



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Leticia Gomes de Pontes

**ASPECTOS CRUCIAIS SOBRE DOENÇAS EM BÚFALOS
SORODOADORES: DO MANEJO DOS ANIMAIS À
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE
SANIDADE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

**Botucatu
2018**

Leticia Gomes de Pontes

**ASPECTOS CRUCIAIS SOBRE DOENÇAS EM BÚFALOS
SORODOADORES: DO MANEJO DOS ANIMAIS À
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE
SANIDADE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Doenças
Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Pontes, Leticia Gomes de.

Aspectos cruciais sobre doenças em búfalos sorodoadores
: do manejo dos animais à identificação de marcadores
moleculares de sanidade / Leticia Gomes de Pontes. -
Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Lucilene Delazari dos Santos

Coorientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Capes: 10604006

1. Brucelose. 2. Proteômica. 3. Soro. 4. Búfalo. 5.
Sorodiagnóstico.

Palavras-chave: Análise proteômica; Brucelose;
Sorodoadores; Theileriose.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Lucilene Delazari dos Santos
Presidente e Orientadora
Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)
Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP

Dra. Thaís Regiani Cataldi
Membro Titular
Laboratório de Genética Faculdade
Universidade de São Paulo (USP/ESALQ), Piracicaba, SP

Dra. Liria Hiromi Okuda
Membro Titular
Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP

Dr. Tiago Jose da Silva Lopes
Membro Titular
ERATO Kawaoka for infections diseases
Universidade de Tóquio, Japão

Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt
Membro Titular
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP

Data da Defesa: 19 de Dezembro de 2018

Dedicatória



Dedicatória

Dedico ...

Pensando para escrever essa dedicatória, eu relembrei toda trajetória pessoal e profissional que percorri para que pudesse chegar até aqui. Horas sendo monitor de disciplinas da graduação, horas de iniciação científica, horas como bolsista técnico FAPESP e horas como professora do cursinho preparatório, tudo para me formar em Biologia na Universidade Estadual Paulista UNESP/ Bauru.

Acredito que eu não escolhi o meu caminho e sim, ele quem me escolheu. Há cerca de sete anos, eu entrei como bolsista técnica no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP. Me apaixonei e ali fiquei!

No Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos realizei meu mestrado e estou aqui agora finalizando o meu doutorado.

Estudei muito, conheci novos laboratórios, novas pessoas, tive a oportunidade de orientar e desenvolver cursos na área. Tudo me fez grande... me fez uma pessoa melhor. Apreendi muitas coisas novas, fiz muitos amigos que se foram no decorrer do tempo. Apesar das dificuldades nunca desisti mas sempre quis mais.... mais de mim e mais das pessoas à minha volta.

Hoje eu tenho certeza que fiz a melhor escolha, que trilhei o meu melhor caminho.

Dedico esse trabalho, a toda a minha família e à todos os meus planos e pensamentos futuros.

Agradecimentos



Agradecimentos

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP pela infraestrutura e condições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP pela oportunidade de fazer parte dessa equipe e aos funcionários que sempre me auxiliaram. Aos meus colegas de trabalho e amigos do CEVAP que estiveram presentes durante todos esses anos. Aprendi demais com cada um de vocês. Obrigada pelos ensinamentos profissionais e, principalmente, pelos momentos compartilhados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho de pesquisa.

Agradeço, à minha orientadora, **Dra. Lucilene Delazari dos Santos**, pela oportunidade em realizar meu mestrado e meu doutorado e por acreditar em mim na execução dessa pesquisa. Sou grata por tudo o que aprendi nesses anos de convivência e de muito trabalho. Você é um exemplo de profissional e uma ótima amiga, ouvinte, sensível com as particularidades de cada um.

Agradeço ao **Dr. Benedito Barraveira** e ao **Dr. Rui Seabra Ferreira Junior** pela oportunidade de trabalhar com o Selante de Fibrina, pela oportunidade de fazer parte da equipe científica do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) e pelo apoio nessa parte tão importante da minha formação.

Aos companheiros do Instituto Biológico de São Paulo, alunos, professores e funcionários que participaram positivamente na formação acadêmico-científica, por serem tão prestativos e estarem sempre presentes eu agradeço. Em especial a **Dra. Liria Hiromi Okuda**, pelo incentivo, pela doação, pela troca de conhecimento e profissionalismo. A **Táís Ávila**, te admiro por

sempre saber como nos incentivar, ter uma palavra de elogio, pelo ombro amigo em momentos difíceis.

As pesquisadoras **Dra. Simone Baldini Luccheis** e **Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira** por disponibilizar todo o seu conhecimento e o seu laboratório para a realização da parte experimental deste projeto.

Ao senhor **Aristides Pavan**, proprietário da fazenda e a todos os seus funcionários que sempre nos ajudaram nas coletas de sangue dos búfalos.

Ao veterinário **Guilherme Shin Iwamoto Haga** pelas suas contribuições inestimáveis na coleta e por sua experiência profissional.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

Epígrafe



"Life is what happens to you while
you're busy making other plans"

"Vida é o que acontece com você
enquanto você está ocupado fazendo
outros planos"

John Lennon

Resumo



DE PONTES, L.G. **Aspectos Cruciais Sobre Doenças Em Búfalos Sorodoadores: Do Manejo Dos Animais À Identificação De Marcadores Moleculares De Sanidade.** Botucatu, 2018. 96 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O uso de animais de grande porte como sorodoadores tem se mostrado de grande importância para a produção do selante de fibrina do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP). O objetivo deste trabalho foi certificar um plantel de bubalinos, realizar uma investigação sobre os potenciais candidatos à biomarcadores de brucelose em soro de búfalos e evidenciar o isolamento e a quantificação pioneira de exossomos (EVs) do soro de bubalinos com theileriose e babesiose. Realizaram-se os seguintes testes sorológicos: brucelose (BRU), leptospirose (LEP), febre aftosa (FMD), rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD), varíola bovina (Pox) e tuberculose, língua azul (BTV), estomatite vesicular (EV) - sorotipos coccal (COCV) e alagoano (VSAV), leucose bovina (BLV), neospora (NC), toxoplasmose (TX) e testes bioquímicos laboratoriais. Todas as amostras de soro foram submetidas ao diagnóstico sorológico para detecção de brucelose, diagnóstico de reação em cadeia da polimerase para detecção de theileriose e babesiose, cromatografia líquida de afinidade, isolamento de exossomos, digestão de proteínas em solução, análise de espectrometria de massa e ferramentas de bioinformática. Observamos um enriquecimento de 90,5% de proteínas nos soros de búfalos após este protocolo de depleção. A análise MS/MS evidenciou que as principais diferenças no proteoma dos animais com brucelose. No que se refere ao exossomos isolados e quantificados neste trabalho, nossa metodologia é fortemente encorajadas para o isolamento e caracterização de EVs em infecções por Apicomplexa em animais de fazenda. Concluímos que este estudo em diferentes frentes como manejo, doenças infecciosas e doenças parasitárias pode ser empregado em pequenas propriedades e em escala nacional para o controle de doenças e notificação obrigatória e doenças de grande perda econômica.

Palavras-chaves: Sorodoadores, Brucelose, Theileriose, Análise Proteômica, Shotgun, Vesículas Extracelulares.

Abstract



DE PONTES, L.G. **Crucial Aspects About Diseases in Buffalo Serum Donors: From Animal Management to Identification of Molecular Biomarkers Of Healthy**. Botucatu, 2018. 96 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The use of large animals as sorbozers has been shown to be of great importance for the production of fibrin sealant from the Center for the Study of Venoms and Poisonous Animals (CEVAP). The objective of this work was to certify a flock of buffaloes, to conduct an investigation of the potential candidates for brucellosis biomarkers in buffalo serum and to evidence the isolation and the pioneer quantification of buffalo serum exosomes (EVs) with theileriose and babesiosis. The following serological tests were carried out: brucellosis (BRU), leptospirosis (LEP), foot-and-mouth disease (FMD), infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine viral diarrhea (BVD), bovine pox (Pox) and tuberculosis, blue tongue (BTV), vesicular stomatitis (EV) - coccal (COCV) and alagoan (VSAV) serotypes, bovine leukosis (BLV), neospora (NC), toxoplasmosis (TX) and laboratory biochemical tests. All serum samples were submitted: 1) serological test; 2) Polymerase chain reaction; 3) Depletion; 4) Isolation of exosomes; 5) Mass spectrometry and 6) Analysis and interpretation of the data. The MS / MS analysis showed that the major differences in the proteome of animals with brucellosis. Regarding the isolated and quantified exosomes in this work, our methodology is strongly encouraged for the isolation and characterization of EVs in Apicomplexa infections in farm animals. We conclude that this study on different fronts such as management, infectious diseases and parasitic diseases can be used in small properties and nationally for the control of diseases and mandatory notification and diseases of great economic loss.

Keywords: Serum Donors, Brucellosis, Theileriose, Proteomic Analysis, Shotgun, Extracellular Vesicles.

