor	+	N2
	Linfa	+	N2
	linfonodo	+	N2
	sangue	+	N2

ID identificação; PCR Reação em Cadeia da Polimerase; + positivo.

Figura 11- Filograma com base no critério *Neighbor Joining* (NJ) do gene *MPSP* de espécies de *Theileria orientalis*. Suporte nodal *Bootstrap* estão indicados acima dos nós. As sequências amplificadas no presente estudo estão destacadas em vermelho e negrito. A barra de escala indica o número de substituições por local.



DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

Este estudo mostrou, pela primeira vez, a caracterização molecular de espécies de *T. orientalis* com base no gene *MPSP* em búfalos do Brasil. O gene *MPSP* tem sido reconhecido como um marcador molecular epidemiológico para a compreensão da diversidade genética de *T. orientalis* (Kawazu et al., 1992; Kakuda et al., 1998; Sarataphan et al., 1999; KO et al., 2008; Ota et al., 2009). Os múltiplos alinhamentos de genes *MPSP* derivados de diferentes isolados indicam a presença de vários grupos com diferentes caracteres antigênicos e, portanto, os pesquisadores os descreveram como genótipos diferentes (Kim et al., 2004; Jeong et al., 2010; Yokoyama et al., 2011). Anteriormente, a identificação de genótipos de *T. orientalis* baseava-se nas localizações geográficas dos isolados. No entanto, estudos posteriores comprovaram a falta de relação entre os genótipos e as origens dos isolados (Jeong et al., 2010). Portanto, seria mais adequado adotar o método de classificação numérica proposto por Kim et al. (1998), assim, no presente estudo nós adotamos a classificação numérica para nomeação dos genótipos.

Inicialmente, havia seis genótipos (*Tipos 1-6*) de *T. orientalis* (Kim et al., 1998) e, posteriormente, em 2010, dois novos genótipos foram identificados (*Tipos 7 e 8*) (Jeong et al., 2010). Posteriormente, três novos genótipos foram identificados na Tailândia e Vietnam (*Tipos N1, N2 e N3*), com base na filogenia com sequências de genes *MPSP* relatadas anteriormente (Khukhuu et al., 2011). O presente estudo revelou a presença de três genótipos (*N1, N2 e N4*) na população de bubalinos do estado do Pará, incluindo o novo genótipo aqui identificado nomeado tipo *N4*.

Na população avaliada, nós observamos que o tipo *N4* foi o genótipo mais dominante, presente em quatro das cinco propriedades estudadas. Duas das propriedades que identificaram esse genótipo apresentavam histórico de linfomas no rebanho. O genótipo *N1* demonstram uma especificidade por ovinos, são poucos os estudos descrevendo esse genótipo em búfalos (Khukhuu et al., 2011), aqui esse genótipo esteve presente em três propriedades. A presença de mais de um genótipo nos rebanhos analisados pode estar relacionada ao manejo desses animais, visto o compartilhamento de instalações, pastos com a fauna nativa (espécies silvestres) com outras espécies de produção, como equídeos, caprinos, ovinos, bovídeos.

Pelas análises dos haplótipos da população de *T. orientalis* analisada neste estudo, verificamos que não há compartilhamento de haplótipos entre as populações de parasitos, entretanto, há uma diversidade haplotípica dentro dos grupos, como verificado no novo genótipo aqui identificado. As sequências de genes *MPSP* compartilham identidades baixas entre os genótipos (Khukhuu et al., 2011), todavia as identidades de sequências dentro de cada

clado são altas (Kim et al., 1998; Altarangel et al., 2011a). Consequentemente, a recombinação entre os diferentes tipos de genótipos *MPSP* parece improvável. Acredita-se que o acúmulo contínuo de mutações pontuais nos genótipos *MPSP* poderia eventualmente levar a formação de um novo alelo (Altangerel et al., 2011a).

Os genótipos *chitose* e *ikedda* são considerados mais patogênicos e normalmente estão associados aos casos de teileriose oriental (Eamens et al., 2013a; Sivakumar et al., 2014a; Kakati et al., 2015; Lawrence et al., 2018; Gebrekidan et al., 2020), no entanto, no presente estudo nós verificamos a presença do genótipo *N2* e *N4* presente em fragmentos de tecidos tumorais, o que levanta a hipótese de que esses genótipos possam ser mais virulentos na população avaliada.

Os meios para discriminar formas benignas e virulentas, bem como espécies responsáveis por surtos de doenças, estão se tornando cada vez mais importantes, tanto para fins diagnósticos quanto epidemiológicos. Na última década houve um aumento na descoberta de novas espécies de *Theileria* e a percepção de que os animais domésticos podem abrigar uma extensa variedade de infecções mistas (Criado-Fornelio et al., 2004; Mans et al., 2011ab; Sivakumar et al., 2014a). Isso é agravado por infecções mistas de *Theileria* em hospedeiros mamíferos e carrapatos vetores, onde a vida selvagem e os bovídeos compartilham o mesmo *habitat* e espécies comuns de carrapatos (Lawrence et al., 1983; Kariuki et al., 2012). Nesse estudo não avaliamos a presença de infecções mistas pelo uso de marcadores moleculares, no entanto, podemos observar a presença de mais de um genótipo presente nas propriedades avaliadas, o que confirma a diversidade de *T. orientalis*.

Não verificamos estruturas compatíveis com parasitos dos gêneros *Babesia* e/ou *Theileria* nas análises dos esfregaços sanguíneos dos animais. Em bovinos infectados, mas não afetados clinicamente, a invasão de eritrócitos pode ser muito baixa (0,02 a 0,03%). A infecção eritrocítica geralmente está associada a casos graves de anemia (0,5 a 30% parasitemia) com sinais clínicos relacionados (Kamio et al., 1990; Shimizu et al., 1992; Stockham et al., 2000; Izzo et al., 2010; McFadden et al., 2011) e os valores de hematócrito podem variar de normais a 8% (Irwin, 2013).

Casos de linfomas em búfalos são escassos. Até a década de 1980 esses casos estavam restritos a Índia (Bhattacharya, 1967; Singh, 1968; Singh et al., 1973; Gupta et al., 1977; Singh et al., 1979; Singh et al., 1980). Caracterizados pelo desenvolvimento de linfoma multicêntrico, com localização nodal ou extra nodal (Oliveira et al., 2016b).

Nesse estudo incluímos seis casos de linfomas de animais pertencentes a duas propriedades (A-PA e E-PA), no entanto, o rebanho de ambas possuem a mesma origem, a propriedade A localizada no município de Castanhal-PA. Na fazenda A Oliveira et al. (2016b) avaliaram por mais de dez anos casos de doença linfoproliferativa caracterizada pela linfocitose nos animais, cuja etiologia é desconhecida, caracterizando o primeiro registro de linfomas multicêntricos em búfalos no Brasil. Nossos achados corroboram com os de Grimshaw et al. (1979) e Oliveira et al. (2016b) caracterizando como uma doença crônica, observada em animais mais velhos.

Dentre os principais achados clínicos observados nos animais deste estudo são emagrecimento progressivo, também reportados por Vale-Echeto et al. (2009) e Monger et al. (2016) em búfalas. Foi observado nesse estudo o comprometimento de diversos órgãos e sistemas o que comprovam o caráter multicêntrico da enfermidade, fato também observado no estudo anterior realizado nesse rebanho e por outros autores na Índia e Venezuela (Singh et al., 1979; Vale-Echeto et al., 2009; Chand et al., 2012; Kumar et al., 2012; Oliveira et al., 2016b).

Na necropsia, verificou-se múltiplas lesões nodulares com linfadenomegalia generalizada, em que os linfonodos apresentaram aspecto homogêneo, sem definição cortico-medular, de coloração esbranquiçada também verificado por Oliveira et al. (2016b) e Monger et al. (2016). Em bovinos os órgãos mais afetados são os linfonodos e segundo Panziera et al. (2014) os mais acometidos são mesentéricos, mediastínicos, pré-escapulares, ilíacos internos, inguinais superficiais e traqueobrônquicos. No presente estudo, a linfadenomegalia tumoral foi verificada na maioria dos casos citados, exceto traqueobrônquicos, ele foi verificado por Monger et al. (2016) em uma búfala.

Outros órgãos envolvidos na forma multicêntrica em bovinos incluem coração, abomaso, rim, intestinos, tecidos retrobulbares do olho, útero, tecidos epidurais da medula espinhal e, raramente, o cérebro (Figuera; Barros, 2004). Neste estudo, observamos o comprometimento desses órgãos, exceto tecidos oculares e cerebrais. Das alterações cardíacas, foi verificado aumento de líquido na cavidade torácica, linfomas aderidos ao epicárdio, aumento de líquido seroso no pericárdio e no revestimento parietal, semelhante ao observado por Monger et al. (2016).

As lesões histológicas são semelhantes às observadas por outros autores (Bhattacharya, 1967; Singh, 1968; Singh et al., 1973; Gupta et al., 1977; Singh et al., 1979; Singh et al., 1980; Vale-Echeto et al., 2009; Chand et al., 2012; Kumar et al., 2012; Oliveira et al., 2016b). Nesse estudo nós observamos no animal 01, uma grande quantidade de linfócitos e poucas células em

mitose, no entanto, nos animais 02, 03 e 06 foram observadas várias figuras de mitose na histopatologia dos nódulos tumorais, semelhantemente como verificado por Singh et al. (1979) na Índia, ao avaliarem 283 casos de linfomas em búfalos de abatedouros. Nos achados de histopatologia, os linfonodos afetados apresentaram proliferação de células linfóides, principalmente linfoblastos e/ou linfócitos, substituindo a arquitetura normal do órgão, resultando em completa desorganização. Singh et al. (1973) verificaram massas tumorais em pulmões de búfalos, também na Índia, com infiltrado de células neoplásicas apresentando várias figuras de mitose. Microscopicamente, as lesões foram caracterizadas por inúmeros agregados linfo-foliculares formados por linfoblastos e linfócitos, substituindo a estrutura alveolar normal dos pulmões. Vale-Echeto et al. (2009), na Venezuela descreveram linfossarcoma em uma búfala, com células linfóides pleomórficas apresentando citoplasma escasso, núcleos hipercromáticos e elevado índice mitótico, além da presença de células gigantes multinucleadas e necrose. Entretanto, Monger et al. (2016) descreveram um linfoma linfocítico difuso de células pequenas clivadas, os quais observaram a presença de infiltração neoplásica difusa, com linfócitos morfológicamente anisocitóticos e baixo índice mitótico.

Foi verificado uma polisserosite linfocítica difusa acentuada na serosa, pulmão e coração do animal 06. A polisserosite linfocítica é relatada em bubalinos na forma de espessamento focal ou disseminado nas serosas, e microscopicamente contendo projeções papiliformes compostas por infiltrado predominantemente linfocítico, eventualmente formando estruturas foliculares, em associação com células mesoteliais hiperplásicas ou metaplásicas (Teixeira et al., 2018).

Theileria orientalis foi anteriormente considerada como um parasito benigno (Shastri et al., 1985; Shastri et al., 1988), mas Levine (1985) observou que algumas cepas deste parasito podem resultar em doenças com sintomas semelhantes à Febre da Costa Leste. Há relatos recentes revelando a ocorrência de doenças fatais em bovinos em países como Austrália e Nova Zelândia (Izzo et al., 2010; Aparna et al., 2011; McFadden et al., 2011).

Os achados de necropsia como úlceras no abomaso, aumento do baço, edema pulmonar, hemorragia no coração e intestino correlacionaram-se com as doenças de hemoprotozoários devido a *Theileria* ou *Babesia* (Sastry, 1983). No entanto, Izzo et al. (2010) descreveram no exame *post mortem* fígado de coloração ocre que estava grosseiramente aumentado, com bordas arredondadas e o restante da carcaça tinha aparência ictérica. A histopatologia do fígado mostrou extensa necrose coagulativa periacinar subaguda dos hepatócitos, aumento do número de hemácias nucleadas, canalículos e pequenos ductos biliares preenchidos com pigmento biliar

e evidência de hepatócitos vacuolados sem evidência de megalocitose em infecções por *T. orientalis* em bovinos em Nova Gales do Sul, Austrália.

Durante 2005-2006, mais de 15 casos de morte de bovinos adultos com idade superior a três anos foram observados no Sul da Índia ocasionados por *T. orientalis*. As lesões *post mortem* incluíram, aumento do baço, edema pulmonar, exsudatos espumosos na traquéia, hemorragia equimótica endocárdica e endocárdica difusa e duodenite hemorrágica grave. A mucosa do abomaso apresentava úlceras patognomônicas “perfuradas”. Microscopicamente, o fígado apresentava dilatação sinusoidal periportal, área focal de necrose, alterações gordurosas moderadas e proliferação de linfócitos sobre a tríade portal e corpos apoptóticos nos hepatócitos. Hemossiderose, proliferação de células linfáticas e depleção de linfócitos em algumas áreas da polpa branca foram marcadas no baço. Presença de material róseo entre os espaços interalveolares, proliferação de células septais e espessamento dos septos interalveolares foram observados no pulmão. O coração revelou extravasamentos de eritrócitos no endocárdio, perda de estrias cruzadas no miocárdio e infiltração de células mononucleares. Perda moderada a grave do epitélio da mucosa com descamação e necrose do tecido da mucosa e submucosa foram observadas no abomaso. O intestino delgado apresentou necrose do revestimento epitelial das vilosidades, infiltração de células mononucleares, capilares ingurgitados e extravasamento de eritrócitos (Aparna et al., 2011).