Sumário



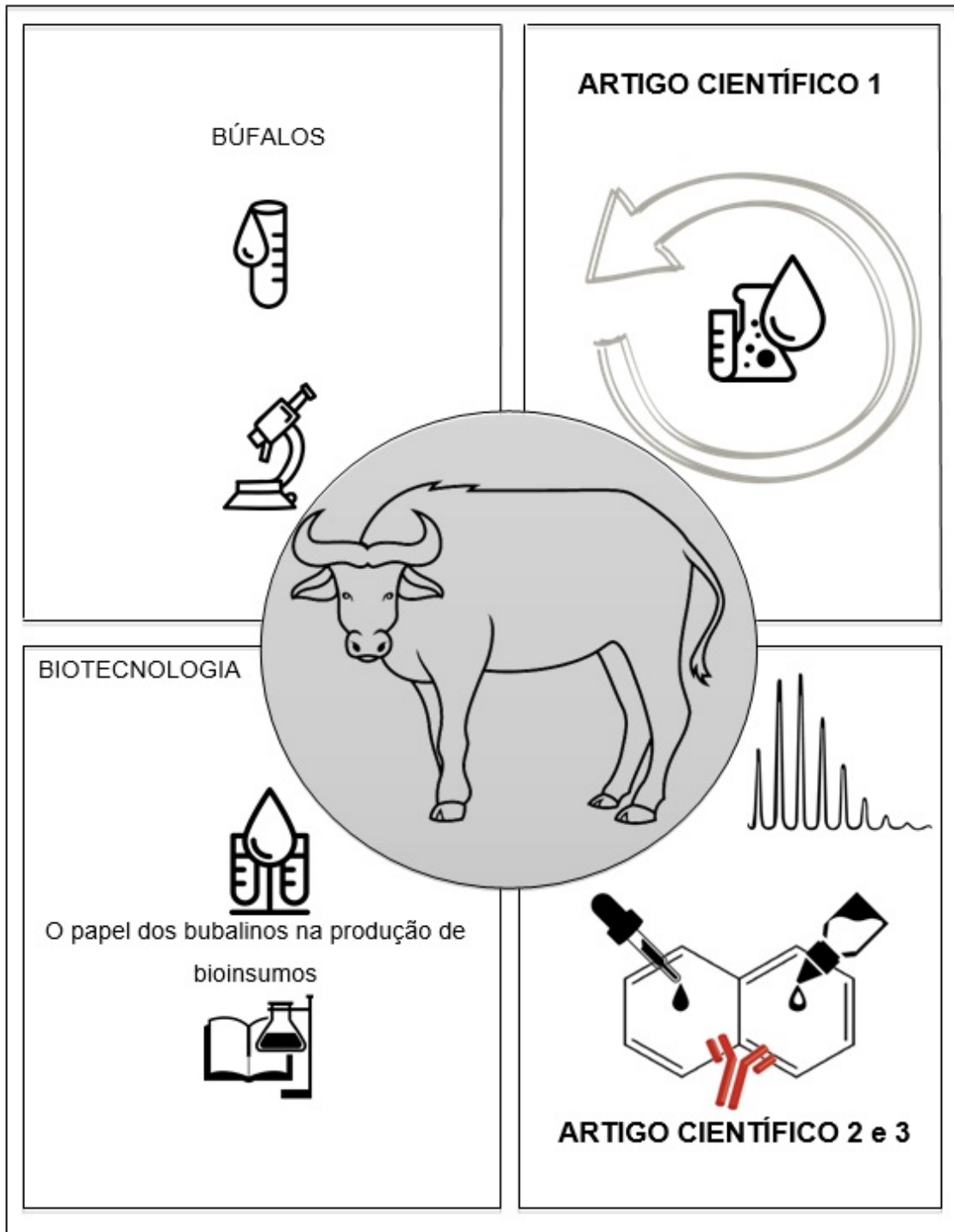
SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Artigo Científico I: PERSPECTIVAS CRUCIAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DO SELANTE HETERÓLOGO UTILIZADO EM ÚLCERAS VENOSAS CRÔNICAS: UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE ANAPLASMOSE EM BUBALINOS (<i>Bubalus bubalis</i>)..... | 1 |
| Artigo Científico II: IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS CANDIDATOS A BIOMARCADORES DE BRUCELOSE EM SORO DE BÚFALOS UTILIZANDO ANÁLISE PROTEÔMICA..... | 54 |
| Artigo Científico III: VESICULAS EXTRACELULARES EM DOENÇAS INFECCIOSAS CAUSADAS POR PARASITAS APICOMPLEXOS: UM ESTUDO PILOTO..... | 84 |

Fluxo de trabalho



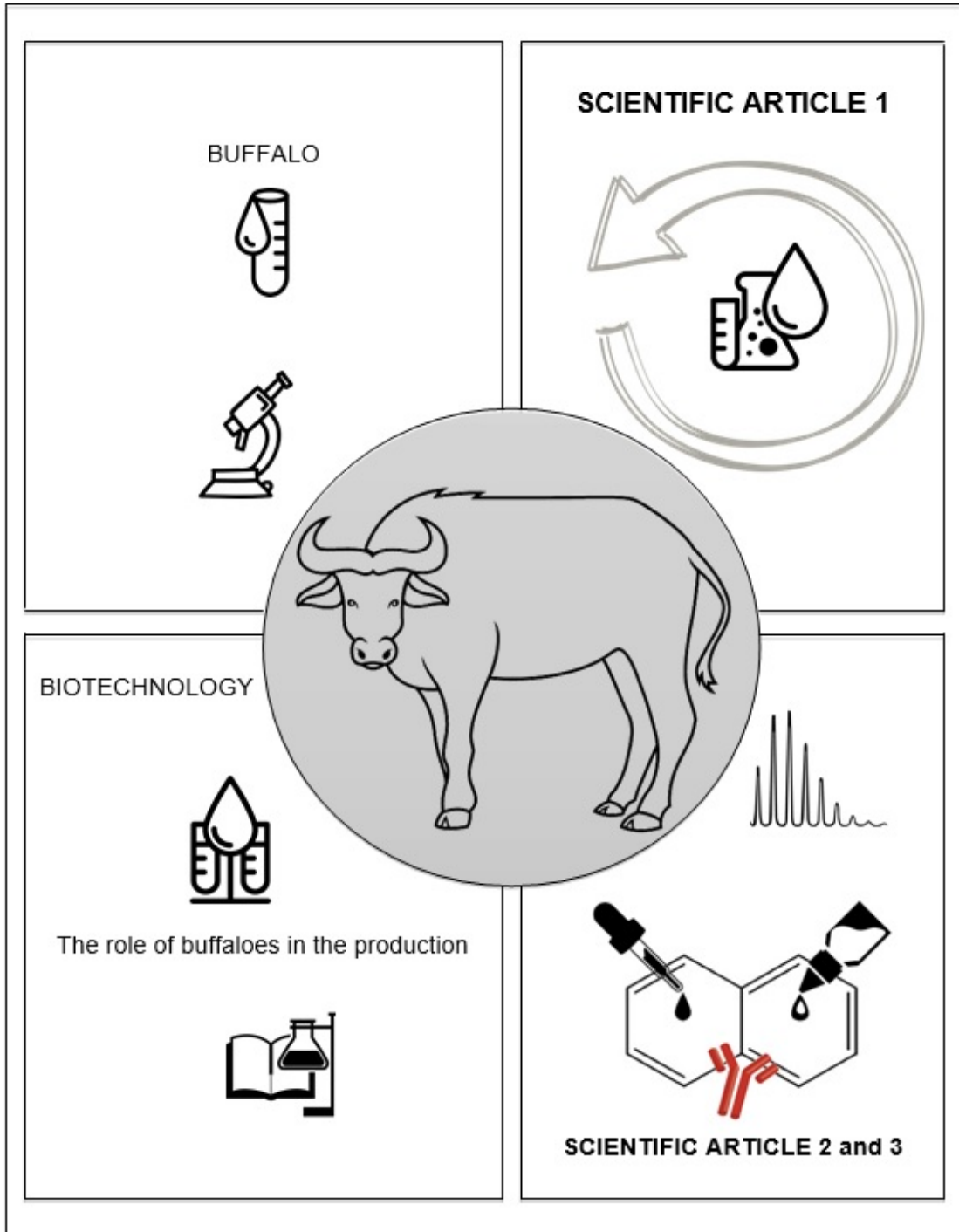
FLUXO DE TRABALHO



workflow



WORKFLOW



Artigo Científico I

**PERSPECTIVAS CRUCIAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DO SELANTE
HETERÓLOGO UTILIZADO EM ÚLCERAS VENOSAS CRÔNICAS: UM ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO DE ANAPLASMOSE EM BUBALINOS (*Bubalus bubalis*)**

***Crucial insights for heterologous sealant design used in chronic venous
ulcers: an epidemiological study of anaplasmosis in buffaloes (*Bubalus
bubalis*)***

RESUMO

Introdução

O Selante de Fibrina Heterólogo é um produto biológico que consiste de uma serinoprotease extraída do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e do crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído do sangue de bubalinos *Bubalus bubalis*. O objetivo deste trabalho foi certificar um plantel bubalino para produção de selante, o qual atualmente, está sendo utilizado no tratamento de pacientes com úlceras venosas crônicas por meio de um Ensaio Clínico Fase I/II, em conformidade com as normas regulamentadoras da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Métodos

Para este estudo utilizamos 29 machos e 28 fêmeas de Búfalos (*Bubalus bubalis*), com 18 meses de idade, foram avaliados por meio de exames clínico-laboratoriais e monitorados semestralmente entre 04/09/2014 e 27/03/2017. No início do manejo do rebanho, realizaram-se os seguintes testes sorológicos para melhor conhecer o estado sanitário dos animais: brucelose (BRU), leptospira (LEP), febre aftosa (FMD), rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarreia viral bovina (BVD), varíola bovina (Pox) e tuberculose, língua azul (BTV), estomatite vesicular (EV) - sorotipos cocal (COCV) e alagoano (VSAV), leucose bovina (BLV), neosporose (NC), toxoplasmose (TX), tuberculose (TB) eimeriose (E) e pesquisa de ovos de strongilídeos (POE). Testes bioquímicos laboratoriais para proteínas de fase aguda (haptoglobina e fibrinogênio) foram realizados semestralmente. As amostras que se mostraram positivas para hemoparasitas foram submetidas ao exame de reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação da infecção parasitária.

Resultados

Os resultados preliminares evidenciaram que, nenhum animal foi positivo para tuberculina. Oito foram positivos para Eimeriose e cinco para pesquisa de ovos de

estrongilídeos. Em relação aos testes sorológicos: nenhum animal foi reativo para FA, Pox, BTV, EV, BLV e LEP. O teste para brucelose (BRU) foi positivo para um, dois casos de IBR e seis de BVD. A toxoplasmose foi positiva em nove e, neosporose em 11 casos. As concentrações de haptoglobina determinadas durante todo o estudo para animais saudáveis variaram de 5,3 à 12,7 mg/dL. Durante o estudo, quatro animais apresentaram hemocultura positiva para *Theileria spp.*, cinco para *Babesia bovis* e quatro para *Theileria spp.* e *Babesia bovis*. No surto de anaplasmosse ocorrido em 02/02/2016, determinou-se que, a amplitude de variação da haptoglobina para animais saudáveis é de 11,6 à 19,7 mg/dL. Paralelamente, evidenciou-se também que após o surto, os valores de fibrinogênio no sangue dos animais, variaram de 405,53 a 1.168,70 com uma média de 728,61 mg/dL. A margem de segurança para animais saudáveis variou de 400 a 785,5 mg/dL. A reação de PCR confirmou a presença dos hemoparasitos de *Theileria spp* e *Babesia bovis*.

Conclusões

O manejo de búfalos é complexo, requer reavaliações periódicas, sendo necessário um marcador sensível. A análise da proteína de fase aguda haptoglobina, juntamente com testes clínicos e laboratoriais, permitiu estabelecer limites matemáticos confiáveis para a saúde animal, bem como mostrar que os búfalos doentes eram exceções.

Palavras-chave: Búfalos, Manejo, Proteína de fase aguda, Haptoglobina, Saúde animal.

ABSTRACT

Background

The heterologous fibrin sealant is a biological product consisting of a serinoprotease extracted from the venom of *Crotalus durissus terrificus* and a fibrinogen-rich cryoprecipitate extracted from the blood of buffaloes *Bubalus bubalis*. The objective of this study was to certify a buffalo herd for sealant production and subsequent treatment of patients with chronic venous ulcers in a phase I/II clinical trial, in compliance with the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) regulatory norms.

Methods

Fifty-seven buffaloes (*Bubalus bubalis*), 29 males and 28 females, 18 months of age, were evaluated by means of clinical and laboratorial exams and monitored semiannually between 09/04/2014 and 03/27/2017. The following serological tests were performed: brucellosis (BRU), leptospira (LEP), foot mouth disease (FMD), infectious bronchitis rhinitis (IBRF), bovine pox (Pox) and tuberculosis, bluetongue virus (BTV), vesicular stomatitis (EV) - cocal (COCV) and alagoano (VSAV) serotypes, bovine leukosis virus (BLV), neosporosis (NC) and strongylid egg research (POE). Laboratory biochemical tests for acute phase proteins (haptoglobin and fibrinogen) were performed semiannually. Samples that were positive for hemoparasites were submitted to a polymerase chain reaction (PCR) test to confirm the parasitic infection.

Results

The preliminary results evidenced that no animal tested positive for tuberculin. Eight were positive for *Eimeria* and five for strongylid egg research. Regarding the serological tests: no animals were reactive for FA, Pox, BTV, EV, BLV and LEP. The test for BRU was positive

for one, two IBR and BVD 6 cases. Toxoplasmosis was positive in nine and neosporosis in 11 cases. The haptoglobin concentrations determined throughout the study for healthy animals ranged from 5.3 to 12.7 mg / dL. During the study, four animals showed positive blood culture for *Theileria spp.*, five for *Babesia bovis* and four for *Theileria spp.* and *Babesia bovis*. In the outbreak of anaplasmosis that occurred on 02/02/2016, it was determined that, the range of variation of haptoglobin in the healthy animals ranged from 11.6 to 19.7 mg/dL. At the same time, it was also evidenced that after this outbreak, the values of fibrinogen in the blood of the animals ranged from 405.53 to 1,168.70 with an average of 728.61 mg/dL. The safety margin for healthy animals ranged from 400 to 785.5 mg/dL. The PCR reaction confirmed the presence of *Theileria spp* and *Babesia bovis* hemoparasites.

Conclusions

Buffalo management is complex, requiring periodic reevaluations, requiring a sensitive marker. The analysis of the acute phase protein haptoglobin, together with clinical and laboratory tests, allowed to establish reliable mathematical limits for animal health, as well as to show that the buffalo patients were exceptions.

Keywords: Buffaloes, Management, Acute phase protein, Haptoglobin, Animal health.

1. INTRODUÇÃO

Existem cerca de 158 milhões de búfalos de água (*Water buffalo*) no mundo, sendo que 97% deles estão na Ásia^{1,2,3}. Os búfalos são uma espécie chave para os pequenos produtores nos países em desenvolvimento⁴ e um recurso importante para obtenção de fibrinogênio na produção do selante de fibrina heterólogo, atualmente^{5,6}. Búfalos domésticos têm distribuição global e são encontrados em 129 países, principalmente tropicais e subtropicais^{7,8}. Há muitos países onde os búfalos são mais importantes que o gado bovino, como Índia e Paquistão e, isso se deve a grande habilidade de adaptação, elevada fertilidade e longevidade produtiva destes animais⁹.

Segundo censo do IBGE de 2016 e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística da produção pecuária brasileira, estima-se que no Brasil, a criação de búfalo tem um crescimento anual de 4,7%¹⁰. Do total de 1,5 milhões de cabeças, a região Norte do Brasil concentra 64,3% destes animais¹¹. O manejo sanitário para a produção de búfalos varia amplamente em diferentes países, dependendo da economia local, clima, geografia, sistemas de cultivo, tamanho das fazendas e objetivo principal para a produção de búfalos: leite, carne ou sorodoadores¹²⁻¹⁴.

A matéria-prima de origem animal possui um mercado promissor por ser o início da linha de produção para as indústrias e centros de pesquisas em biotecnologia¹⁵. O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da UNESP produz atualmente, o Selante de Fibrina Heterólogo, o qual atua como cola biológica em procedimentos cirúrgicos e também, no tratamento de úlceras venosas crônicas. A equipe de pesquisadores do CEVAP propôs a prospecção de um selante de fibrina a partir de uma serinoprotease extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* associada ao crioprecipitado rico em fibrinogênio

extraído de bubalinos. Segundo Thomazini-Santos e colaboradores (1998), o plasma de búfalos da espécie *Bubalus bubalis* apresenta uma concentração de fibrinogênio superior aos demais animais analisados (ser humano, bovinos, equinos e ovinos) e o tempo de coagulação próximos ao obtidos nas amostras de seres humanos¹⁶.

A incorporação de tecnologia no campo é fundamental para obtenção de aumento de produtividade^{17,18}. Pesquisas realizadas nas últimas décadas mostraram que o manejo sanitário¹⁹ adequado de acordo com os Programas Nacionais de Saúde Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o rastreamento de doenças por testes bioquímicos e a quantificação de proteínas de fase aguda²⁰ poderão fornecer informação úteis no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças em búfalos no Estado de São Paulo^{21,22}. Esta conduta permitirá: a) a eutanásia de animais que tenham doenças de notificação obrigatória como brucelose²³ e tuberculose²⁴, as quais são responsáveis por abortos e febre, emagrecimento e aumento de linfonodos, além de outros sinais clínicos que provocam reduções significativas na produtividade²⁵ de insumos destes animais e, b) garantir a eutanásia de animais com processos inflamatórios, muitas vezes não detectáveis por exames clínicos por médicos veterinários²⁶, como mastite subclínica²⁷ e hemoparasitas²⁸ (*Theileria* e *Babesia*) por serem de difícil diagnóstico em búfalos, animais muito robustos²⁹.

Sabe-se que a haptoglobina é uma das proteínas de fase aguda em ruminantes³⁰ que podem ser utilizadas para monitorar a saúde de animais de grande porte. A dosagem da haptoglobina é uma análise de baixo custo pesquisada na clínica médica animal como biomarcador precoce de processos inflamatórios³¹, infecciosos³², danos teciduais³³ e condições de estresse³⁴. Isto se deve ao fato de suas concentrações sanguíneas se

apresentarem < 0,1 g/dL em bovinos saudáveis e se elevarem em mais de 100 vezes durante a ocorrência das condições patológicas, antes mesmo que surjam sinais clínicos e ocorram alterações no leucograma ³⁶⁻³⁸. Com estas características, a haptoglobina apresenta um alto potencial para uso em diferentes segmentos da cadeia produtiva pecuária brasileira ^{39,40}.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi certificar a sanidade de um rebanho bubalino para produção de selante, o qual esta sendo utilizado no tratamento de pacientes com úlceras venosas crônicas em um ensaio clínico de Fase I/II, em conformidade com as normas regulamentadoras da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2. MÉTODOS

2.1. Declaração de ética do uso de animais

Todas as etapas experimentais foram realizadas com a aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina, através do projeto de pesquisa intitulado "Busca por marcadores moleculares para tuberculose e brucelose no plasma de bubalinos" sob certificado nº 1134/2015 - CEUA. O manuseio e cuidado dos animais foram realizados por uma equipe de profissionais.