McFadden et al. (2011) na Nova Zelândia avaliaram duas vacas com seis e oito anos de idade, ambas com anemia grave e pela análise das lâminas de esfregaços sanguíneos com infecção por parasitos do gênero *Theileria*. Esses animais vieram a óbito de forma aguda. As alterações histológicas mais notáveis nas amostras destes animais incluíram hemossiderose hepática, nodal e esplênica e hematopoiese extramedular afetando o fígado e o baço. No intestino, a lâmina própria continha muitos eosinófilos e era mais densamente povoada por linfóides e plasmócitos do que o esperado. As alterações foram consistentes com anemia hemolítica e hematopoiese extramedular. As lesões intestinais eram indicativas de uma gastroenterite parasitária leve.

Na literatura a única descrição de *T. orientalis* causando doença em búfalos de água ocorreu na Índia. Sinodukumar et al. (2016) descrevem um surto de teileriose oriental fatal em quinze búfalos leiteiros submetidos ao transporte, os quais desenvolveram teileriose oriental dentro de dois meses da sua obtenção. Exames *post-mortem* seguidos de uma avaliação detalhada das alterações histopatológicas foram realizados em sete animais que progrediram ao óbito. Nos achados macroscópicos e microscópicos, foram observadas petéquias e equimoses

dos órgãos vitais e da musculatura subcutânea consideradas as lesões primárias. Derrames torácicos e peritoneais, miopatia cardíaca, hidropericárdio, enfisema pulmonar, congestão multilobular e consolidação pulmonar foram observadas em cinco animais. Múltiplos focos nodulares brancos eram evidentes predominantemente nos rins, como evidenciado no presente estudo. Infiltração linfocítica difusa de órgãos vitais, depleção linfóide e edema em linfonodos foram observados em cortes de tecidos de todos os sete animais. Hepatocitólise moderada e hemossiderose juntamente com linfangiectasia foram evidentes no fígado. Acometimento extenso dos rins também se manifestou como necrose tubular, hialinização e glomerulite em todos esses casos.

Nesse estudo, embora acreditemos que possa ter uma possível associação de *T. orientalis* com os linfomas, o que sabemos é que há inúmeras lacunas no que se refere ao diagnóstico. Importante destacar que os animais avaliados já apresentavam idade avançada, o que pode ter contribuído para o aparecimento dos linfomas. Como visto nos parágrafos antecedentes, há escassez na literatura de descrições de achados macroscópicos de lesões associadas a infecção por *T. orientalis*, principalmente em búfalos de água, e o que podemos observar é que tais achados não são patognomônicos.

A infecção por espécies benignas de *Theileria* não transformadoras é geralmente caracterizada pela falta de desenvolvimento de esquizontes em leucócitos e pela ausência de linfoproliferação fatal. Na literatura ocorrência de *T. buffeli*, *T. orientalis* ou *T. sergenti* pode ser facilmente ignorada pelo fato de causarem infecções predominantemente subclínicas em áreas endêmicas. Esta tem se tornando cada vez mais evidente, visto que esse parasito tem uma distribuição mundial. Não foi detectado neste estudo pela avaliação citológica da biópsia dos linfonodos nenhuma estrutura compatível com parasitos do gênero *Theileria* nos três animais avaliados. Estágios de esquizontes, macroesquizontes e microesquizontes foram detectados em bovinos na Austrália, Korea, contudo esses achados foram verificados em animais infectados experimentalmente (Uilenberg et al., 1985; Stewart al., 1988).

Sato et al. (1993) observaram muitas células grandes contendo grânulos no citoplasma observadas nos linfonodos nos locais de drenagem, como os linfonodos parotídeos e retrofaríngeos, fígados e baços de bovinos infectados experimentalmente com *T. sergenti*, no Japão. Confirmou-se que os grânulos eram formas exoeritrocíticas de *T. sergenti*, pois apresentavam uma reação imunohistoquímica específica contra o anticorpo *anti-T. sergenti*. Além disso, os achados ultraestruturais dos corpos granulares sugeriram que eles eram o estágio esquizonte de *T. sergenti* e presentes no citoplasma e que as células grandes eram derivadas das

células hospedeiras. Além disso, verificaram que um único esquizonte de *T. sergenti* se desenvolve em duas formas: durante a fase de divisão nuclear parece ser um macroesquizonte e durante a formação do merozoíto, um microesquizonte com aparência de roseta (Schein et al., 1978; Shimizu et al., 1988). De acordo com essa definição, os esquizontes de *T. sergenti* observados no estudo microscópico foram considerados macroesquizontes por serem multinucleares e não produzirem merozoítos.

Os esquizontes de *T. parva* e *T. annulata* são formados em linfócitos ou monócitos e maturam apenas em células linfóides (Uilenberg, 1981). Os esquizontes de *T. mutans* também são formados nas células linfóides (Young et al., 1978). O estágio esquizonte de *T. sergenti* foi observado em uma célula unitária assim como nas outras três espécies, embora os esquizontes detectados em esfregaços de biópsia de linfonodo (Minami et al., 1990) fossem morfologicamente semelhantes aos de *T. orientalis* e *T. buffeli* (Uilenberg et al., 1985; Stewart et al., 1988). As células hospedeiras de *T. sergenti* são aparentemente estimuladas a serem aumentadas, enquanto as de *T. parva* ou *T. annulata* são estimuladas a serem divididas em células filhas (Hulliger et al., 1964).

Embora ainda não tenham sido obtidas evidências suficientes do processo para o estágio esquizonte de *T. orientalis*, pode-se especular que os parasitos invadem as células do hospedeiro por inoculação via carrapatos infectados e as células são estimuladas a se tornarem gigantes. Os esquizontes são formados no citoplasma das células aumentadas resultantes e aí amadurecem. Finalmente, as células gigantes contendo esquizontes são rompidas e os parasitos são liberados (Sato et al., 1993). Acreditamos que o fato de não termos encontrado esquizontes ou outros estágios celulares possa estar relacionado a fase em que ocorrem mudanças nos estágios celulares que permitem a multiplicação e transformação desses parasitos.

Embora a patogênese de *T. orientalis* ainda não esteja completamente elucidada esses achados destacam o potencial dessa espécie como espécie transformadora de células, mas a elucidação dessa hipótese requer mais estudos e pode estar associada com a idade avançada dos animais. Devido às características anatomopatológicas e histopatológicas dos linfomas nos bubalinos serem compatíveis com lesões observadas em bovinos com diagnóstico de leucose enzoótica, alguns autores têm diagnosticado a doença como BLV (Vale-Echeto et al., 2009; Chand et al., 2012), porém o envolvimento do BLV não está comprovado. No presente estudo não detectamos material gênico do BLV, BoHV-6 e BIV nos fragmentos de linfoma e tecidos dos animais avaliados. Não foi possível realizar o diagnóstico sorológico nas amostras desses animais, no entanto, Oliveira et al. (2015) em estudo prévio avaliando animais do rebanho A-

PA, mesmo desse estudo, não verificaram a presença de animais sororreagentes no IDGA e ELISA e PCR para BLV, reforçando a hipótese de que esse vírus não está envolvido na etiologia dos casos de linfomas da propriedade avaliada.

Em 2000, no Paquistão, foi realizado um estudo para detectar a coinfeção do BIV e BLV em búfalos e bovinos, por meio das técnicas de *Western blot* anti-p26 e IDGA anti-glicoproteína do envelope, respectivamente (Meas et al., 2000a). Nesse estudo foram avaliadas 370 amostras de soro de búfalos e 76 de bovinos. Para o BIV a frequência de positivos observada foi de 10,3% em búfalos e 15,8% em bovinos. As amostras positivas foram confirmadas por meio de *nested*-PCR para a região V2 do gene *env* do BIV. Já para o BLV nenhuma amostra bovina foi positiva e apenas três (0,8%) amostras bubalinas foram positivas, porém este resultado não foi confirmado por testes moleculares ou outro método sorológico. Ainda no ano de 2000, foi realizado um estudo em búfalos e bovinos no Camboja, semelhante ao realizado por Meas et al. (2000a). Em bovinos o BLV foi observado em 5,3% dos animais testados, porém nenhum búfalo foi sororreagente (n=42). Para o BIV foi observada ocorrência de 26,3% e 16,7% em bovinos e búfalos, respectivamente (Meas et al., 2000b). De forma semelhante, 134 amostras de búfalos foram negativas para o BLV por meio da técnica de IDGA em Taiwan (Wang, 1991).

Na região Amazônica brasileira, Romero et al. (1981) avaliaram 213 bubalinos, os quais foram negativos para presença de anticorpos contra o BLV. Resultados semelhantes foram obtidos em 685 amostras de soro bubalino do Brasil, pela técnica de IDGA contra a glicoproteína *gp51* (Rajão et al., 2010). Entretanto, mais recentemente, em um estudo que avaliou a presença de anticorpos anti-BLV por IDGA, em 232 amostras de soro de bubalinos de corte criados no Maranhão, Brasil, observou-se 4,31% de animais reagentes (Chaves et al., 2012).

O primeiro estudo a utilizar técnicas moleculares como diagnóstico para detecção do BLV em amostras de búfalos foi realizado nas Filipinas, por Mingala et al. (2009). Esses autores compararam a resposta imune entre búfalos do tipo rio e do tipo pântano por meio de uma *nested*-PCR para a região *LTR* do BLV, avaliando 272 amostras de DNA obtido de *buffy coat*, das quais 27,6% foram positivas, entretanto, nenhuma amostra foi submetida a análises de sequenciamento nucleotídico para confirmar o resultado da PCR.

Foi descrito na Venezuela, um caso de linfoma em uma búfala (Vale-Echeto et al., 2009). Os autores não realizaram nenhum teste diagnóstico sorológico ou molecular para apontar o BLV como o agente causador, mas com base em estudos anatomopatológicos

discutem como sendo um caso de leucose enzoótica bovina. Adicionalmente, avaliaram 300 soros de animais do mesmo rebanho pelas técnicas de ELISA e IDGA, encontrando 2% de soropositividade.

No Brasil, Monger et al. (2016) avaliaram um bubalino, fêmea, com seis anos de idade procedente de uma unidade de bubalinocultura localizada na região metropolitana de Belém que veio a óbito. Clinicamente a vaca bubalina apresentou histórico de apatia, anorexia e decúbito prolongado. Foi realizada necropsia do animal e fragmentos de tecidos alterados foram coletados para processamento histopatológico e *nested*-PCR para pesquisa do BLV. Adicionalmente, foi realizada avaliação sorológica a partir da IDGA de 35 bubalinos do rebanho em questão.

Os poucos dados relevantes disponíveis na literatura indicam que a espécie bubalina é menos suscetível a leucose enzoótica bovina. De acordo com Molnar et al. (2000), várias questões precisam ser elucidadas a respeito de BLV, se as cepas de vírus que circulam nos búfalos são totalmente idênticas às de bovinos; se a infecção se manifesta por alterações clínicas e patológicas na espécie, visto que são escassos os estudos visando detecção de material gênico em amostras de bubalinos.

No presente estudo nós detectamos pela primeira vez a presença de DNA de *T. orientalis* em amostras de linfomas, fragmentos de linfonodos, baço, fígado, rins, linfa e sangue dos animais avaliados o que nos levanta a hipótese de que a etiopatogenia dos linfomas nas propriedades avaliadas possa ser ocasionada por esse parasito, visto que na literatura, como mencionado anteriormente, só há um trabalho que detectou a presença de material viral (BLV) em amostras de sangue de búfalos.

Nós detectamos a presença dos genótipos *N2* e *N4* (detectado pela primeira vez nesse estudo) presentes nas amostras dos fragmentos avaliados. A posição filogenética das amostras do nosso estudo se alinhou com o genótipo *N2* observado em um estudo de prevalência de *T. orientalis* em búfalos no Vietnã (Sivakumar et al., 2014b) e com a sequência desse mesmo genótipo isolada do único caso de Theileriose fatal relatada em búfalos, na Índia. Esse genótipo até o momento só foi isolado em búfalos (Vinodkumar et al., 2015). Gubbels et al. (2000) concluíram que todos os isolados conhecidos de *T. buffeli* originam-se de um grupo disperso de parasitos derivados de búfalos que se adaptaram aos bovinos, assim, nos perguntamos, seria esse genótipo mais patogênico para os bubalinos? Aqui nós levantamos a hipótese de que esse genótipo possa ser mais patogênico na espécie bubalina, logo, mais estudos devem ser conduzidos tentando verificar a virulência desse genótipo. Pelas reconstruções filogenéticas

observamos que o novo genótipo *N4*, também verificado nas amostras de fragmentos de linfomas detectados nesse estudo, apresentam uma posição mais próxima do grupo *N2*. Pelas análises de distância observamos claramente essa posição filogenética, o que reforça a nossa hipótese.

Embora a infecção por algumas espécies de *Theileria* seja assintomática ou persiste como infecção crônica, *T. parva* e *T. annulata* podem ser altamente patogênicas para bovinos e *T. lestoquardi* pode causar doença significativa em ovinos. Essas três espécies estão entre as espécies transformadoras de *Theileria* devido à sua capacidade de transformar e induzir a proliferação indefinida de leucócitos do hospedeiro infectado (Brown et al., 1973). As síndromes da doença resultantes podem ser descritas como distúrbios linfoproliferativos, que muitas vezes culminam em desorganização e destruição do sistema linfóide do hospedeiro. Embora informações detalhadas tenham sido geradas para uma série de vias de transdução de sinal da célula hospedeira que são alteradas durante a transformação de leucócitos, moléculas do parasito responsáveis pela iniciação ou regulação da célula hospedeira de transformação ainda não foi identificado ou totalmente validado (Shiels, 2006; Dobbelaere; Baumgartner, 2009).