2.2. Animais

Cinquenta e sete bubalinos da espécie *Bubalus bubalis*, sendo 29 machos e 28 fêmeas da raça Murrah, de 18 meses de idade, não lactantes, pertencentes à Fazenda localizada na Latitude: -22.8744/Longitude: -47.9964 Pereiras, SP (propriedade privada) foram selecionados para doadores de sangue deste estudo durante o período de 04/09/2014 e 27/03/2017. Estes animais foram criados em

pastagem suplementada com silagem de milho (*Zea maiz L.*) e feno de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), com água potável e sal mineral "ad libitum", apresentando escore corporal entre 3 e 4 na escala de 1 a 5. Todas as condições de manejo e sanidade dos búfalos, que incluem esquemas de vacinação e controle de endo e exoparasitas, foram realizadas de acordo com os Programas Nacionais de Saúde Animal - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os critérios para seleção dos animais para este experimento foram: negativos para todas as doenças supracitadas, ausência de lesões e/ou processos infecciosos e escore corporal adequado.

2.3. Coleta de sangue

As amostras de sangue dos animais foram obtidas através de punção da veia jugular externa por meio de agulhas estéreis em tubos sem anticoagulante BD Vacutainer® e em tubos com citrato de sódio 10% (v/v) da BD Vacutainer®. Após a centrifugação dos tubos à 1.500g durante 15 minutos, as amostras de soro e plasma foram armazenadas em freezer -80°C ⁴¹.

2.4. Análises Bioquímicas e de Microscopia óptica

As análises descritas a seguir foram realizadas na Fazenda Privada onde se encontravam os animais, no Instituto Biológico de São Paulo, SP e no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), Botucatu, SP. Para melhor visualização das etapas experimentais, numeramos as análises de 1 a 13:

1) O teste de tuberculina foi realizado através da injeção intradérmica do derivado protéico purificado ⁴²⁻⁴⁴ nos búfalos. Após 48 horas, a reação tuberculínica foi medida pelo aumento da espessura da dobra de pele;

2) O teste de contagens de oocistos por grama (OPG) foi realizado para identificação de *Eimeria spp*⁴⁵ por microscopia ótica sob objetiva de 40x;

3) Pesquisa de ovos de estrogilídeos (POE) foi realizada nas fezes por microscopia ótica sob objetiva de 40x⁴⁶;

4) Para detecção de anticorpos contra *Brucella abortus* foram realizadas as provas imunológicas de soroaglutinação^{47,48}. A realização e a interpretação das provas de soroaglutinação lenta em tubo (SAL), 2-mercaptoetanol (2-ME) e antígeno acidificado tamponado seguiram as recomendações de Abertnethy et al. (2012)⁴⁹, respeitando a metodologia de interpretação contida no Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose - PNCEBT, publicado, inicialmente, na Instrução Normativa No2, de 10 de janeiro de 2001⁵⁰, onde os resultados da 2-ME e da SAL são avaliados juntos;

5) Para detecção de anticorpos contra *Leptospira spp.* foi realizado o teste de soroaglutinação microscópica⁵¹;

6) Realizou-se o diagnóstico sorológico de febre aftosa pelas técnicas de ELISA3ABC e eletroimunotransferencia (EITB). Este teste sorológico segue o programa nacional de erradicação da febre aftosa/MAPA e Organização Mundial de Saúde Animal/OIE⁵².

7) O teste sorológico para IBR/IPV foi realizado por meio da técnica de virusneutralização, conforme descrito no manual de técnicas diagnósticas e vacinas da OIE. Este protocolo para IgG é usado nos países que usam vacina deletada, no continente europeu⁵³.

8) No diagnóstico diferencial da varíola bovina, levou-se em consideração as seguintes patologias: A presença de vaccínia, pseudovariola bovina^{54,55}

9) O diagnóstico laboratorial para Língua azul foi realizado pela detecção de anticorpos específicos pela técnica de ELISA (*Blue tongue vírus*)⁵⁶⁻⁵⁸;

10) O diagnóstico sorológico de Estomatite vesicular foi realizado por virusneutralização para os seguintes sorotipos: cocal e alagoas^{59,60};

11) Para o diagnóstico de leucose bovina, realizou-se a identificação de anticorpos específicos contra a glicoproteína 51 do BLV pela técnica de ELISA^{61,62};

12) A determinação das concentrações de haptoglobina foi realizada no soro⁶⁷;

13) A determinação do fibrinogênio foi realizada no plasma através do método de coagulometria⁶⁸.

2.5. Hemocultura de parasitas

Na capela de fluxo laminar, as amostras de sangue foram separadas em três tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Em cada um dos tubos, foram inoculados plasma, camada de leucócitos e hemácias⁶⁹⁻⁷¹, respectivamente. As hemoculturas foram mantidas em estufa à 28-30°C. Após 15 dias da inoculação, foi realizada a primeira leitura, retirando-se de cada tubo, uma alíquota de três microlitros e inseridas entre uma lâmina e uma lamínula. A observação da presença de hemoparasitas foi realizada sob microscopia óptica com uma objetiva de 400X.

2.6. Extração do DNA das amostras de sangue

Todas as porções de sangue da hemocultura (camada de leucócitos, plasma e sedimento de hemácias) foram adicionadas em um único tubo, centrifugadas e lavadas várias vezes com PBS pH 7,2, a fim de promover a concentração dos

parasitas. Após esse procedimento, o DNA de cada amostra foi extraído. A purificação do DNA sanguíneo foi realizada utilizando o kit comercial da marca Illustra Blood GenomicPrep (GE Healthcare®), seguindo as recomendações do fabricante. Os DNAs foram mantidos a -20°C até o momento do uso ⁷².

2.7 Quantificação do DNA extraído das amostras de sangue

A quantificação do DNA extraído das amostras de sangue foi realizada utilizando o equipamento Quantifier (Nanovue, GE Healthcare Bio-Sciences®/UK). Após a calibração, 2 µL de cada amostra de DNA extraída foram adicionados e a leitura foi acionada pelo software próprio do fabricante para a obtenção dos resultados⁷³.

2.8 PCR para *Theileria spp.* e *Babesia Bovis* em búfalos

Para realizar PCR para *Theileria spp.* e *Babesia bovis*, foram inicialmente selecionados vinte amostras de DNA de animais positivos em hemocultura. Apenas as amostras de *Theileria spp.* foram submetidos ao ensaio de nested PCR⁷⁸. Os dois pares de primers utilizados nesta etapa experimental foram descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências do conjunto de primers utilizados para detecção de DNAs de hemoparasitas

| Pathogen Target gene | Assays | Oligonucleotide sequences (5' > 3') | Product size (bp) | Reference |
|-----------------------------|--------|--|-------------------|-----------|
| Theileria - 18S rRNA | PCR | 5'- GAAACGGCTACCACATCT -3' 5'-CGCCTATTCTAACTTGACCTGAAT-3' | 778pb | [78] |
| | nPCR | 5'- TTAAACCTCTTCCAGAGT - 3' 5'- TCAGCCTTGCGACCATAC - 3' | 581pb | [78] |
| B.bovis - GAU9/GAU10 | PCR | 5'- CTGTCGTACCGTTGGTTGAC -3' 5'- CGCACGGACGGAGACCGA -3' | 541pb | [79] |

Um teste inicial também foi realizado para determinar a sensibilidade das técnicas de PCR e nPCR para *Theileria* e *B. bovis* ^{78,79}. Posteriormente, foram

testadas diferentes temperaturas de anelamento: 55, 56, 57, 58, 59 e 60°C; e diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio (MgCl₂): 1,5 mM, 1,75 mM, 2,0 mM e 2,5 mM; além de diferentes concentrações de primers: 0,12µl, 0,16µl, 0,4µl e 0,6µl . Após os resultados das análises, os testes de sensibilidade da técnica foram feitos para os dois agentes. Todos os reagentes usados nessas reações foram produzidos pela Invitrogen®. Na segunda reação (nPCR), 1µL do produto da primeira reação e as mesmas concentrações de todos os reagentes mencionados acima foram utilizados em um volume final de 50µL de mistura. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,3% (m/v) em tampão TBE com padrão de massa molecular de 100pb (Ludwig Biotec®). Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,4 µg/mL (Invitrogen®) e visualizados sob transiluminador UV (BioRad®), sob comprimento de onda 296nm⁸⁰.

2.9 Eletroforese em gel de agarose para análise de PCR

Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2µL da solução azul de bromofenol, as quais foram submetidas à eletroforese em gel de agarose à 1,3% (m/v) em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) à 0,5% (v/v)⁷⁴. O gel de eletroforese foi preparado com 1,5 g de agarose pura em 50 mL de tampão Tris-EDTA-Borato 0,5X (TBE)⁷⁵. A agarose foi dissolvida em TBE pré-aquecido e o gel corado em solução Syber Safe®. A corrida foi realizada à 100 volts por 50 minutos (Electrophoresis Power Supply EPS 301). Ao final, as bandas foram visualizadas em ultravioleta transiluminado, com filtro de 300nm (MS Major Science® UVDI) ⁷⁶. Para o padrão de massa molecular, foi utilizada a Escada de DNA (LowRanger 100bp DNA Ladder / NORGEN). A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização

foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta (296nm) ⁷⁷.

2.10 Análises Estatísticas

Uma análise descritiva dos resultados foi realizada a partir da construção de uma base de dados no programa Microsoft Office Excel®, onde foram depositados todos os resultados, bem como as características epidemiológicas dos animais do estudo. Os dados obtidos foram analisados utilizando ANOVA e, os testes de Tukey foram utilizados para avaliar o efeito do tratamento, com diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para aquisição da matriz de análise, normalizou-se os dados obtidos e submetemos os dados aos seguintes testes: Kolmogorov-Smirnova e Shapiro-Wilk ⁸¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Animais e Testes sorológicos

Dentre os 57 animais avaliados durante este estudo, todos foram negativos para qualquer alteração clínica em seu estado sanitário durante este projeto (04/09/2014 and 27/03/2017) e as funções vitais (frequência respiratória, batimentos cardíacos, movimentos ruminais e temperatura corporal) permaneceram dentro dos limites fisiológicos⁸²⁻⁸⁴.

O diagnóstico sanitário inicial do rebanho foi realizado com testes pertencentes a plataforma de provas imunológicas de soroaglutinação, ELISA3ABC e EITB, ELISA, virusneutralização e detecção de anticorpo no mês de setembro de 2014. Estes testes foram capazes de identificar as principais doenças de notificação obrigatória e de grande impacto econômico, dos quais resultaram os dados demonstrados na Tabela 2.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|-------|-----------|----|-----|-----|----|----|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| 41 | F | 18738 | 4/9/2014 | NR | 0 | 50 | NR | NR | NR | NR | 1,9 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 42 | M | 18739 | 4/9/2014 | NR | 0 | 150 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 43 | F | 18740 | 30/9/2014 | NR | 50 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 44 | M | 18741 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 45 | M | 18742 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | ISF | NR | NR | NR | NR | NR |
| 46 | M | 18743 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | 0,3 | NR | NR | ISF | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 47 | F | 18744 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 48 | M | 18745 | 30/9/2014 | NR | 50 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | ISF | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 49 | M | 18746 | 30/9/2014 | NR | ISF | ISF | NR | NR | NR | NR | NR | NR | ISF | ISF | ISF | NR | NR | NR | NR |
| 50 | F | 18747 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 51 | F | 18748 | 30/9/2014 | NR | 0 | 150 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 52 | F | 18749 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 53 | M | 18750 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | R | R |
| 54 | M | 18751 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 55 | M | 18752 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 56 | M | 18753 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | 1,6 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| 57 | F | 18754 | 30/9/2014 | NR | 0 | 0 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR | R | NR |

N°: Número individual do brinco da orelha esquerda. **LVB/14:** Identificação laboratorial do Instituto Biológico de São Paulo. **PPD:** Derivado de Proteína Purificada (Tuberculina). **TB:** Tuberculose. **EIM:** *Eimeria spp* (OPG). **POE:** Estrogilídeos (POE). **BRU:** *Brucella spp.* **LEP:** *Leptospira*. **FA:** Febre Aftosa. **IBR:** Rinite Bronquite Infecciosa. **Pox:** Variola Bovina. **BTV:** Língua Azul (*Blue tongue vírus*). **EV:** Estomatite Vesicular. **COCV:** Sorotipo Cocal. **VSAV:** sorotipo Alagoas. **BLV:** Leucose Enzoótica Bovina. **NC:** Neosporose - *Neospora caninum* (RIFI). **TX:** Toxoplasmose (RIFI). **M:** Macho. **F:** Fêmea. **NR:** Não Reagente. **R:** Reagente (positivo). **ISF:** Amostra Insuficiente. Positividade para alguma das doenças em análise está em **vermelho**. Positividade para doença de notificação obrigatória. **EM NEGRITO:** fêmea livre das doenças analisadas - animal doador.

Trinta e três animais enumerados por 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 21, 24, 25, 22, 23, 26, 32, 31, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 48, 46, 51, 53, 56 e 57 apresentaram positividade para alguma das doenças analisadas no início do projeto e, conseqüentemente, foram afastados do rebanho principal. Os demais ensaios bioquímicos e moleculares como dosagem de fibrinogênio, haptoglobina e reação em cadeia da polimerase foram realizados em todos os 57 animais para que pudéssemos ter segurança que os animais não tivessem qualquer doença infecciosa e/ou parasitária não detectada pelos ensaios sorológicos para chegarmos à um perfil diagnóstico ideal a indicarmos os animais soro doadores finais.

3.2 Análises Diagnósticas

3.2.1 Tuberculina

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil recomenda que a leitura do teste tuberculínico ⁸⁵, em bovinos e bubalinos, deve ser realizada 72 horas (\pm 6 horas) após a aplicação da tuberculina ⁸⁵.

A reação tuberculínica medida pelo aumento da espessura da dobra de pele atingiu o ponto máximo em 48 horas após a inoculação da tuberculina, porém, não houve diferença estatística em relação à magnitude das reações observadas às 72 horas. Segundo as orientações de Tizard ⁸⁶ em conformidade com o recomendado no programa de brucelose e tuberculose/MAPA, todos os animais deste estudo foram considerados negativos para o teste de tuberculina.

3.2.2 *Eimeria spp.*

Oito animais enumerados por 2, 18, 21, 24, 25, 26, 43 e 48, neste estudo apresentaram positividade para pesquisa de ovos de estrongilídeos no exame

crotoparasitológico. Os animais criados no pasto estão mais sujeitos à contaminação através da ingestão de ovos nas pastagens contaminadas com oocistos esporulados (estágio infectante) ⁸⁷⁻⁹¹ Em alta densidade populacional e criações intensivas, o que não ocorreu neste estudo.

3.2.3 Estrongilídeos

Cinco animais foram diagnosticados com tricostrongilóides nos ensaios iniciais do manejo do rebanho. As helmintoses estão entre as doenças que mais afetam a produtividade dos ruminantes em várias regiões do mundo ⁹²⁻⁹⁶. Os índices elevados de infecção estão atribuídos às variações regionais e sazonais que dependem de vários fatores, como temperatura, umidade, regime pluvial, ecossistema, condições sanitárias e idade dos animais principalmente em bovinos e bubalinos, onde animais jovens são mais susceptíveis às infecções, assim colaborando na elevação dos índices de número de ovos ⁹⁷⁻¹⁰⁸.

3.2.4 Brucelose

No diagnóstico inicial, apenas um animal foi positivo para a doença de notificação obrigatória brucelose pelas provas de SAL, 2-ME e antígeno acidificado tamponado ^{109,110}. No Brasil, está em vigor o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose ¹¹¹, o qual obriga a vacinação, em todo território nacional, de todas as fêmeas das espécies bovina e bubalina, na faixa etária de três a oito meses, com a vacina B19, respeitando as normas definidas pelo Comitê de Especialistas em Padrões Biológicos da Organização Mundial da Saúde ^{112,113}. O comitê de especialistas estabeleceu uma dose padrão de 40 a 120x10⁹ bactérias viáveis por animal (injeção subcutânea) ¹¹⁴.

O PNCEBT não permite a vacinação de animais adultos, incluindo a B19, a qual induz o surgimento de títulos de anticorpos que podem dificultar o diagnóstico¹¹⁵⁻¹¹⁷; desta forma, a única opção a ser tomada pelos proprietários do rebanho, é eutanasiar o animal (abate sanitário)¹¹⁸⁻¹²⁰. Sendo assim, o animal positivo deste projeto, foi eutanasiado logo após evidenciarmos sua positividade.

3.2.5. Rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina

Doenças infecto-contagiosas animais como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e diarreia viral bovina (BVD) estão disseminadas no rebanho nacional¹²¹. A BVD é uma doença causada por vírus e causa grande impacto econômico principalmente na atividade leiteira^{122,123}. A presença do vírus predispõe nestes animais a outros microorganismos oportunistas como IBR^{124,126}. Ambas as doenças provocam alterações nos sistemas respiratório e reprodutivo tais como: abortos, natimortos, má formação fetal e absorção embrionária^{127,128}.

Neste estudo os índices de animais reagentes contra IBR e BVD foram de 3,5% e 10,5%, respectivamente. Valores que atribuem um efeito negativo no índice de fertilizade do rebanho. Estes resultados diferem dos observados em bovinos pois segundo Poletto e colaboradores¹³¹, 32,84% dos animais positivos para IBR e 29,41% para BVD em média ocorrem em rebanhos bovinos¹³²⁻¹³⁴.

3.2.6 Toxoplasmose

No Brasil, poucos trabalhos foram realizados sobre ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bubalinos^{135,136}. Alguns estudos demonstraram uma prevalência do agente em búfalos numa taxa inferior ao observado em bovinos¹³⁷⁻¹³⁹. Em nosso estudo, nove animais foram detectados sororreagentes para

toxoplasmose, sendo assim, uma prevalência de 15,8% dos animais do rebanho. Fato que causa maiores índices de aborto e doenças congênitas o rebanho. Dados semelhantes aos obtidos por Barros e colaboradores ¹⁴⁰ que evidenciaram um prevalência de 12,2% em búfalos sororreagentes para toxoplasmose no Paraná, SP. Acreditamos que esses achados são um incentivo para novas pesquisas, pois a maioria dos estudos indicam que a toxoplasmose é pouco disseminada entre bubalinos mas também muito pouco estudada¹⁴¹.

3.2.7 Neosporose

Bubalinos são susceptíveis à infecção por *Neospora caninum* ¹⁴². Em nosso estudo, identificamos positividade em 19,3%. Por não existir uma análise padrão para esse diagnóstico em bovinos e em búfalos, várias técnicas são utilizadas, sendo que os pontos de corte adotados, são diferentes dependendo de cada autor, dificultam assim a comparação de resultados^{143,144,145}. Há grande dificuldade em se ter um ponto de corte ideal para identificação de um bubalino infectado por *N. caninum* em diferentes regiões do país ^{146,147}. Foram observados, na literatura investigada, que não existe ponto de corte determinado para neosporose, sendo necessário avaliar a sensibilidade da técnica ¹⁴⁸⁻¹⁵³.