Theileria orientalis é um membro do grupo não transformador de espécies de *Theileria* que proliferam no hospedeiro como forma intraeritrocitária e podem gerar anemia e icterícia, mas raramente causam doença fatal (Onuma; Sugimoto, 1998). Embora a patogênese de *T. orientalis* ainda não seja completamente compreendida (Watts et al., 2016), alguns autores já verificaram a presença de esquizontes em linfonodos e outros tecidos em animais infectados experimentalmente, sugerindo que essa espécie de *Theileria* podem ser transformadores de células (Uilenberg et al., 1985; Sato et al., 1993; Sugimoto; Fujisaki, 2002; Gebrekidan et al., 2020).

O sequenciamento do genoma de *T. orientalis* em comparação com as espécies transformantes *T. annulata* e *T. parva* destacou características evolutivas específicas da linhagem. Foram identificadas várias expansões da família de genes específicos da linhagem transformadoras em *T. orientalis*, incluindo o *SVSP*, *Tash/TpHN*, *Tpr/Tar*, e famílias *TP9/TA9*, que podem ter coincidido com o desenvolvimento da capacidade de transformar leucócitos do hospedeiro. Esta primeira sequência genômica de uma espécie não-transformadora de *Theileria* ocupou uma posição filogenética próximo ao das espécies transformadoras e, portanto, oferece uma oportunidade ideal para analisar características únicas de *Theileria* do ponto de vista evolutivo (Hayashida et al., 2012).

A origem e o momento de introdução de *T. orientalis* no Brasil não são claros. O provável mecanismo de introdução pode ter sido através da importação de búfalos e/ou bovinos no estado do Pará. Esses animais chegaram ao país no final do século XIX da Europa, Caribe e Ásia, e foram inicialmente estabelecidos na região norte, na Ilha de Marajó (estado do Pará). A última importação da Índia ocorreu em 1962 e da Itália em 1989 (Bernardes, 1997; Lourenço Júnior; Garcia, 2008). Portanto, é possível que este ou similar comércio de búfalos e/ou bovinos vivos possam ter introduzido esse hemoprotozoário no Brasil. Outra hipótese seria se alguma espécie de carrapatos *Haemaphysalis* spp. acidentalmente trazidos com animais importados de áreas onde esses espécimes de carrapatos estão presentes ou em outras espécies de hospedeiros.

No Brasil, o gênero *Haemaphysalis* é representado por apenas três espécies: *H. cinnabarina* (Koch, 1844), que é uma espécie conhecida apenas por espécimes tipo, originalmente descrita no estado do Pará como hospedeiro desconhecido; *H. leporipalustris* (Packard, 1869), comumente encontrado em coelhos selvagens e *H. juxtakochi* (Coley, 1946) que parasita preferencialmente mamíferos da família Cervidae (Aragão, 1936; Kohls, 1960; Freire, 1972; Barros; Baggio, 1992; Serra-Freire et al., 1996; Arzua et al., 2005; Labruna et al., 2005; Onofrio et al., 2006; Martins et al., 2007; Barros-Battesti et al., 2008). No entanto, essa espécie de carrapato nunca foi associada a búfalos no país (Abate et al., 2018).

Sabe-se que os carrapatos parasitam uma grande variedade de hospedeiros vertebrados em todo o mundo, como anfíbios, répteis, mamíferos, aves, incluindo humanos. Embora haja uma variedade de estudos sobre o parasitismo por carrapatos em animais e humanos nas diferentes ecorregiões do país, são escassos e fragmentados os estudos no Bioma Amazônico, subestimando assim a fauna acarológica dessa região (Barros-Battesti et al., 2008; Abate et al., 2018). Outra possibilidade para introdução e manutenção das espécies de *Theileria orientalis* na região seria a adaptação desses parasitos às espécies de carrapatos existentes no país, uma vez que a detecção de um novo grupo no Brasil sugere que houve uma adaptação do protozoário na região estudada. Dessa maneira, embora existam poucos relatos sobre o parasitismo de carrapatos em búfalos no Brasil, os espécimes *R. microplus*, *A. cajennense* (*sensu stricto*), *A. maculatum* e *D. nitens* foram relatadas parasitando búfalos (Rocha et al., 1969; Corrêa et al., 2012; Silva et al., 2015; Batista et al., 2018) e talvez estas sejam os vetores e/ou reservatórios prováveis desse parasito no estado do Pará.

9 CONCLUSÃO

- Existe uma diversidade de genótipos de *T. orientalis* na população de búfalos avaliada.
- Um novo genótipo (N4) de *T. orientalis* está presente nas populações de búfalos.
- Os animais avaliados no estudo clínico-anatomopatológico apresentavam emagrecimento progressivo.
- Os tumores caracterizados como multicêntricos, e os sítios afetados incluíam serosa do rúmen, retículo, intestino, fígado, vesícula biliar, peritônio, omento, diafragma, coração, pulmão, pleura parietal e visceral; baço, rim, útero.
- Verificou-se múltiplas lesões nodulares com linfadenomegalia generalizada, e os linfonodos apresentaram aspecto homogêneo, sem definição cortico-medular, de coloração esbranquiçada.
- Não foi observada a presença de coinfeções por outros hemopatógenos avaliados nos animais com quadro de linfoma.
- Nas análises moleculares dos fragmentos de tecidos tumorais e demais tecidos avaliados, não houve a presença de material gênico de *Bovine leukemia virus* (BLV), *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) e *Bovine immunodeficiency virus* (BIV).
- Primeira detecção molecular de *T. orientalis* em amostras de linfomas, com a presença de dois genótipos, incluindo o novo genótipo descrito nesse estudo.
- Fatores climáticos, ambientais e inerentes às características do hospedeiro possam estar relacionada à presença dessa espécie no Brasil, onde não há a presença do vetor, dessa maneira esses parasitos teriam sofrido adaptações a novos vetores, bem como aos hospedeiros, apresentando uma alta variabilidade genética.
- Estudos adicionais visando isolamento e caracterização da virulência desse novo genótipo encontrado no Brasil deve ser realizada, bem como a identificação dos possíveis vetores capazes de transmitir esse parasito na região avaliada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

Abate HL, Santos NJR, Brito DRB, Valente JDM, Vieira TSWJ, Garcia JL, Vieira RFC, Vidotto O (2018) *Theileria* sp. in water buffaloes from Maranhão State, northeastern Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 27: 593-596

ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (2019). Disponível em: www.bufalo.com.br

Abda B, de Monbrison F, Bousslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S (2011) Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105:17–22

Adjou Moumouni PF, Aboge GO, Terkawi MA (2015) Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. *Parasit Vect* 8(1):496

Agina OA, Shaari MR, Isa NMM, Ajat M, Zamri-Saad M, Hamzah H (2020) Clinical Pathology, Immunopathology and Advanced Vaccine Technology in Bovine Theileriosis: A Review. *Pathogens* 25:9 (9):697

Ahmed JS, Luo J, Schnittger L, Seitzer U, Jongejan F, Yin H (2006) Phylogenetic position of small-ruminant infecting piroplasms. *Ann N Y Acad Sci* 1081: 498–504

Aktas M, Altay K, Dumanli N (2006a) A molecular survey of bovine *Theileria* parasites among apparently healthy cattle and with a note on the distribution of ticks in eastern Turkey. *Vet Parasitol* 138:179–185

Aktas M, Altay K, Dumanli N (2006b) PCR-based detection of *Theileria ovis* in *Rhipicephalus bursa* adult ticks. *Vet Parasitol* 140:259–263

Allsopp B, Baylis H, Allsoppi M (1993) Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitol* 107(02):157-165

Altangerel K, Battsetseg B, Battur B, Sivakumar T, Batmagnai E, Javkhlan G, Tuvshintulga B, Igarashi I, Matsumoto, K, InokumaH, Yokoyama N (2011a) The first survey of *Theileria orientalis* infection in Mongolian cattle. *Vet Parasitol* 182:343–348

Altangerel K, Sivakumar T, Inpankaew T, Jittapalapong S, Terkawi MA, Ueno A, Xuan X Igarashi I, Yokoyama N (2011b) Molecular prevalence of diferente genotypes of *Theileria orientalis* detected from cattle and water buffaloes in Thailand. *J Parasitol* 97:1075–1079

Andrighetto C, Jorge AM, Piccinin A (2005) Efeitos da monensina sódica sobre a produção e composição do leite, a produção de mozzarella e o escore de condição corporal de búfalas murrah. *Rev. Bras. de Zootec* 34 (2): 641-649

- Aparna M, Ravindran R, Vimalkumar MB, Lakshmanan B, Rameshkumar P, Kumar KGA, Promod K, Ajithkumar S, Ravishankar C, Devada K, Subramanian H, George AJ, Ghosh S (2011) Molecular characterization of *Theileria orientalis* causing fatal infection in crossbred adult bovines of South India. *Parasitol Int* 60:524–529
- Applewhaite LM, Craig TM, Wagner GG (1981) Serological prevalence of bovine babesiosis in Guyana. *Trop Anita Hlth Prod* 13: 13-18
- Aragão HB (1936) Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 31: 59-843
- Arzua M, Onofrio VC, Barros-Battesti DM (2005) Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool* 22: 623-632
- Baek BK, Choi H, Kim BS, Hanson R, Kakoma I (1992) Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. II: protection against natural exposure under field conditions. *Kor J Parasitol* 30: 201–208
- Baek BK, Soo KB, Kim JH, Hur J, Lee BO, Jung J, Onuma M, Oluoch AO, Kim C-H, Kakoma I (2003) Verification by polymerase chain reaction of vertical transmission of *Theileria sergenti* in cows. *Can J Vet Res* 67: 278
- Bai Q, Liu G, Yin H (2002) *Theileria sinensis* sp nov: A new species of bovine *Theileria*—Molecular taxonomic studies. *Ac Vetet Zootec Sin* 33(2):185-190
- Bailey G (2012) *Theileria* in cattle- a farmers guide to a “new” disease. NSW DPI 2012, 1–29. Disponível em: https://cdn.csu.edu.au/_data/assets/pdf_file/0016/1351024/2012-BFD-Theileria-Wagga-Beef-Forum-August-2012.pdf
- Barros DM, Baggio D (1992) Ectoparasites Ixodida Leach, 1817 on wild mammals in the State of Paraná, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 291-296
- Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Arzua M, Labruna MB (2008) Comments on the validity of *Haemaphysalis cinnabarina* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae), a taxon known solely by the type specimens from northern Brazil. *Rev Brazil J Vet Parasitol* 17: 53-55
- Bartlett PC, Norby B, Byrem TM (2013) Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci* 96 (3): 1591-1597
- Bastos CV, Passos LMF, Vasconcelos MMC, Ribeiro MFB (2009) In vitro establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. *Braz J Microb* 9: 399-403
- Batista HR, Sarturi C, Stelmachtchuk FN, Oliveira DR, Morini AC, Gennari SM, Marcili A, Bastos FAN, Barata LES, Minervino AHH (2018) Prevalence and risk factors associated with ectoparasite infestation of buffaloes in an Amazonian ecosystem. *Parasit Vectors* 4:11(1):335

- Beatty J (2014) Viral causes of feline lymphoma: retroviruses and beyond. *Vet J* 201:(2)174-180
- Bernardes O (2007) Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Rev Bras Reprod Anim* 31(3): 293-298
- Bernardes O (2011) Integração, associativismo e arranjos na cadeia produtiva da bubalinocultura: situação atual e perspectivas. In: Simpósio da Cadeia Produtiva da Bubalinocultura, 2 Botucatu. Resumos. p.1-13
- Bernardes W (1997). Bubalinocultura leiteira no Brasil: tendências, parcerias e fomento. Palestra no evento sobre as perspectivas da bubalinocultura leiteira no país e sobre o programa de “fomento” desenvolvido pela Fazenda Paineiras da Ingaí. <http://www.ingai.agr.br/x/parceria.htm>
- Bhattacharya P (1967) Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bull Off Int Epizoot* 68(1):149–50
- Biddle A, Eastwood S, Martin L, Freeman P, Druce E (2019) A survey to determine the prevalence of *Theileria* spp. in beef cattle in the northern tablelands of New South Wales. *Aust Vet J* 91(10):427-431
- Bidwell DE, Turp P, Joyner LP, Payne RC, Purne URE (1978) Comparisons of serological tests for *Babesia* in British cattle. *Vet Rec* 103: 446-449
- Bilgiç HB, Karagenç T, Simuunza M, Shiels B, Tait A, Eren H, Weir W (2013) Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp Parasitol* 133:222–229
- Bishop R, Musoke A, Morzaria S, Gardner M, Nene V (2004) *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology* 129:S271-S283.
- Bogema DR, Deutscher AT, Fell S, Collins D, Eamens GJ, Jenkins C (2015) development and validation of a quantitative PCR assay using multiplexed hydrolysis probes for detection and quantification of *Theileria orientalis* isolates and differentiation of clinically relevant subtypes. *J Clin Microbiol* 53:941–950
- Bogema DR, Micallef ML, Liu M, Padula MP, Djordjevic SP, Darling AE, Jenkins C (2018) Analysis of *Theileria orientalis* draft genome sequences reveals potential species-level divergence of the Ikeda, Chitose and Buffeli genotypes. *BMC Genom* 19: 298
- Brasil (2016) MAPA- Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento do Brasil. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>
- Brown CG, Stagg DA, Purnell RE, Kanhai GK, Payne RC (1973) Letter: Infection and transformation of bovine lymphoid cells in vitro by infective particles of *Theileria parva*. *Nature* 245:101–3

- Callow LL (1984) Animal health in Australia. In: Protozoal and Rickettsial Diseases. Vol. 5. Canberra, ACT, Australia: Australian Government Publishing Service
- Campo E, Swerdlow SH, Harris NL (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 17(19): 5019-5032
- Castillo JJ, Reagan JL, Bishop KD (2014) Viral lymphomagenesis: from pathophysiology to the rationale for novel therapies. *Br J Haematol* 165 (3): 300-315
- Chae J, Lee J, Kwon O, Holman PJ, Waghela SD, Wagner GG (1998) Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene variable (V4) region among and within geographic isolates of *Theileria* from cattle, elk and white-tailed deer. *Vet Parasitol* 75:41–52
- Chae JS, Allsopp BA, Waghela SD (1999) A study of the systematics of *Theileria* spp. based upon small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol Research* 85(11): 877-883
- Chaisi ME, Collins NE, Oosthuizen MC (2014) Phylogeny of *Theileria buffeli* genotypes identified in the South African buffalo (*Syncerus caffer*) population. *Vet Parasit* 204:87–95
- Chaisi ME, Janssens ME, Vermeiren L, Oosthuizen MC, Collins NE, Geysen D (2013) Evaluation of a real-time PCR test for the detection and discrimination of *Theileria* species in the African Buffalo (*Syncerus caffer*). *PLoS One* 8: e75827
- Chaisi ME, Sibeko KP, Collins NE, Potgieter FT, Oosthuizen MC (2011) Identification of *Theileria parva* and *Theileria* sp. (buffalo) 18S rRNA gene sequence variants in the African Buffalo (*Syncerus caffer*) in southern Africa. *Vet Parasitol* 182: 150-162
- Chand N, Deshmukh S, Banga HS (2012) Bovine lymphosarcoma in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Pract* 13(1):114
- Charaya G, Rakha N, Maan S, Kumar A, Kumar T, Jhambh R (2016) Comparative evaluation of polymerase chain reaction assay with microscopy for detection of asymptomatic carrier state of theileriosis in a herd of crossbred cattle. *Vet World* 9:1039–1042
- Chauhan H, Patel B, Bhagat A, Patel M, Patel S, Raval S, Panchasara H, Shrimali M, Patel A, Chandel B (2015) Comparison of molecular and microscopic technique for detection of *Theileria annulata* from the field cases of cattle. *Vet World* 8:1370–1373
- Chaves NP, Bezerra DC, Santos LS, Sá JS, Santos HP, Pereira HM (2012) Intercurrence of enzootic leucosis and brucellosis in buffaloes (*Bubalus bubalis*) in extensive production system. *Pesq Vet Bras* 32: 131–134
- Chomel B (2011) Tick-borne infections in dogs—an emerging infectious threat. *Vet Parasitol* 179: 294–301
- Coley RA (1946) The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus*, and *Haemaphysalis* (Ixodoidea) of the New World. *National Institute of Health Bulletin* 187:1-54

- Conraths FJ, Schares G (2006) Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. *Vet Parasitol* 136:91–98
- Corrêa FN, Cunha NC, Rangel, CP Fonseca AH (2012) Ticks on buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Vet Parasitol* 21: 313–4
- Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, Paiva F, Teixeira MM (2009) Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes* 23(1):44-51
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Añez N, Machado RZ, Gibson WC, Teixeira MM (2006) The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology* 133(2):159-69
- Cossio-Bayugar R, Pillars R, Schlater J, Holman PJ (2002) *Theileria buffeli* infection of a Michigan cow confirmed by small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Vet Parasitol* 105:105–110
- Cox-Singh J, Pomrehn AS, Wolfe ND, Rahman HA, Lu HY, Singh B (2000) Sensitivity of the nested-polymerase chain reaction (PCR) assay for *Brugia malayi* and significance of 'free' DNA in PCR based assays. *Int J Parasitol* 30:1177–1179
- Criado-Fornelio A, Buling A, Asenzo G, Benitez D, Florin-Christensen M, Gonzalez Oliva A, Henriques G, Silva M, Alongi A, Agnone A (2009) Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet Parasitol* 162:200–206
- Criado-Fornelio A, González-del-Río MA, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC (2004) The “expanding universe” of piroplasms. *Vet Parasitol* 119: 337–345
- Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero JC (2003) Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Vet Microbiol* 10: 93(4):307-17
- Cufos N, Jabbar A, de Carvalho LM, Gasser RB (2012) Mutation scanning-based analysis of *Theileria orientalis* populations in cattle following an outbreak. *Electrophoresis* 33:2036–2040
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 30(9)(8):772
- de La Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Rodríguez SD, García MA, Kocan KM (2001) Evolution and function of tandem repeats in the major Surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim Health Res Rev* 2(2):163-73
- de la Fuente J, Ruiz-Fons F, Naranjo V, Torina A, Rodríguez O, Gortázar C (2008) Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res Vet Sci* 84(4): 382-386

De Vos AJ (2011) *Theileria*: Assess potential to develop a vaccine for *Theileria orientalis* infection Disponível em: <https://www.mla.com.au/download/finalreports?>

Dinkel KD, Herndon DR, Noh SM, Lahmers KK, Todd SM, Ueti MW, Scoles GA, Mason KL, Fry LM (2021) A US isolate of *Theileria orientalis*, Ikeda genotype, is transmitted to cattle by the invasive Asian longhorned tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Parasites Vectors* 14:157

Dirikolu L, Yohn R, Garrett EF, Chakkath T, Ferguson DC (2008) Detection, quantifications and pharmacokinetics of toltrazuril sulfone (Ponazuril) in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 32: 280–288

Dirksen G, Gründer HD, Stöber M (1993) *Rosenberger, exame clínico dos bovinos*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara 420

Dobbelaere D, Baumgartner M (2009) *Theileria*. In: Schaible, U.E., Haas, A. (Eds.), *Intracellular Niches of Microbes: A Pathogens Guide Through the Host Cell* Wiley-VCH Verlag, Weinheim 613–632

Dobbelaere DA, Küenzi P (2004) The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host–pathogen interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 524–530

Dodd S (1910) Piroplasmosis of cattle in Queensland. *J Comp Pathol Ther* 23:141-160

Dovaudi J, Rad NH, Adabi SG (2008) Ixodid tick species infesting cows and buffaloes and their seasonality in West Azerbaijan. *Res J Parasitol* 3: 98–103

Eamens GJ, Bailey G, Gonsalves JR, Jenkins C (2013a) Distribution and temporal prevalence of *Theileria orientalis* major piroplasm surface protein types in eastern Australian cattle herds. *Aust Vet J* 91:332–340

Eamens GJ, Bailey G, Jenkins C, Gonsalves JR (2013b) Significance of *Theileria orientalis* types in individual affected beef herds in New South Wales based on clinical, smear and PCR findings. *Vet Parasitol* 196:96–105

Eamens GJ, Gonsalves JR, Jenkins C, Collins D, Bailey G (2013c) *Theileria orientalis* MPSP types in Australian cattle herds associated with outbreaks of clinical disease and their association with clinical pathology findings. *Vet Parasitol* 191(3-4): 209–17

Elsify A, Sivakumar T, Nayel M (2015) An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitol Inter* 64(1):79-85

Emery D, Burgh S, Dinh THHH, Rolls P, Carter P (2021a) Merozoites of *Theileria orientalis buffeli* reduce the parasitaemia of *T. orientalis ikeda* following tick challenge. *Vet Parasitol* 298:109532

Emery D, Wang S, Loo C, Shirley C (2021b) A longitudinal study of infection with genotypes of *Theileria orientalis* in calves and introduced cattle at Dorrigo, New South Wales, and the effect on weight gains. *Vet Parasitol* 296: 109487

Emery DL (2020) “Prophylaxis and treatment of *Theileria orientalis*” Meat & Livestock Australia final report

Emery DL, MacHugh ND, Morrison WI (1988) *Theileria parva* (Muguga) infects bovine T-lymphocytes *in vivo* and induces coexpression of BoT4 and BoT8. *Parasite Immunol* 10:379–91

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Livestock Systems- buffaloes, 2015. Disponível em: <https://www.fao.org/livestock-systems/global-distributions/buffaloes/en/>

Fernandez De Marco M, Brugman VA, Hernandez-Triana LM (2016) Detection of *Theileria orientalis* in mosquito blood meals in the United Kingdom. *Vet Parasito* (229):31-36

Figuera RA, Barros CSL de (2004). Linfossarcoma intracerebral em bovino. *Cienc Rural* 34:3

Forshaw D, Alex SM, Palmer DG, Cotter J, Roberts WD, Jenkins C (2020) *Theileria orientalis* Ikeda genotype infection associated with anaemia, abortion and death in beef cattle in western Australia. *Aust Vet J* 98(7):290–7

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X (2006) Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137:214–221

Freire JJ (1972) Revisão das espécies da família ixodidae. *Rev Bras Med Vet* 8:1-16

Fujisaki K (1992) A review of the taxonomy of *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* group parasites in cattle. *J Protozool Res* 2: 87–96

Fujisaki K, Kamio T, Kawazu S, Shimizu S, Simura K (1993) *Theileria sergenti*: experimental transmission by the long-nosed cattle louse, *Linognathus vituli*. *Ann Trop Med Parasitol* 87(2):217–8

Fujisaki K, Kawazu S, Kamio T (1994) The taxonomy of the bovine *Theileria* spp. *Parasitol Today* 10:31–33

Fusinaga T, Minami T (1981) Indirect fluorescent antibody and complement fixation tests in the diagnosis of bovine theileriosis and babesiosis in Japan. *Vet Parasitol* 8:115-126

Galon EMS, Adjou Moumouni PF, Ybáñez RHD, Ringo AE, Efstratiou A, Lee S-Hun, Liu M, Guo H, Gao Y, Li J, Salces CB, Maurillo BCA, Boldbaatar D, Ybáñez AP, Xuan X (2019) First molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in water buffaloes in Bohol, Philippines. *Ticks Tick Borne Dis* 10:815-821

- García-Sanmartín J, Nagore D, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A (2006) Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet Res* 2(1):16
- Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, Cafarchia C, Beveridge I, Zhu X (2006) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nat Protoc* 1:3121–3128
- Gebrekidan H, Abbas T, Wajid M, Ali A, Gasser RB, Jabbar A (2017c) Molecular characterization of *Theileria orientalis* from bovines in Pakistan. *Infect Genet Evol* 47:19–25
- Gebrekidan H, Gasser RB, Baneth G, Yasur-Landau D, Nachum-Biala Y, Hailu A, Jabbar A (2016) Molecular characterization of *Theileria orientalis* from cattle in Ethiopia. *Ticks Tick Borne Dis* 7:742–747
- Gebrekidan H, Gasser RB, Jabbar A (2017d) Inadequate differentiation of *Theileria orientalis* genotypes buffeli and ikeda in an MT-PCR assay using the p23 gene as a marker. *J Clin Microbiol* 55:641–644
- Gebrekidan H, Gasser RB, Perera PK, McGrath S, McGrath S, Stevenson MA, Jabbar A (2015) Investigating the first outbreak of oriental theileriosis in cattle in South Australia using multiplexed tandem PCR (MT-PCR). *Ticks Tick Borne Dis* 6:574–578
- Gebrekidan H, Gasser RB, Stevenson MA, Jabbar A (2018) Multiplexed tandem PCR (MT-PCR) assay using the major piroplasm surface protein gene for the diagnosis of *Theileria orientalis* infection in cattle. *J Clin Microbiol* 56: e01661–e01617
- Gebrekidan H, Gasser RB, Stevenson MA, McGrath S, Jabbar A (2017b) Assessing the performance of multiplexed tandem PCR for the diagnosis of pathogenic genotypes of *Theileria orientalis* using pooled blood samples from cattle. *Mol Cell Probes* 31:70–75
- Gebrekidan H, Nelson L, Smith G, Gasser RB, Jabbar A (2017a) An outbreak of oriental theileriosis in dairy cattle imported to Vietnam from Australia. *Parasitology* 144:738–746
- Gebrekidan H, Perera PK, Ghafar A, Abbas T, Gasser RB, Jabbar A (2020) An appraisal of oriental theileriosis and the *Theileria orientalis* complex, with an emphasis on diagnosis and genetic characterization. *Parasitol Res* 119:11–22
- Ghaemi P, Hoghooghi-Rad N, Shayan P, Eckert B (2012) Detection of *Theileria orientalis* in Iran by semi-nested PCR. *Parasitol Res* 110: 527–531
- Gharbi M, Sassi L, Dorchies P, Darghouth MA (2006) Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: economic analysis and evaluation of the potential benefit of accination. *Vet Parasitol* 137:231–241
- Ghysdael J, Bruck C, Kettmann R (1984) Bovine leukemia virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 12:1-19