3.2.8 Hemocultura

Dos 57 animais avaliados, 10 animais apresentaram hemocultura positiva para *Theileria spp.*, quatro para *Babesia bovis* e cinco para *ambas* espécies parasitária. Estes resultados obtidos através da observação das hemoculturas por seis meses consecutivos a partir da coleta inicial do sangue dos animais. As culturas em que foram observadas a presença de anaplasmoses foram repicadas em meio NNN-LIT

para manutenção dos parasitas e para a realização das demais provas diagnósticas (Figuras 1A e 1B).

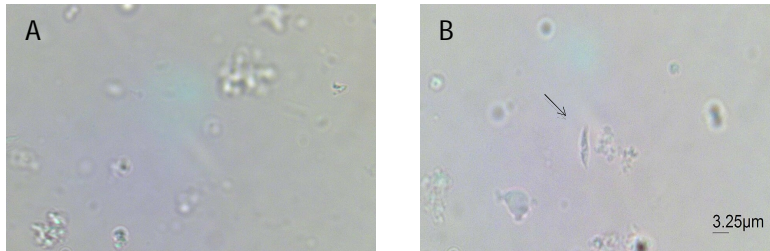


Figura 1: Hemocultura negativa (A) positivo para *Babesia* (B) de búfalo em meio LIT (Liver Infusion Tryptose). Microscopia óptica, aumento 1000X.

As amostras de sangue consideradas positivas estão evidenciadas na Tabela 3 e foram posteriormente submetidas ao teste de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para avaliar a infecção por *Theileria spp.* e *Babesia bovis*.

Tabela 3: Ensaio experimental de hemocultura individual para os animais estudados neste trabalho, seguidas da prova de PCR.

| Bufalos | DNA quantificação | PCR positivo | Sexo | Idade (anos) | Peso (kg) |
|---------|----------------------|--------------------------------|------|-----------------|--------------|
| 3 | 1.6 | Theileria | F | 1,4 | 410 |
| 8 | 1.6 | Theileria | F | 1,7 | 480 |
| 12 | 1.6 | Babesia bovis | F | 1,5 | 445 |
| 15 | 48.4 | Theileria | F | 1,3 | 380 |
| 17 | 41.8 | Theileria | F | 1,5 | 455 |
| 22 | 1.6 | Theileria | F | 1,5 | 455 |
| 24 | 6 | Babesia bovis | M | 1,7 | 480 |
| 26 | 54.8 | Theileria | F | 1,5 | 440 |
| 27 | 4.2 | Theileria | F | 1,5 | 455 |
| 34 | 5 | Theileria | F | 1,7 | 500 |
| 35 | 2.5 | Theileria and Babesia bovis | F | 1,9 | 530 |
| 36 | 2.1 | Theileria | F | 1,5 | 440 |
| 40 | 1.8 | Theileria and Babesia bovis | F | 1,3 | 370 |
| 41 | 3 | Theileria and Babesia bovis | F | 1,7 | 500 |
| 43 | 3 | Theileria | F | 1,4 | 410 |
| 47 | 4 | Babesia bovis | F | 1,5 | 425 |
| 50 | 3.7 | Babesia bovis | F | 1,4 | 415 |
| 51 | 4.3 | Theileria and Babesia bovis | F | 1,4 | 400 |
| 52 | 8.8 | Theileria and Babesia bovis | F | 1,5 | 425 |
| 57 | 2,5 | Theileria | F | 1,8 | 520 |

A tentativa de isolamento de protozoários flagelados da *Theileria* em bubalinos foi realizada de forma pioneira neste estudo, onde se pode constatar êxito nos resultados obtidos, conforme tabela 3. A técnica de hemocultura não é de predileção dos pesquisadores¹⁵⁶, pois apresenta algumas limitações como a possível contaminação por bactérias e fungos, além do tempo dispendioso para obtenção de resultados¹⁵⁷. Contudo, devido aos poucos relatos de resultados positivos em búfalos, temos certeza que nosso estudo poderá auxiliar novas pesquisas na região.

3.2.9 Diagnóstico Molecular po Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Um teste inicial também foi realizado para determinar a sensibilidade das técnicas de PCR e nPCR para *Theileria* e *B. bovis* ^{78,79}. Após o teste inicial evidenciamos:

- 1) Técnicas de PCR para *Theileria* a melhor temperatura de anelamento foi 58°C; Cloreto de Magnésio (MgCl₂): 1,5 mM; volume do primer: 0,12µl,
- 2) Técnicas de nPCR para *Theileria* a melhor temperatura de anelamento foi 60°C; Cloreto de Magnésio (MgCl₂): 1,5 mM; volume do primer: 0,12µl,
- 3) Técnicas de PCR para *B. bovis* a melhor temperatura de anelamento foi 59°C; Cloreto de Magnésio (MgCl₂): 2,0 mM; volume do primer: 0,16µl.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do sangue e as culturas em meio LIT foram realizada com os iniciadores 18SF/18SR, nPCR F/nPCR R para *Theileria spp* e GAU9/GAU10 (Internal Transcribed Spacer 1) para *Babesia bovis*, descritos por Cao *et. al.* ⁷⁸ e Zanet *et. al.* ⁷⁹, os quais amplificam sequências do hemoparasitas. Para *Theileria spp*, utilizamos iniciadores com 778 pares de base (pb) no primeiro PCR e com produtos resultantes de 581pb no segundo nPCR (nested). Para *Babesia bovis* trabalhamos com 541pb.

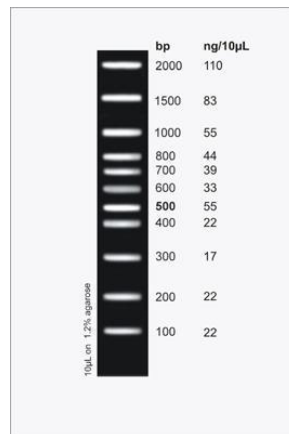


Figura 2: Marcador molecular utilizado foi Low Rager 100bp DNA Ladder da empresa NORGEN (Lot # A4823A, n. catálogo 11500) com faixa molecular de 100bp à 2,000bp.

Segue a baixo os resultados obtidos no PCR para *Theileria ssp* (Figuras 3 a

5).

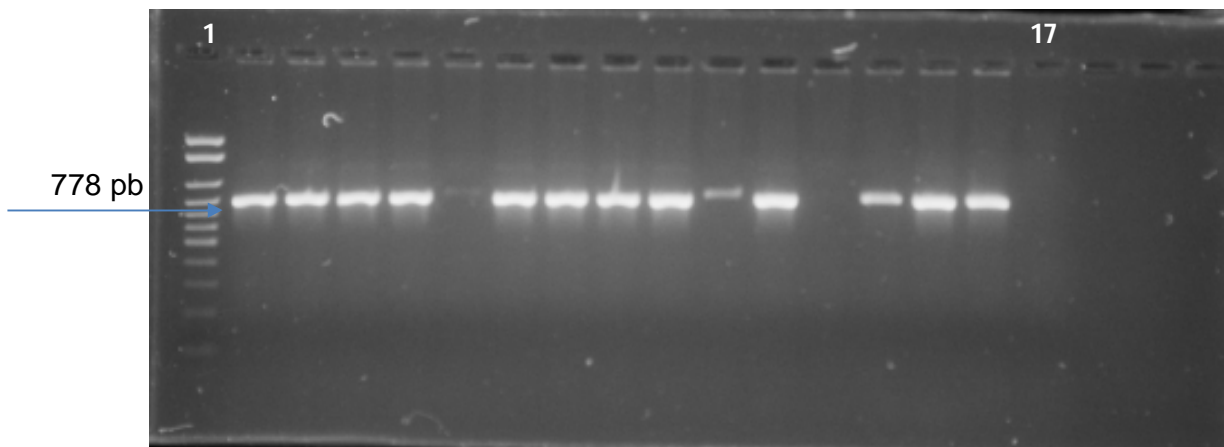


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) de produtos purificados a partir dos iniciadores **18SF/18SR**; 1 – marcador de massa molecular (100 pb); respectivamente: poço 2 = animal 3; poço 3 = animal 8; poço 4 = animal 12; poço 5 = animal 15; poço 6 = animal 17; poço 7 = animal 21; poço 8 = animal 22; poço 9 = animal 23; poço 10 = animal 27; poço 11 = animal 40; poço 12 = animal 41; poço 13 = animal 43; poço 14 = animal 47; poço 15 = animal 51; poço 16 = controle positivo (*Theileria*) e poço 17 = controle negativo (água ultra-pura).

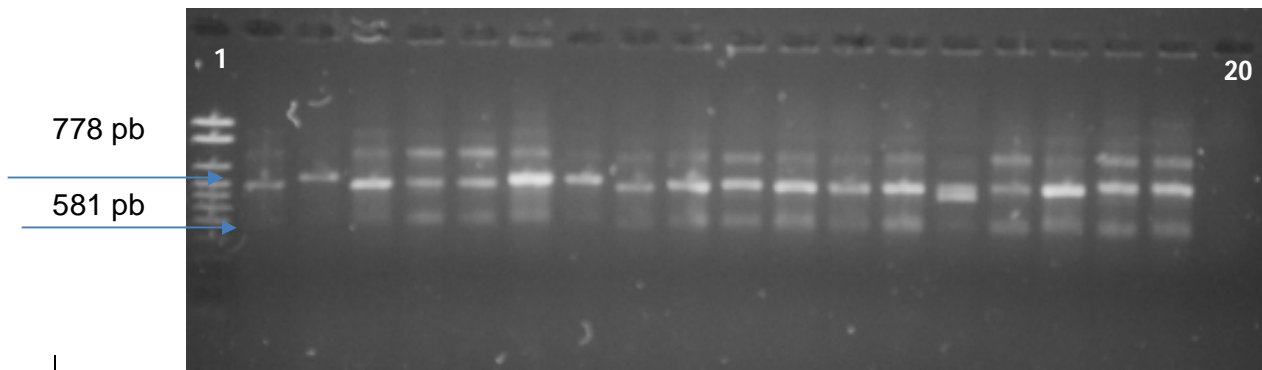


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) de produtos purificados a partir dos iniciadores **nPCR R** e **nPCR nested**; 1 – marcador de massa molecular (100 pb); respectivamente: poço 2 = animal 3; poço 3 = animal 8; poço 4 = animal 12; poço 5 = animal 15; poço 6 = animal 17; poço 7 = animal 21; poço 8 = animal 22; poço 9 = animal 23; poço 10 = animal 27; poço 11 = animal 40; poço 12 = animal 41; poço 13 = animal 43; poço 14 = animal 47; poço 15 = animal 51; poço 16 = animal 52; poço 17 = animal 53; poço 18 = animal 54; poço 19 = controle positivo (*Theileria*) e poço 20 = controle negativo (água ultra-pura).

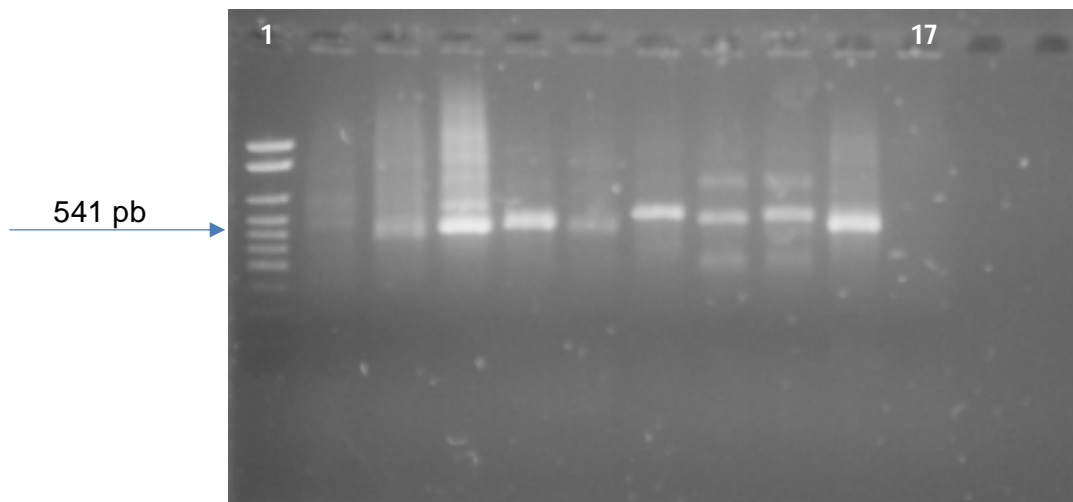


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) de produtos purificados a partir dos iniciadores **GAU9/GAU10**; 1 – marcador de massa molecular (100 pb); respectivamente: poço 2 = animal 3; poço 3 = animal 8; poço 4 = animal 12; poço 5 = animal 15; poço 6 = animal 17; poço 7 = animal 21; poço 8 = animal 22; poço 9 = animal 23; poço 10 = animal 27; poço 11 = animal 40; poço 12 = animal 41; poço 13 = animal 43; poço 14 = animal 47; poço 15 = animal 51; poço 16 = controle positivo (*Babesia Bovis*) e poço 17 = controle negativo (água ultra-pura).

Tabela 4. Número de bovinos positivos e negativos à técnica de PCR para os iniciadores 18SF/18SR, nPCR R/nPCR e GAU9/GAU10 a partir de amostras de hemocultura e sangue (análise em duplicata).

| n | <i>Theileria</i> 18SF e 18SR | <i>Th. nested</i> nPCR R e nPCR | <i>Babesia bovis</i> Gau 9 e Gau 10 |
|----|---------------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | Positivo | * | Negativo |
| 3 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 8 | Positivo | Negativo | Negativo |
| 9 | Positivo | * | Negativo |
| 12 | Negativo | Positivo | Positivo |
| 13 | Positivo | * | Negativo |
| 15 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 17 | Positivo | Positivo | Negativo |
| 21 | Positivo | Positivo | Negativo |
| 22 | Positivo | Positivo | * |
| 23 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 26 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 27 | Negativo | Positivo | Positivo |
| 29 | Negativo | Positivo | Positivo |
| 34 | Positivo | Positivo | Positivo |
| 35 | Positivo | Positivo | Positivo |
| 36 | Positivo | Positivo | Negativo |
| 39 | Positivo | Positivo | Positivo |
| 40 | Negativo | Positivo | Negativo |
| 41 | Negativo | Positivo | Positivo |
| 43 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 47 | Negativo | Positivo | Positivo |
| 50 | Negativo | * | Positivo |
| 51 | Negativo | Positivo | Positivo |
| 52 | Positivo | Positivo | Positivo |
| 57 | Positivo | * | * |

(*) amostra com quantidade insuficiente para realização do teste.

No presente estudo, evidenciamos que 13 animais tiveram diagnóstico positivo para *Theileria spp.* e *Babesia spp.*, respectivamente. Apenas quatro animais (animais de número 17, 21, 22, e 36) foram reativos para o primer 18SF/18SR (*Theileria spp.*) e nPCR R/nPCR (*Theileria spp.*), enquanto cinco animais (animais de número 12, 41, 47, 50 e 51) foram reativos para o primer GAU9/GAU10 (*Babesia spp.*) e quatro animais (animais de número 34, 35, 36, e 52) para todos os primers testados nesse estudo.

Babesia spp. e *Theileria spp.* são protozoários transmitidos por carrapatos e capazes de infectar eritrócitos e/ou leucócitos de uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens¹⁵⁸⁻¹⁵⁹. Algumas espécies do gênero *Theileria*, como *T. annulata* é altamente patogênica para bovinos e causam mortalidade significativa entre animais suscetíveis^{160,161}. *Theileria* é considerada um excelente modelo experimental para observação da relação parasita-hospedeiro, provavelmente por causa de uma longa relação evolutiva entre o parasita e o hospedeiro¹⁶². No entanto, a doença clínica pode ocorrer em situações de estresse relacionadas com a translocação de animais selvagens¹⁶³. A *theileria* é transmitida pelo vetor, carrapato-de-boi (*Boophilus microplus* / *Rhipicephalus microplus*) é um carrapato da família dos ixodídeos, de ampla ocorrência na América do Sul¹⁶⁴.

No Brasil, existem várias propriedades onde bovinos e búfalos vivem e pastam juntos, e assim, patógenos de búfalos podem ameaçar a saúde do bovino e vice-versa¹⁶⁵. Portanto, o conhecimento de agentes infecciosos de búfalos é essencial para a manutenção de animais saudáveis¹⁶⁶. A doença clínica causada pelos parasitas *Theileria ssp* e *Babesia bovis* no búfalo asiático não é comum, embora esses animais possam atuar como hospedeiros reservatórios e, a detecção desses hemoparasitos em búfalos é tão importante quanto em bovinos^{167,168}.

3.2.10 Haptoglobina sérica

A resposta de fase aguda é uma reação inflamatória não específica do hospedeiro, que tem como objetivo impedir a ação do patógeno e o dano celular¹⁶⁹. Na medicina humana e cada vez mais na medicina veterinária, a avaliação das concentrações destas proteínas plasmáticas, como a haptoglobina, proporcionam o diagnóstico e monitoramento de doenças cuja a causa é uma processo de inflamação aguda^{170,171}.

Na espécie bovina, as proteínas de fase aguda que tem um aumento durante a inflamação são haptoglobina e o amilóide sérica A e, por este motivo são as proteínas mais avaliadas em bovinos, conseqüentemente em bubalinos^{172,173}. As concentrações plasmáticas de haptoglobina aumentam em condições inflamatórias ou infecciosas^{174,175}.

A determinação das concentrações séricas de haptoglobina neste estudo foi realizada utilizando a técnica de espectrofotometria¹⁷⁶ durante os três anos de estudo a cada seis meses. Este ensaio não é específico para a espécie bubalina, mas é indicada para dosagem de haptoglobina em uma grande variedade de espécies, entre elas: humanos, camundongos, ratos, bovinos, felinos, caninos, suínos, ovinos, caprinos, equinos e coelhos¹⁷⁷⁻¹⁸¹.

Em nosso estudo, ao realizarmos os testes periódicos em nosso rebanho de bubalinos sorodoadores para o selante de fibrina, evidenciamos um surto de anaplasiose em 02/02/2016, onde ao observar atentamente, os valores de haptoglobina, foi evidenciado que os valores variaram de 6,8 à 177,6 mg/dL, com uma média de 28,81 mg/dL. A margem de segurança para animais saudáveis variou de 11,6 a 19,7 mg/dL, segundo as análises estatísticas utilizadas neste estudo. Os

dados mencionados estão representados na Figura 6.