- Gibson MJ (2017) The Effects of *Theileria Orientalis* Ikeda on Bull Fertility and Libido MSc Thesis. Massey University, NZ
- Gomes J, Soares R, Santos M (2013) Detection of *Theileria* and *Babesia* infections amongst asymptomatic cattle in Portugal. *Tick Tick-born Dis* 4(1):148-151
- Gomes RA, Machado RZ, Starke-Buzetti WA, Bonesso MA (2008) Resposta imune-humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) contra *Anaplasma marginale*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 17:73-8
- Govaerts M, Verhaert P, Jongejan F, Goddeeris BM (2002) Characterisation of the 33 kDa piroplasm surface antigen of *Theileria orientalis/sergenti/buffeli* isolates from West Java, Indonesia. *Vet Parasitol* 104:103–117
- Gray MA, Luckins AG, Era PF, Brown CGD (1980) Evaluation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with *Theileria parva* and *T. annulata*. *Res Vet Sci* 29: 360-366
- Grimshaw WT, Wiseman A, Petrie L (1979) Bovine leucosis (lymphosarcoma): a Clinical study of 60 pathologically confirmed cases. *Vet Rec* 105 (12): 267-272
- Gubbels MJ, Hong Y, Van Der Weide M (2000) Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *Int J Parasitol* 30(8): 943-952
- Gupta PP, Singh B, Gill BS (1977) Some uncommon neoplasms of Indian water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralbl Veterinarmed A* 24 (6): 511-519
- Hagiwara K, Tsuji M, Ishihara C, Tajima M, Kurosawa T, Takahashi K (1995) Serum from *Theileria sergenti*-infected cattle accelerates the clearance of bovine erythrocytes in SCID mice. *Parasitol Res* 81: 470–474
- Hammer JF, Jenkins C, Bogema D, Emery D (2016) Mechanical transfer of *Theileria orientalis*: possible roles of biting arthropods, colostrum and husbandry practices in disease transmission. *Parasit Vectors* 9: 34
- Haron AW, Abdullah FFJ, Abba Y, Mohammed K, Adamu L, Tijjani A, Sadiq MA, Ahmed SS, Lila MAM (2014) Detection of *Theileria* species and hematological profiles of infected cattle from selected farms in Selangor, Malaysia. *Alex J Vet Sci* 44: 9–14
- Hayashida K, Hara Y, Abe T, Yamasaki C, Toyoda A, Kosuge T (2012) Comparative genome analysis of three eukaryotic parasites with differing abilities to transform leukocytes reveals key mediators of *Theileria*-induced leukocyte transformation. *mBio* 3:e204–e212
- Hayashida K, Umemiya-Shirafuji R, Sivakumar T, Yamagishi J, Suzuki Y, Sugimoto C, Yokoyama N (2018) Establishment of a mouse-tick infestation model for *Theileria orientalis* and analysis of its transcriptome. *Int J Parasitol* 48: 915–924
- He L, Feng H-H, Zhang W-J (2012) Occurrence of *Theileria* and *Babesia* species in water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in the Hubei province, South China. *Vet Parasitol* 186:490–496

- He L, Zhou YQ, Oosthuizen MC, Zhao JL (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection of *Babesia orientalis* in water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linnaeus, 1758) in China. *Vet Parasitol* 165:36–40
- Heath ACG (2013) The role of ticks, biting flies and lice in the transmission of theileriosis. *Vetscript* 13–14
- Heath ACG (2016) Biology, ecology and distribution of the tick, *Haemaphysalis longicornis* Neumann (Acari: Ixodidae) in New Zealand. *N Z Vet J* 64: 10–20
- Höfle U, Vicente J, Nagore D, Hurtado A, Peña A, de la Fuente J, Gortazar C (2004) The risks of translocating wildlife. Pathogenic infection with *Theileria* sp. And *Elaeophora elaphi* in an imported red deer. *Vet Parasitol* 126: 387–395
- Hoogstraal H, Roberts FHS, Kohls TGM, Tipton VJ (1968) Review of *Haemaphysalis* (*Kaiseriana*) *longicornis* Neumann (Resurrected) of Australia, New Zealand, New Caledonia, Fiji, Japan, Korea, and Northeastern China and USSR, and its parthenogenetic and bisexual populations (Ixodoidea, Ixodidae). *J Parasitol* 54: 1197–1213
- Hornok S, Abichu G, Meli ML, Tánčzos B, Sulyok KM, Gyuranecz M, Gönczi E, Farkas R, Hofmann-Lehmann R (2014) Influence of the biotope on the tick infestation of cattle and on the tick-borne pathogen repertoire of cattle ticks in Ethiopia. *PLoS One* 9: e106452
- Hulliger L, Wilde Kh, Brown Cg, Turner L (1964) Mode of multiplication of *Theileria* in cultures of bovine lymphocytic cells. *Nature* 15(203):728–30
- IBGE – Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal, 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>.
- Inoue M, Nguyen DV, Meas S, Ohashi K, Sen S, Sugimoto C (2001) Survey of *Theileria* parasite infection in cattle in Cambodia and Vietnam using piroplasm surface protein gene-specific polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 63:1155–7
- Irwin T (2013) Anaemia Caused by Theileriosis Disponível em: <http://www.flockandherd.net.au/cattle/reader/theileriosis-northwest>
- Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekiso OM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I (2007) Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Methods* 71:281–287
- Ishihara T (1962) Bovine piroplasmosis in Japan. *Natl Inst Anim Hlth t* 2: 29–31
- Islam MK, Jabbar A, Campbell BE, Cantacessi C, Gasser RB (2011) Bovine theileriosis - an emerging problem in south-eastern Australia? *Infect Genet Evol* 11:2095–2097
- Izzo MM, Poe I, Horadagoda N, De Vos AJ, House JK (2010) Haemolytic anaemia in cattle in NSW associated with *Theileria* infections. *Aust Vet J* 88:45–51

- Jalali SM, Ghorbanpour M, Jalali MR, Rasooli A, Safaie P, Norvej F, Delavari I (2018) Occurrence and potential causative factors of immune-mediated hemolytic anemia in cattle and river buffaloes. *Vet Res Forum* 9:7–12
- Jalovecka M, Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Malandrin L (2018) The complexity of piroplasms life cycles. *Front Cell Infect Microbiol* 8:248
- Janardhanan J, Prakash JAJ, Abraham OC, Varghese GM (2014) Comparison of a conventional and nested PCR for diagnostic confirmation and genotyping of *Orientia tsutsugamushi*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 79:7–9
- Jenkins C, Bogema DR (2016) Factors associated with seroconversion to the major piroplasm surface protein of the bovine haemoparasite *Theileria orientalis*. *Parasit Vectors* 9:106
- Jenkins C, Micallef M, Alex SM, Collins D, Djordjevic SP, Bogema DR (2015) Temporal dynamics and subpopulation analysis of *Theileria orientalis* genotypes in cattle. *Infect Genet Evol* 32:199–207
- Jeong W, Kweon CH, Kim JM, Jang H, Paik SG (2005) Serological investigation of *Theileria sergenti* using latex agglutination test in South Korea. *J Parasitol* 91:164–169
- Jeong W, Yoon SH, An DJ, Cho SH, Lee KK, Kim JY (2010) A molecular phylogeny of the benign *Theileria* parasites based on major piroplasma surface protein (MPSP) gene sequences. *Parasitol* 137:241–9
- Johnston LAY, Pearson RD, Leatch BV (1973) A comparison of indirect, direct inhibition and labelled anticomplement fluorescent antibody tests in the detection of *Babesia argentina* infection in cattle. *Aust Vet J* 49: 421-423
- Jonsson NN, Piper EK, Gray CP, Deniz A, Constantinoiu CC (2011) Efficacy of toltrazuril 5% suspension against *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in calves and observations on the associated immunopathology. *Parasitol Res* 109 (1): 113–128
- Junlong L, Li Y, Liu A, Guan G, Xie J, Yin H, Luo J (2015) Development of a multiplex PCR assay for detection and discrimination of *Theileria annulata* and *Theileria sergenti* in cattle. *Parasitol Res* 114:2715–2721
- Kakati P, Sarmah P, Bhattacharjee K (2015) Emergence of oriental theileriosis in cattle and its transmission through *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Assam, India. *Veterinary World*. 8(9):1099-1104
- Kakuda T, Shiki M, Kubota S, Sugimoto C, Brown WC, Kosum C (1998) Phylogeny of benign *Theileria* species from cattle in Thailand, China and the USA based on the major piroplasm surface protein and small subunit ribosomal RNA genes. *Int J Parasitol* (8):1261–7
- Kamau J, de Vos AJ, Playford M, Salim B, Kinyanjui P, Sugimoto C (2011a) emergence of new types of *Theileria orientalis* in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks. *Parasit Vectors* 4:2

- Kamau J, Salim B, Yokoyama N, Kinyanjui P, Sugimoto C (2011b) Rapid discrimination and quantification of *Theileria orientalis* types using ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Infect Genet Evol* 11:407–414
- Kamio, T., Ito, Y., Fujisaki, K., Minami, T. (1990) Infection rates of *Theileria sergenti* in *haemaphysalis longicornis* ticks collected from the field in Japan. *Jpn J Vet Sci* 52: 43–48
- Kang SW, Nguyen LT, Noh JH, Reddy KE, Kweon CH, Choe SE (2012) Phylogenetic analysis of benign *Theileria* species based on major piroplasm surface protein (MPSP) genes from ticks of grazing cattle in Korea. *Vet Parasitol* 189: 145–152
- Kariuki EK, Penzhorn BL, Horak IG (2012) Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and African buffaloes in the Tsavo conservation area, Kenya. *Onderstepoort J Vet Res* 79: 437
- Katende J, Morzaria S, Toye P, Skilton R, Nene V, Nkonge C, Musoke A (1998) An enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Theileria parva* antibodies in cattle using a recombinant polymorphic immunodominant molecule. *Parasitol Res* 84: 408–416
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 19(4):1160–1166
- Kawahara M, Tajima T, Torii H, Yabutani M, Ishii J, Harasawa M (2009) *Ehrlichia chaffeensis* infection of Sika deer, Japan. *Emerg Infect Dis* 15(12): 1991–1993
- Kawamoto S, Takahashi K, Onuma M, Kubota S, Nejo H, Kurosawa T, Sonoda M (1991) Rebound phenomenon of parasitemia in splenectomized calves primarily infected with *Theileria sergenti*. *J Vet Med Sci* 53(1):127–8
- Kawazu S, Kamio T, Kakuda T, Terada Y, Sugimoto C, Fujisaki K (1999) Phylogenetic relationships of the benign *Theileria* species in cattle and Asian buffalo based on the major piroplasm surface protein (p33/34) gene sequences. *Int J Parasitol* 29:613–8
- Kawazu S, Kamio T, Sekizaki T, Fujisaki K (1995) *Theileria sergenti* and *T. buffeli*: polymerase chain reaction-based marker system for differentiating the parasite species from infected cattle blood and infected tick salivary gland. *Exp Parasitol* 81:430–435
- Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, Fujisaki K (1992) Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *Theileria buffeli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol Biochem* 56(1):169–175
- Khatoon S, Kolte SW, Kurkure NV, Chopde NA, Jahan A (2013) Detection of tropical bovine theileriosis by polymerase chain reaction in cattle. *J Parasit Dis* 39:53–56
- Khattak R, Rabib M, Khan Z, Ishaq M, Hameed H, Taqddus A, Faryal M, Durrani S, Gillani Q, Allahyar R (2012) A comparison of two different techniques for the detection of blood parasite, *Theileria annulata*, in cattle from two districts in Khyber Pukhtoon Khwa Province (Pakistan). *Parasite: J Soci France Parasitol* 19:91–95

- Khukhuu A, Lan DT, Long PT, Ueno A, Li Y, Luo Y (2011) Molecular epidemiological survey of *Theileria orientalis* in Thua Thien Hue Province. Vietnam J Vet Med Sci 73(5):701–5
- Kierstein G, Vallinoto M, Silva A (2004) Analysis of mitochondrial D-loop region casts newblight on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. Mol Phylogenet Evol 30(2): 308–324.
- Kiltz H, Uilenberg G, Franssen F, Perié N (1986) *Theileria orientalis* occurs in Central Africa. Res in Vet Sci 40(2):197–200
- Kim DM, Park G, Kim HS, Lee JY, Neupane GP, Graves S, Stenos J (2011) Comparison of conventional, nested, and real-time quantitative PCR for diagnosis of Scrub typhus. J Clin Microbiol 49:607–612
- Kim HS, Kim DM, Neupane GP, Lee Y, Yang NW, Jang SJ, Jung SI, Park KH, Park HR, Lee CS (2008) Comparison of conventional, nested, and real-time PCR assays for rapid and accurate detection of *Vibrio vulnificus*. J Clin Microbiol 46:2992–2998
- Kim JY, Yokoyama N, Kumar S, Inoue N, Yamaguchi T, Sentoku S (2004) Molecular epidemiological survey of benign *Theileria* parasites of cattle in Japan: detection of a new type of major piroplasm surface protein gene. J Vet Med Sci 66:251–6
- Kim S, Yu DH, Chae JB, Choi KS, Kim HC, Park BK (2017) Pathogenic genotype of major piroplasm surface protein associated with anemia in *Theileria orientalis* infection in cattle. Acta Vet Scand. 59(1):51
- Kim SJ, Tsuji M, Kubota S, Wei Q, Lee JM, Ishihara C, Onuma M (1998) Sequence analysis of the major piroplasm surface protein gene of benign bovine *Theileria* parasites in east Asia. Int J Parasitol 28(8):1219–27
- Koch CL (1844) Systematicsche übersicht über die ordnung der zecken. Archiv für Naturgeschichte 10: 217–239
- Kohls GM (1960) Records and new synonymy of new world *Haemaphysalis* ticks, with descriptions of the nymph and larva of *H. juxtakochi* Cooley. Journal Parasitol 46: 355–361
- Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, Sugimoto C, Igarashi I (2003) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of African trypanosomes. J Clin Microbiol 38:2778–2780
- Kubota S, Sugimoto C, Onuma M (1996) Population dynamics of *Theileria sergenti* in persistently infected cattle and vector ticks analysed by a polymerase chain reaction. Parasitology 112:437–442
- Kumar RVS, Veena P, Dhanalakshmi N (2012) Lymphosarcoma in a buffalo: a case report. Buffalo Bulletin 31(1):17–18

- Kunugiyama I, Yagi Y, Ito N (1991) Decrease in erythrocyte survival in *Theileria sergenti* infected calves determined by non-radioactive chromium labelling method. Jpn Soc Vet Sci 53: 391–394
- Kuttler KL, Adams LG, Todorovic RA (1977) Comparisons of the complement-fixation and indirect fluorescent antibody reactions in the detection of bovine babesiasis. Am J Vet Res 38(2): 153–156
- Kuttler KL, Craig TM (1975) Isolation of a bovine *Theileria*. Am J Vet Res 36(3):323–5
- Labruna MB, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH (2005) Detection of a spotted fever group Rickettsia in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. Vet Parasitol 127: 169–174
- Lane J, Jubb T, Shephard R, Webb-Ware J, Fordyce G (2015) Priority list of endemic diseases for the red meat industries. Project code: B.AHE.0010. Meat and Livestock Australia, Sydney, pp 76–81
- Lawrence JA, Norval RAI, Uilenberg G (1983) *Rhipicephalus zambeziensis* as a vector of bovine Theileriae. Trop Anim Health Prod 15: 39–42
- Lawrence K, Forsyth S, Vaatstra B, McFadden A, Pulford D, Govindaraju R, Pomroy W (2017) Cluster analysis of the clinical histories of cattle affected with bovine anaemia associated with *Theileria orientalis* Ikeda type infection. N Z Vet J 1–24
- Lawrence K, McFadden A, Gias E, Pulford D, Pomroy W (2016b) Epidemiology of the epidemic of bovine anaemia associated with *Theileria orientalis* (Ikeda) between August 2012 and March 2014. Vet J 64:38–47
- Lawrence KE, Forsyth SF, Vaatstra BL, McFadden A, Pulford DJ, Govindaraju K (2018) Clinical haematology and biochemistry profiles of cattle naturally infected with *Theileria orientalis* Ikeda type in New Zealand. N Z Vet J 66(1):21–9
- Lawrence KE, Gedye K, McFadden AM, Pulford DJ, Pomroy WE (2016a) An observational study of the vertical transmission of *Theileria orientalis* (Ikeda) in a New Zealand pastoral dairy herd. Vet Parasitol 218:59–65.
- Lawrence KE, Hickson RE, Wang B, Gedye K, Fraser K, Pomroy WE (2020) The efficacy of toltrazuril treatment for reducing the infection intensity of *Theileria orientalis* Ikeda type in dairy calves. Vet Parasitol 282:109124
- Levine ND (1985) Veterinary protozoology. Iowa State University Press. 319–20
- Li Y, Chen Z, Liu Z, Liu J, Yang J, Li Q, Li Y, Cen S, Guan G, Ren Q (2014) Molecular identification of *Theileria* parasites of northwestern Chinese Cervidae. Parasites Vectors 7:17
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25(11):1451–2

- Linhares GFC, Santana AP, Laueman LH, Madruga CR (2006) Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit rna for specific discrimination between *Babesia Bigemina* and *Babesia Bovis* By Pcr. Brazil Anim Sci 3(2): 27–32
- Liu A, Guan G, Du P, Gou H, Zhang J, Liu Z, Ma M, Ren Q, Liu J, Yang J, Li Y, Niu Q, Bai Q, Yin H, Luo J (2013) Rapid identification and differentiation of *Theileria sergenti* and *Theileria sinensis* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Vet Parasitol 191:15–22
- Liu A, Guan G, Du P, Liu Z, Gou H, Liu J, Yang J, Li Y, Ma M, Niu Q, Ren Q, Bai Q, Yin H, Luo J (2012) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the detection of *Theileria annulata* infection in China targeting the 18S rRNA and ITS sequences. Exp Parasitol 131:125–129
- Liu AH, Guan GQ, Liu JL, Liu ZJ, Leblanc N, Li YQ, Gao JL, Ma ML, Niu QL, Ren QY, Bai Q, Yin H, Luo JX (2011) Polymorphism analysis of Chinese *Theileria sergenti* using allele-specific polymerase chain reaction of the major piroplasm surface protein gene. J Parasitol 97:116–121
- Liu Q, Zhou YQ, He GS, Oosthuizen MC, Zhou DN, Zhao JL (2010) Molecular phylogenetic studies on *Theileria* spp. isolates (China) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. Trop Anim Health Prod 42:109–114
- Lourenço Júnior J, De B Garcia AR (2008) Panorama da bubalinocultura na Amazônia. <[http:// www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/409969/1/LOURENCO2008AmazonpecPanorama.pdf](http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/409969/1/LOURENCO2008AmazonpecPanorama.pdf)>
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002) Survey and summary: real-time PCR in virology. Nucleic Acid Res 30:1292–1305
- Magona J, Walubengo J, Olaho-Mukani W, Jonsson N, Welburn S, Eisler M (2008) Clinical features associated with seroconversion to *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Theileria parva* infections in African cattle under natural tick challenge. Vet Parasitol 155:273–280
- Makala LH, Mangani P, Fujisaki K, Nagasawa H (2003) The current status of major tick-borne diseases in Zambia. Vet Res 34:27–45
- Mans BJ, Pienaar R, Latif AA (2015) A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. Int J Parasitol: Parasit Wildl 4:104–118
- Mans BJ, Pienaar R, Latif AA, Potgieter FT (2011a) Diversity in the 18S SSU rRNA V4 hyper-variable region of *Theileria* in bovines and African buffalo (*Syncerus caffer*) from southern Africa. Parasitology 138:766–77
- Mans, BJ, Pienaar R, Potgieter FT, Latif AA (2011b) *Theileria parva*, *T. sp. (buffalo)* and *T. sp. (bougasvlei)* 18S variants. Vet Parasitol 182:382–383

- Marendy D, Baker K, Emery D, Rolls P, Stutchbury R (2020) *Haemaphysalis longicornis*: the life cycle on dogs and cattle, with confirmation of its vector status for *Theileria orientalis* in Australia. *Vet Parasitol X* 3: 100022
- Martins JR, Salomão EL, Doyle RL, Onofrio V, Barros-Battesti DM, Guglielmone AA (2007) *Haemaphysalis juxtakochi* Cooley, 1946 (Acari: Ixodidae) parasitando *Mazama nana* (Hensel, 1872) (Artiodactyla: Cervidae) no Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Parasitol Vet* 16:171-173
- Masatani T, Yoshihara S, Matsubara A, Gotoh C, Takahashi H, Tanaka T, Andoh M, Endo Y, Matsuo T (2016) Dynamics of *Theileria orientalis* genotype population in cattle in a year round grazing system. *Acta Parasitol* 61: 419–424
- Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB (1998) Nested PCR assay for the detection of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol* 36(4): 1090-1095
- Mbizeni S, Potgieter FT, Troskie C, Mans BJ, Penzhorn BL, Latif AA (2013) Field and laboratory studies on Corridor disease (*Theileria parva* infection) in cattle population at the livestock/game interface of uPhongolo-Mkuze area, South Africa. *Ticks Tick Borne Dis* 4: 227–234
- McFadden AM, Rawdon TG, Meyer J, Makin J, Clough RR, Tham K, Mullner P, Geysen D (2011) An outbreak of haemolytic anaemia associated with infection of *Theileria orientalis* in naive cattle. *New Zeal Vet J* 59:79–85
- McFadden AMJ, Hea ACG, Fairley R, Trollove P, Pulford DJ (2015) *Theileria* (Ikeda) associated bovine anaemia in a West Coast dairy farm. *Vetscript* 28:1
- McKeever DJ (2009) Bovine immunity—A driver for diversity in *Theileria* parasites? *Trends Parasitol* 25:269–276
- Meas S, Ohashi K, Tum S, Chhin M, Te K, Miura K, Sugimoto C, Onuma M (2000b) Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leucemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci* 62 (7): 779–781
- Meas S, Seto J, Sugimoto C, Bakhsh M, Riaz M, Sato T, Naeem K, Ohashi K, Onuma M (2000a) Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci* 62(3), 329–331
- Mehlhorn H, Schein E (1985) The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv Parasitol* 23:37–103
- Mekata H, Minamino T, Mikurino Y, Yamamoto M, Yoshida A, Nonaka N (2018) Evaluation of the natural vertical transmission of *Theileria orientali* *Vet Parasitol* 263:1–4
- Minami T, Fujinaga T, Furuya K, Ishihara T (1980) Clínico-hematologic and serological comparison of Japanese and Russian strains of *Theileria sergenti*. *National Institute of Animal Health Quarterly* 20(2): 44-52

- Minami T, Ishihara T, Fujita J (1981) Bovine theileriosis and its control in Japan. “Advances in the control of theileriosis”. In: Proceedings of an International Conference Held at the International Laboratory for Research on Animal Diseases in Nairobi. 9-13th February, 1981, pp. 94–96
- Minami T, Kawazu S, Smmura K, Fujisaki K, Kamo T, Ito S (1990) Detection of the schizont stage in experimentally infected cattle with Japanese *Theileria sergenti*. JJVR 52: 601-604
- Mingala CN, Konnai S, Cruz LC, Onuma M, Ohashi K (2009) Comparative molecular immunological analysis of swamp- and riverine-type water buffaloes responses. Cytokine (2):273–282
- Moaeen-ud-Din M & Bilal G (2015) Sequence diversity and molecular evolutionary rates between buffalo and cattle. J Anim Breed Genet 132 (1): 74-84
- Molnar E, Molnar L, Guedes VT, de Lima ES (2000) Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. Vet Rec (24): 705–706
- Monger SGB, Pereira WLA, Pituco EM, Nogueira AHC, Lima MS, Viana RB, Barbosa NGS (2016) [Lymphosarcoma in female buffalo - Case report] Linfossarcoma em uma búfala - Relato de caso Rev Bras Med Vet 38(1):19-24
- Moreau MF, Thibaud JL, Miled LB (1999) *Theileria annulata* in CD5+ macrophages and B1 B Cells Infect Immun 67: 6678–6682
- Morel PC, Uilenberg G (1981) Sur la nomenclature de quelques *Theileria* (Sporozoa, Babesioidea) des ruminants domestiques. Rev Elev Med Vet Pays Trop 34(2):139-143
- Morgan DW, McHardy N (1982) Comparison of the antitheilerial effect of Wellcome 993C and halofuginone. Res Vet Sci 32:84–88
- Mutugi JJ, Young AS, Maritim AC, Ndungu SG, Mining SK, Linyonyi A, Ngumi PN, Leitch BL, Morzaria SP, Dolan TT (1989) Immunisation of cattle Against theileriosis in Coast Province, Kenya: Laboratory evaluation of a *Theileria parva*, *parva* stabilate for use in ‘infection and treatment’ immunisation in the field. Res Vet Sci 47:170–177
- Nayel M, El-Dakhly KM, Aboulaila M, Elsify A, Hassan H, Ibrahim E, Salama A, Yanai T (2012) The use of different diagnostic tools for *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Menofia, Egypt. Parasitol Res 111:1019–1024
- Nazifi S, Razavi SM, Mansourian M, Nikahval B, Moghaddam M (2008) Studies on correlations among parasitaemia and some hemolytic indices in two tropical diseases (Theileriosis and Anaplasmosis) in far province of Iran. Trop Anim Health Prod 40 (1): 47–53
- Nene V, Kiara H, Lacasta A, Pelle R, Svitek N, Steinaa L (2016) The biology of *Theileria parva* and control of East Coast fever–current status and future trends. Ticks Tick Borne Dis 7:549–564

Nene V, Morrison WI (2016) Approaches to vaccination against *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Parasite Immunol* 38:724–734

Néo TA, Giglioti R, Obregón D, Bilhassi TB, Oliveira HN, Machado RZ (2016) Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Endemic Areas of São Paulo State, Brazil. *pen J Vet Med* 6: 75-84

Neveu-Lemaire M (1912) Genre *Theileria* ou piroplasmes bacilliformes. In: *Parasitologie des animaux domestiques*. Paris: J Lamarre et Cie 286-291

Nijhof AM, Pillay V, Steyl J, Prozesky L, Stoltz WH, Lawrence JA, Penzhorn BL, Jongejan F (2005) Molecular characterization of *Theileria* species associated with mortality in four species of African antelopes. *J Clin Microbiol* 43: 5907–5911

Nishizawa I, Sato M, Fujihara M, Sato S, Harasawa R (2010) Differential detection of hemotropic *Mycoplasma* species in cattle by melting curve analysis of PCR products. *J Vet Med Sci* 72(1):77-9

Norval RA, Perry BD, Young AS (1992) The epidemiology of theileriosis in Africa. Academic Press Inc, London

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63

Oakes VJ, Todd SM, Carbonello AA, Michalak P, Lahmers KK (2022) Coinfection of cattle in Virginia with *Theileria orientalis* Ikeda genotype and *Anaplasma marginale*. *J Vet Diagn Investig* 34:36–41

Oakes VJ, Yabsley MJ, Schwartz D, LeRoith T, Bissett C, Broaddus C, Schlater JL, Todd SM, Boes KM, Brookhart M, Lahmers KK (2019) *Theileria orientalis* ikeda genotype in cattle, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis* 25:1653–1659

Odongo DO, Sunter JD, Kiara HK, Skilton RA, Bishop RP (2010) A nested PCR assay exhibits enhanced sensitivity for detection of *Theileria parva* infections in bovine blood samples from carrier animals. *Parasitol Res* 106:357–365

Oliveira AL (2005) Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. *Rev Bras Reprod Anim* 29 (2):122-134

Oliveira CH, de Oliveira FG, Gasparini MR (2015) Bovine herpesvirus 6 in buffaloes (*Bubalus bulalis*) from the Amazon region. *Brazil Trop Anim Health Prod* 47(2):465–8

Oliveira CHS, Barbosa JD, Damasceno KA, Cassali GD, Oliveira CMC, Leite RC, Reis JKP (2016b) Multicentric lymphoma in buffaloes in the Amazon region, Brazil. *BMC Vet Res* 12:238

Oliveira CHS, Resende CF, Oliveira CMC, Barbosa JD, Fonseca Junior AA, Leite RC, Reis J KP (2016a) Absence of Bovine leukemia virus (BLV) infection in buffaloes from Amazon and southeast region in Brazil. *Prev Vet Med* 129: 9-12

- Omanwar S, Rao JR, Basagoudanavar SH, Singh RK, Butchaiah G (1999) Direct and sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by polymerase chain reaction. *Acta Vet Hung* 47: 351–359
- Onoe S, Sugimoto C, Tanaka M, Kubota S, Hirai T, Yonemichi H, Mori K, Onuma M (1994) Prenatal infections with *Theileria sergenti* in calves. *J Protozool Res* 4:119–123
- Onofrio VC, Venzal JM, Pinter A, Szabó MPJ (2006) Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. In: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara G.H. (Ed.). *Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para a identificação de espécies*. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan.29-39
- Onuma M, Kakuda T, Sugimoto C (1998). *Theileria* parasite infection in East Asia and control of the disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 21:165–177
- Onuma M, Kubota S, Kakud T, Aako Y, Asada M, Kabeya M, Sugimoto C (1997) Control of *Theileria sergenti* infection by vaccination. *Trop Anim Hlth Prod* 29: 119S–123S
- Oosthuizen MC, Allsopp BA, Troskie M, Collins NE, Penzhorn BL (2009) Identification of novel *Babesia* and *Theileria* species in South African giraffe (*Giraffa camelopardalis*, Linnaeus, 1758) and roan antelope (*Hippotragus equinus*, Desmarest 1804). *Vet Parasitol* 163: 39–46
- Ota N, Mizuno D, Kuboki N, Igarashi I, Nakamura Y, Yamashina H, Hanzaike T, Fujii K, Onoe S, Hata H, Kondo S, Matsui S, Koga M, Matsumoto K, Inokuma H, Yokoyama N (2009) Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 71:937– 944
- Oura C, Tait A, Asimwe B, Lubega G, Weir W (2011) Haemoparasite prevalence and *Theileria parva* strain diversity in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) in Uganda. *Vet Parasitol* 175:212–219
- Oura, CA, Tait A, Asimwe B, Lubega GW, Weir W (2010) Haemoparasite prevalence and *Theileria parva* strain diversity in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) in Uganda. *Vet Parasitol* 175:212–219
- Packard AS (1869) List of *hymenopterous* and *lepidopterous* insects collected by
- Panziera W, Bianchi RM, Galiza GJN (2014) Aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos do linfoma em bovinos: 128 casos (1965-2013). *Pesq Vet Bras* (34):856-864
- Papadopoulos B, Perié NM, Uilenberg G (1996) Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 1. Serological crossreactions. *Vet Parasitol* 63:41–56
- Papli N, Landt O, Fleischer C, Koekemoer JO, Mans BJ, Pienaar R, Josemans A, Zweygarth E, Potgieter F, Latif AA (2011) Evaluation of a TaqMan real-time PCR for the detection of *Theileria parva* in buffalo and cattle. *Vet Parasitol* 175:356–359

- Park J, Lee S, Chae J, Kwon O, Lee J (1999) Immunization of recombinant membrane protein in *Theileria sergenti*. J Vet Clin Med 16: 328–331
- Pasqualucci L (2013) The genetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. Curr Opin Hematol 20 (4) 336–344
- Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S (2010) Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. Vet Parasitol 173:292–299
- Perera PK, Gasser RB, Anderson GA, Jeffers M, Bell CM, Jabbar A (2013) epidemiological survey following oriental theileriosis outbreaks in Victoria, Australia, on selected cattle farms. Vet Parasitol 197:509–521
- Perera PK, Gasser RB, Firestone SM, Anderson GA, Malmo J, Davis G, Beggs DS, Jabbar A (2014) Oriental theileriosis in dairy cows causes a significant milk production loss. Parasit Vectors 7:467
- Perera PK, Gasser RB, Firestone SM, Smith L, Roeber F, Jabbar A (2015b) Semiquantitative multiplexed tandem PCR for detection and differentiation of four *Theileria orientalis* genotypes in cattle. J Clin Microbiol 53:79–87
- Perera PK, Gasser RB, Pulford DJ, Stevenson MA, Firestone SM, McFadden AMJ, Jabbar A (2015a) Comparison of the performance of three PCR assays for the detection and differentiation of *Theileria orientalis* genotypes. Parasit Vectors 8:192
- Pienaar R, Potgieter FT, Latif AA, Thekisoe OMM, Mans BJ (2014) Geographic distribution of *Theileria sp. (buffalo)* and *Theileria sp. (bougasvlei)* in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) in southern Africa: implications for speciation. Parasitol 141: 411–424
- Pinheiro de Oliveira TF, Fonseca Jr AA, Camargos MF, de Oliveira, AM, Pinto Cottorello AC, Souza A dos R de Almeida, IG, Heinemann MB (2013) Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. Biologicals 41(6): 407–414
- Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, Tangpukdee N, Yuen KW, Guan Y, Looareesuwan S, Malik Peiris JS (2006) Sensitive and inexpensive molecular test for *falciparum malaria*: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop mediated isothermal amplification. Clin Chem 52:303–306
- Produção da Pecuária Municipal (2013) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. v.41. Brasil: Produção da Pecuária Municipal.
- Pulford DJ, Gias E, Bueno IM, McFadden AMJ (2015) Developing high through put quantitative PCR assays for diagnosing Ikeda and other *Theileria orientalis* types common to New Zealand in bovine blood samples. New Zeal Vet J 64:29–37
- Pulford DJ, McFadden A, Hamilton JS, Donald J (2016) Investigation of the index case herd and identification of the genotypes of *Theileria orientalis* associated with outbreaks of bovine anaemia in New Zealand in 2012. Vet J 64(1):21–8

- Raghavan RK, Barker SC, Cobos ME, Barker D, Teo EJM, Foley DH, Nakao R, Lawrence K, Heath ACG, Peterson AT (2019) Potential Spatial Distribution of the Newly Introduced Long-horned Tick, *Haemaphysalis longicornis* in North America. *Sci Rep* 9: 498
- Rajão DS, Bastianetto E, Reis JKP, Oliveira DAA, Lago LA, Leite RC, (2010) Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de Minas Gerais. *Rev Bras Med Vet* 32(1): 42–45
- Rajendran C, Ray DD (2014) Diagnosis of tropical bovine theileriosis by ELISA with recombinant merozoite surface protein of *Theileria annulata* (Tams1) *J. Parasit Dis* 38:41–45
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67(5):901-904
- Ravindran R, Rao JR, Mishra AK, Pathak KML, Babu N, Satheesh CC, Rahul R (2008) *Trypanosoma evansi* in camels, donkeys and dogs in India: comparison of PCR and light microscopy for detection—short communication. *Vet Arhiv* 78: 89–94
- Ribeiro MFB, Reis R (1981) Natural exposure of calves to *Anaplasma marginale* in edemic areas of Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zoot* 33(1): 63-66
- Rigotto C, Sincero T, Simoes C, Barardi C (2005) Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional PCR, nested-PCR and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Res* 39:297–304
- Roberts FHS (1970) Australian Ticks Melbourne: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization
- Rocha U, Serra O, Grock R, Serra R (1969) Natural buffalo infestation from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil, by *Boophilus microplus* (Canestrini, 1997) and by *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), Acari, Ixodidae. *Arq Inst Biol* 36:197–9
- Rodrigues AS (2014) Detecção molecular do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em bovinos do estado de Minas Gerais. In: 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais
- Romero CH, Aguiar AA, Zanolchi HG, Abaracon D, Rowe CA, Silva AG (1981) Susceptibility of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) to enzootic bovine leukosis virus. *Pesq Vet Bras* 1:137–140
- Romero-Salas D, Mira A, Mosqueda J, García-Vázquez Z, Hidalgo-Ruiz M, Vela O (2016) Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Vet Parasitol* 217: 101-107
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61(3):539-42

- Ros-García A, Nicolás A, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A (2012) Development and evaluation of a real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria annulata* in cattle. *Parasit Vectors* 5: 171
- Salih D, Liu Z, Bakheit M, Ali A, El Hussein A, Unger H, Viljoen G, Seitzer U, Ahmed J (2008) Development and evaluation of a loopmediated isothermal amplification method for diagnosis of tropical theileriosis. *Transbound Emerg Dis* 55:238–243
- Salih DE, Ahmed JS, Bakheit MA, Ali EB, El Hussein AM, Hassan SM (2005) Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Parasitol Res* 97: 302–308
- Sarataphan N, Kakuda T, Chansiri K, Onuma M (2003) Survey of benign *Theileria* parasites of cattle and buffaloes in Thailand using allele-specific polymerase chain reaction of major piroplasm surface protein gene. *J Vet Med Sci* 65:133–135
- Sarataphan N, Nilwarangkoon S, Tananyutthawongese C, Kakuda T, Onuma M, Chansiri K (1999) Genetic diversity of major piroplasm surface protein genes and their allelic variants of *Theileria* parasites in Thai cattle. *J Vet Med Sci* 61:991–994
- Sastry GA (1983) *Veterinary pathology*. 6th ed. Delhi, India: CBS Publishers and Distributors; 700–5
- Sato M, Kamio T, Kawazu S, Taniguchi T, Minami T, Fujisaki K (1993) Histological observations on the schizonts in cattle infected with Japanese *Theileria sergenti*. *J Vet Med Sci* 55(4):571–4
- Savani G, Onuma M, Scaramozzino P, Kakuda T, Semproni G, Langella V (1998) First report of *Theileria sergenti* and *T. buffeli/orientalis* in cattle in Italy. *A N Y Acad Sci* 849(1):404–407
- Schein E, Mehlhorn H, Warnecke M (1978) Electron microscopic studies on the schizogony of four *Theileria* species of cattle (*T. parva*, *T. lawrencei*, *T. annulata* and *T. mutans*). *Protistolog* 14: 337–348
- Schein E, Voigt WP (1979) Chemotherapy of Theileriosis in cattle. *Advances in the control of Theileriosis*. *Curr. Top Vet Med Anim Sci* 14: 212–214
- Serra-Freire NM, Amorim M, Gazeta GS, Guerim L, Desidério MHG (1996) Ixodidae of deer in Brazil. *Ver Bras Ciênc Vet* 3:51–54
- Shastri UV, Jadhav KV, Pathak SV, Shastri SR, Deshpande PD (1985) Studies on *Theileria* sp. from buffalo, *Bubalus bubalis*, from Maharashtra. *Indian J Parasitol* 9: 275–9
- Shastri UV, Pathak SV, Jadhav KV, Deshpande PD (1988) Occurrence of *Theileria orientalis* in bovines from Maharashtra state and its transmission by *Haemaphysalis bispinosa* ticks. *Indian J Parasitol* 12:173–7
- Shaw MK (2003) Cell invasion by *Theileria* sporozoites. *Trends Parasitol* 19:1–5

- Shayan P, Rahbari S (2005) Simultaneous differentiation between *Theileria* spp. and *Babesia* spp. on stained blood smear using PCR. *Parasitol Res* 97(4):281-6
- Shiels B, Langsley G, Weir W, Pain A, McKellar S, Dobbelaere D (2006) Alteration of host cell phenotype by *Theileria annulata* and *Theileria parva*: mining for manipulators in the parasite genomes. *Int J Parasitol* 36(1):9-21
- Shimizu S, Suzuki K, Nakamura K, Kadota K, Fujisaki K, Ito S, Minami T (1988) Isolation of *Theileria sergenti* piroplasms from infected erythrocytes and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *T. sergenti* infections. *Res Vet Sci* 45:206–212
- Shimizu S, Yoshiura N, Mizomoto T, Kondou Y (1992) *Theileria sergenti* infection in dairy cattle. *J Vet Med Sci* 54:375–377
- Shiono H, Yagi Y, Thongnoon P, Kurabayashi N, Chikayama Y, Miyazaki S, Nakamura I (2001) Acquired methemoglobinemia in anemic cattle infected with *Theileria sergenti*. *Vet Parasitol* 102: 45–51
- Sibeko KP, Oosthuizen MC, Collins NE, Geysen D, Rambritch NE, Latif AA, Groeneveld HT, Potgieter FT, Coetzer JA (2008) Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction test for the detection of *Theileria parva* infections in Cape buffalo (*Syncerus caffer*) and cattle. *Vet Parasitol* 155:37–48
- Silva AS, Lopes LS, Diaz JDS, Tonin AA, Stefani LM, Araujo DN (2013a) Lice Outbreak in Buffaloes: Evidence of *Anaplasma marginale* Transmission by Sucking Lice *Haematopinus tuberculatus*. *J Parasitol* 99(3): 546-547
- Silva JB da, André MR, Fonseca AH, Lopes CTA, Lima DHS, Andrade SJT (2013b) Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the north region of Brazil. *Vet Parasitol* 197:678-681
- Silva JB, Cabezas-Cruz A, Fonseca AH, Barbosa JD, de la Fuente J (2014c) Infection of water buffalo in Rio de Janeiro Brazil with *Anaplasma marginale* strains also reported in cattle. *Vet Parasitol* 205:730-734
- Silva JB, Gonçalves RL, Varani AM, André MR, Machado RZ (2015) Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. *Tick Tick Borne Dis* 6: 499-507
- Silveira JA, Rabelo EM, Lacerda AC, Borges PA, Tomás WM, Pellegrin AO, Tomich RG, Ribeiro MF (2013) Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* (4):341-5
- Silveira JAG, de Oliveira CHS, Silvestre BT, Albernaz TT, Leite RC, Barbosa JD, Oliveira CMC, Ribeiro MFB (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 Tick Borne Dis* 7:1017–1023

Silveira JAG, Rabelo EML, Ribeiro MFB 2011 Detection of *Theileria* and *Babesia* in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in the State of Minas Gerais, Brazil. Vet Parasitol 177: 61-66

Singh B, Singh KP, Parihar NS (1979) Clinicopathological studies on lymphosarcoma in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). Zentralbl Veterinarmed A 26 (6): 468-481

Singh B, Singh KP, Parihar NS (1980) Lymphosarcomatous involvement of reproductive and endocrine organs in Indian buffalo. Zentralbl Veterinarmed A 27(7):583-92

Singh CM (1968) Lymphosarcoma in Indian buffaloes. Bibl Haematol 30:237-43

Singh CM, Singh B, Parihar NS (1973) Pulmonary involvement in lymphosarcoma of Indian buffaloes. Bibl Haematol 39:220-7

Sivakumar T, Hayashida K, Sugimoto C, Yokoyama N (2014a) Evolution and genetic diversity of *Theileria*. Infect Genet Evol 27:250-263

Sivakumar T, Yoshinari T, Igarashi I, Kothalawala H, Abeyratne SAE, Vimalakumar SC, Meewewa AS, Kuleswarakumar K, Chandrasiri ADN, Yokoyama N (2013) Genetic diversity within *Theileria orientalis* parasites detected in Sri Lankan cattle. Ticks Tick Borne Dis 4:235-241

Sivakumar, T, Tattiyapong M, Fukushi S, Hayashida K, Kothalawala H, Silva SS (2014b) Genetic characterization of *Babesia* and *Theileria* parasites in water buffaloes in Sri Lanka. Vet Parasitol 200: 24-30

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. Syst Biol 57(5):758-71

Stevenson M (2008) Palmerston North IVABS. An Int Vet Epid 109

Stewart NP, De Vos A J, McGregor W, Shield IA (1988) Observation on the development of tick-transmitted *Theileria buffeli* (syn. *T. orientalis*?) in cattle. Res Vet Sci 44: 338-342

Stewart NP, de Vos AJ, McHardy N, Standfast NF (1990) Elimination of *Theileria buffeli* infections from cattle by concurrent treatment with buparvaquone and primaquine phosphate. Trop Anim Health Prod 22 (2):116-122

Stewart NP, Devos AJ, McGregor W, Shiels I (1987a) *Haemaphysalis humerosa*, not *Haemaphysalis longicornis*, is the likely vector of *Theileria buffeli* in Australia. Aust Vet J 64:280-282

Stewart NP, Devos AJ, Shiels I, McGregor W (1987b) The experimental transmission of *Theileria buffeli* of cattle in Australia by *Haemaphysalis humerosa*. Aust Vet J 64:81-83

Stewart NP, Standfast NF, Baldock FC, Reid DJ, de Vos AJ (1992) The distribution and prevalence of *Theileria buffeli* in cattle in Queensland. Aust Vet J 69(3):59-61

- Stewart NP, Uilenberg G, de Vos AJ (1996) Review of Australian species of *Theileria*, with special reference to *Theileria buffeli* of cattle. *Trop Anim Health Prod* 28(1):81
- Stockham SL, Kjemtrup AM, Conrad PA, Schmidt DA, Scott MA, Robinson TW (2000) Theileriosis in a Missouri beef herd caused by *Theileria buffeli*: case report, herd investigation, ultrastructure, phylogenetic analysis, and experimental transmission. *Vet Pathol* 37(1):11–21
- Sugimoto C, Fujisaki K. Non-transforming *Theileria* parasites of ruminants. In: Dobbelaere D, McKeever D, editors. *Theileria*, vol. 3. New York: Springer; 2002. p. 93–106
- Swilks E, Fell SS, Hammer JF, Sales N, Krebs L, Jenkins C (2017b). Transplacental transmission of *Theileria orientalis* occurs at a low rate in field affected cattle: infection in utero does not appear to be a major cause of abortion. *Parasite Vectors*. 10: 227–236
- Swilks E, Jenkins C, Poynting A, Collins D, Krebs G (2017a) The prevalence and effect of *Theileria orientalis* infection in home-bred calves of the Gloucester region of New South Wales. *Aust Vet J*
- Tajeri S, Haidar M, Sakura T, Langsley G (2021) Interaction between transforming *Theileria* parasites and their host bovine leukocytes. *Mol Microbiol* 115: 860–869
- Tajeri S, Langsley G (2021) *Theileria* secretes proteins to subvert its host leukocyte. *Biol Cell* 113: 220–233
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 25(3)8(7):3022–3027
- Tanaka MA, Onoe S, Matsuba T, Katayama S, Yamanaka M, Yonemichi H, Hiramatsu K, Baek BK, Sugimoto C, Onuma M (1993) Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *J Clin Microbiol* 31:2565–2569
- Teixeira, MAS, Machado FMC, Sarmiento NMFP, Oliveira Júnior CA, Riet Correa G, Cerqueira VD, França TN, Bezerra Júnior OS (2018). Aspectos patológicos e imuno-histoquímicos da polisserosite em búfalos (*Bubalus bubalis*). *Pesq Vet Bras* 38:1
- Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Jittapalapong S, Xuan X (2011) Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet Parasitol* 178: 201–207
- the Smithsonian Expedition to South America, under Prof. James Orten; appendix to report on Articulates. *Annual Report of the Peabody Academy of Sciences* 56–69
- Theiler A (1906) *Piroplasma mutans* (n. spec.) of South African cattle. *J Comp Pathol Ther* 19:292–300
- Thekisoe OM, Rambritch NE, Nakao R, Bazie RS, Mbatia P, Namangala B, Malele I, Skilton RA, Jongejan F, Sugimoto C (2010) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays

for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes. *Int J Parasitol* 40:55–61

Thekiso OMM, Bazie RSB, Coronel-Servian AM, Sugimoto C, Kawazu S, Inoue N (2009) Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. *J Vet Med Sci* 71:471–475

Thompson AT, White S, Shaw D, Egizi A, Lahmers K, Ruder MG, Yabsley MJ (2020) *Theileria Orientalis Ikeda* in Host-Seeking *Haemaphysalis Longicornis* in Virginia, U.S.A. *Ticks Tick Borne Dis* 11:101450

Thompson BE, Latif AA, Oosthuizen MC, Troskie M, Penzhorn BL (2008) Occurrence of *Theileria parva* infection in cattle on a farm in the Ladysmith district, KwaZulu-Natal, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 79: 31–35

Todorovic RA (1975) Serological diagnosis of babesiosis: A review. *Trop Anim Hlth Prod* 7: 1-14

Todorovic RA, Carson CA (1981) Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In: M. Ristic and J.P. Kreier (Editors), *Babesiosis*. Academic Press, New York, pp. 381-410

Todorovic RA, Long RF (1976) Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp infections in Colombian cattle. *Tropenmed Parasitol* 27(2):169-81

Torres C, Vitalis EA, Baker BR, Gardner SN, Torres MW, Dzenitis JM (2011) LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loopmediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Bioinformatics* 12:240

Tretina K, Gotia HT, Mann DJ, Silva JC (2015) *Theileria*-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitol* 31: 306-314

Uilenberg G (1981) Theilerial species of domestic livestock. In: Irvin AD, Cunningham MP, Young AS, editors. *Advances in the Control of Theileriosis*. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Vol. 14. Dordrecht: Springer pp. 4-37

Uilenberg G (1995) International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol* 57:19–41

Uilenberg G (2011) *Theileria sergenti*. *Vet Parasitol* 175:386

Uilenberg G, Mpangala C, McGregor W, Callow LL (1977) Biological differences between african *Theileria Mutans* (Theiler 1906) and two benign species of *Theileria* of cattle in Australia and Britain. *Aust vet J* 53: 271- 386

Uilenberg G, Perie NM, Spanjer AA, Franssen FF (1985) *Theileria orientalis*, cosmopolitan parasites of cattle demonstration of the schizont stage. *Res Vet Sci* 38: 352–60

- Uilenberg G, Perié NM, Spanjer AA, Franssen FF (1985) *Theileria orientalis*, a cosmopolitan blood parasite of cattle: demonstration of the schizont stage. *Res Vet Sci* 38:352–360
- Vale-Echeto OE, Montiel-Urdaneta N, Simoes D (2009) Linfoma multicêntrico o linfossarcoma multicêntrico en Búfalo de água (*Bubalus bubalis*): Estudio Anatomopatológico. Reporte de un caso *Revista Cient* 19:257–63
- Vink W, Lawrence K, McFadden A, Bingham P (2016) An assessment of the herd-level impact of the *Theileria orientalis* (Ikeda) epidemic of cattle in New Zealand, 2012–2013: a mixed methods approach. *N. Z. Vet. J.* 64, 48–54.
- Vinodkumar K, Shyma V, Justin DK, Ashok S, Anu JP, Mini K (2015) Fatal *Theileria orientalis* N2 genotype infection among Asian water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in a commercial dairy farm in Kerala, India. *Parasitol* 143 (1): 69-74
- Von Schubert C, Xue G, Schmuckli-Maurer J, Woods KL, Nigg EA, Dobbelaere DA (2010) The transforming parasite *Theileria* co-opts host cell mitotic and central spindles to persist in continuously dividing cells. *PLoS Biol* 8(9):e1000499
- Wang CT (1991) Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. *J Vet Med Sci* 53(3): 395–398
- Wang LX, He L, Fang R, Song QQ, Tu P, Jenkins A, Zhou YQ, Zhao JL (2010b) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Theileria sergenti* infection targeting the p33 gene. *Vet Parasitol* 171:159–162
- Wang LX, Zhao JH, He L, Liu Q, Zhou DN, Zhou YQ, Zhao JL (2010a) An indirect ELISA for detection of *Theileria sergenti* antibodies in water buffalo using a recombinant major piroplasm surface protein. *Vet Parasitol* 170:323–326
- Watts J, Playford M, Hickey K (2016) *Theileria orientalis*: a review. *New Zeal Vet J* 64:3–9
- Wenyon CM (1926) Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists. Vol. 2. New York: Hafner Publishing Company
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTech* 39:75 85
- Yakimoff W, Dekhtereff N (1930) Zur frage über die Theileriose in Ostsibirien. *Archiv für Protistenkunde* 72:176-189
- Yakimoff W, Soudatschenkoff W (1931) Zur frage der piroplasmiden der rinder in Ost-Sibirien. *Archiv für Protistenkunde* 75:179-190
- Yam J, Bogema DR, Jenkins C (2018) Oriental Theileriosis. In: Abubakar M, Perera P. (Eds.), *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. IntechOpen, pp. 1–31
- Yin H, Luo J, Schnittger L, Lu B, Beyer D, Ma M, Guan G, Bai Q, Lu C, Ahmed J (2004) Phylogenetic analysis of *Theileria* species transmitted by *Haemaphysalis qinghaiensis*. *Parasitol Res* 92: 36–42

- Yokoyama N, Ueno A, Mizuno D, Kuboki N, Khukhuu A, Igarashi I, Miyahara T, Shiraishi T, Kudo R, Oshiro M, Zakimi S, Sugimoto C, Matsumoto K, Inokuma H (2011) Genotypic diversity of *Theileria orientalis* detected from cattle grazing in Kumamoto and Okinawa prefectures of Japan. J Vet Med Sci 73:305–312
- Young AS, Grootenhuys JG, Kimber CD, Kanhai GK, Stagg DA (1977) Isolation of a *Theileria* species from Eland (*Taurotragus oryx*) infective for cattle. Tropenmed Parasitol 27: 185–194
- Young AS, Purnell RE, Payne RC, Brown CGD, Kanhai GK (1978) Studies on the transmission and course of infection of Kenya strain of *Theileria mutans*. Parasitol 76: 99-115
- Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R (2000) Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. Vet Parasitol 89(3): 241-248
- Zakimi S, Kim JY, Oshiro M, Hayashida K, Fujisaki K, Sugimoto C (2006) Genetic diversity of benign *Theileria* parasites of cattle in the Okinawa Prefecture. J Vet Med Sci 68:1335–8
- Zava MARA (1984) Produção de búfalos - Instituto Campineiro de Ensino Agrícola
- Zweygarth E, Benade J, Steyl J, Prozesky L, Koekemoer O, Josemans AI, (2009) In vitro cultivation of a *Theileria* species from a roan antelope (*Hippotragus equinus*). Parasitol Res 105:1755-1757