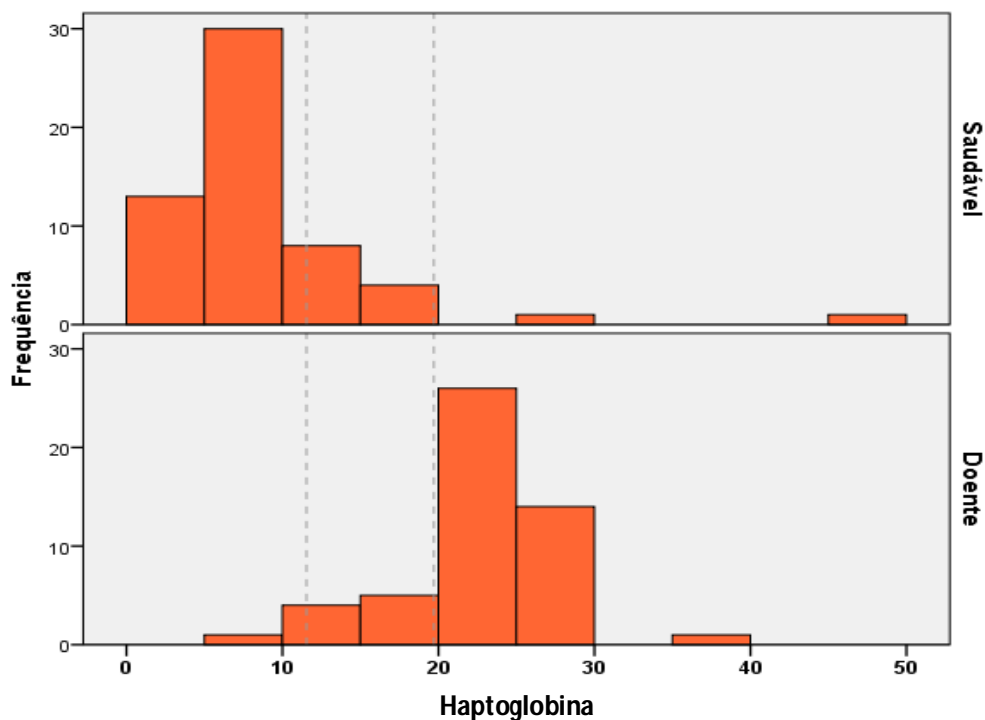


Figura 6: Valores de haptoglobina referência para búfalos saudáveis e doentes da propriedade privada situada na cidade de Pereiras, SP, após surto de anaplasmose no ano de 2016.

3.2.11 Fibrinogênio

Na medicina veterinária, o fibrinogênio plasmático é um importante parâmetro para ser avaliado¹⁸². O fibrinogênio é uma proteína de coagulação (fator I da coagulação)¹⁸³. Também é chamado de proteína de fase aguda porque sua concentração no sangue aumenta em resposta a processos inflamatórios^{184,185} e neoplásicos¹⁸⁶⁻¹⁸⁷. Ele serve como substrato para a trombina, componente da cascata de coagulação¹⁸⁸. A trombina age sobre o fibrinogênio no fluido tecidual e no plasma, produzindo a fibrina, que é depositada nos tecidos inflamados, formando uma barreira contra a disseminação da inflamação¹⁸⁹. Os bovinos com mastite¹⁹⁰,

fotosensibilização¹⁹¹ apresentam uma elevação de aproximadamente 146,5% nas concentrações plasmáticas de fibrinogênio. Em nosso estudo, evidenciamos que após um surto de anaplasmos em 02/02/2016, os valores de fibrinogênio, verificamos que os níveis variaram de 405,53 a 1.168,70 com uma média de 728,61 mg/dL. A margem de segurança para animais saudáveis variou de 300 a 700 mg/dL¹⁹². Os dados mencionados estão representados na Figura 7.

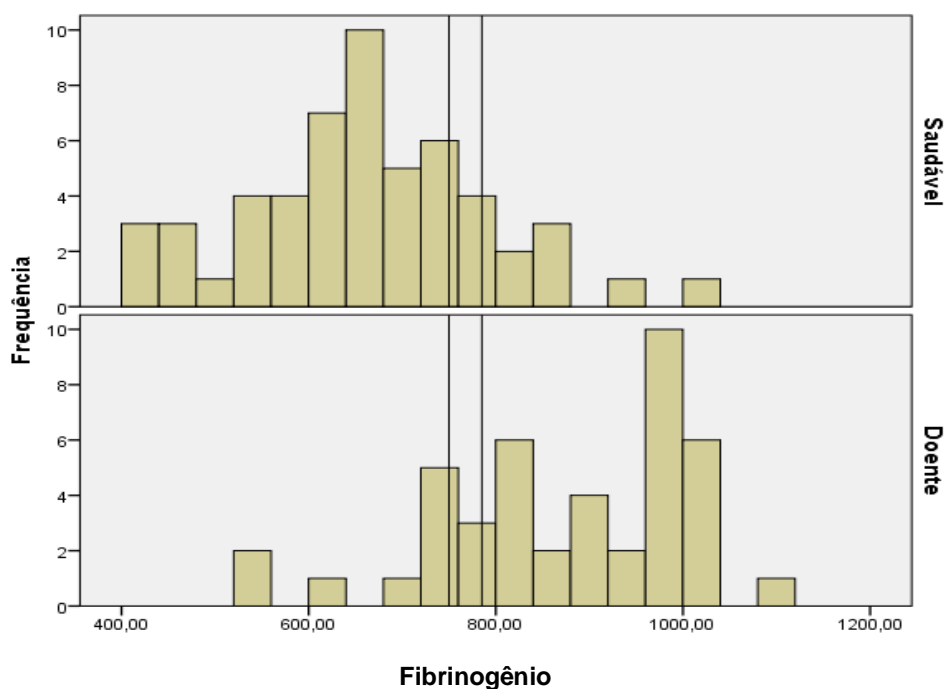


Figura 7: Valores de fibrinogênio referência para búfalos saudáveis e doentes da propriedade particular situada na cidade de Pereiras, SP, após surto de anaplasmos no ano de 2016.

4. CONCLUSÕES

O manejo eficiente representado neste artigo é o ponto mais relevante na produção de búfalos sorodadores da raça Murrah, discretas alterações caracterizadas por elevação nos valores de eimeria, tricostrongilóides, língua azul,

leptospirose, toxoplasmose, neosporose e as proteínas de fase aguda, haptoglobina e fibrinogênio foram também quantificadas em um surto de theileriose e babesiose. O manejo de búfalos é complexo e requer reavaliações periódicas. As análises de haptoglobina e fibrinogênio, juntamente com testes clínicos e laboratoriais, permitiram estabelecer limites matemáticos confiáveis para a saúde animal de búfalos sorodoadores, bem como mostrar que os búfalos doentes eram exceções.

REFERENCIAS

- [1] Ahmad S, Anjum FM, Huma N, et al. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals enzymes and vitamins. *J An Plant Sc*, 2013 23;1:62-74.
- [2] ANASB. 2011. Italian Buffalo Breeders' Association. Statistical data 2011.
- [3] Papa L, Kume K. The Albanian buffalo: a case study of a successful in situ conservation program. 2008 2:3.
- [4] Steinfeld H, Wassenaar T, Jutzi S. Livestock production systems in developing countries: status, drivers, trends. *Rev Sci Tech*. 2006 25;(2):505-16.
- [5] De Pontes LG, Cavassan NRV, De Barros LC, et al. *Proteomics Clin. Appl.* 2017 11:1-6. □
- [6] Cavassan NRV; Camargo CC; De Pontes LG; et al. Correlation Between Chronic Venous Ulcer Exudate Proteins And Clinical Profile: A Cross-Sectional Study. *Proteomics* 2;34:1-6.
- [7] Onyango AA, Dickhoefer U, Rufino MC. et al. Temporal and spatial variability in the nutritive value of pasture vegetation and supplement feedstuffs for domestic ruminants in Western Kenyas for domestic ruminants in Western Kenya. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2018 26;8:1-7.

[8] Chagunda MGG, Mujibi FDN, Dusingizimana T, Kamana O, Cheruiyot E, Mwai OA. Use of High Density Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Arrays to Assess Genetic Diversity and Population Structure of Dairy Cattle in Smallholder Dairy Systems: The Case of Girinka Programme in Rwanda. *Front Genet.* 2018 10;9:438.

[9] Amamou H, Sssi MB, Aouadi KH. et al. Climate change-related risks and adaptation strategies as perceived in dairy cattle farming systems in Tunisia. *Climate Risk Management.* 2018 20:38-49.

[10] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores. Estatística da produção pecuária. Rio de Janeiro, RJ - Brasil, ISSN 0101-4234 (meio impresso) © IBGE. 2013 [acesso 2 nov 2018]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=o-que-e>

[11] IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE divulga comentários analíticos sobre os resultados da Pesquisa da Pecuária Municipal - PPM. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores. Estatística da produção pecuária. Rio de Janeiro, RJ - Brasil, ISSN 0101-4692 (meio impresso) © IBGE. 2016 [acesso 28 out 2018]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.

[12] Gil LH, Rodrigues MS, De Lima AA, Katsuragawa TH. Seasonal Distribution Of Malaria Vectors (Diptera: Culicidae) In Rural Localities Of Porto Velho, Rondônia, Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 57(3):263-7.

[13] Intiaz AS, Randhawa M S, Khatkar PC. et al. A Meta-Assembly of Selection Signatures in Cattle. *PLoS One.* 2016 11(4):e0153013.

[14] Porto-Neto LR, Sonstegard TS, Liu GE, Bickhart DM, et al. Genomic divergence of zebu and taurine cattle identified through high-density SNP genotyping. *BMC Genomics.* 2013 14;(1):876.

[15] RIRDC - Research and Development Corporation: Maximising marketing opportunities for buffalo products. [acesso 28 out 2018]. Disponível em: http://www.ruralindustriesresearch.org/report_development_corporation.php/.

[16] Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Toscano E, Machado PEA, Lima CRG, Barraviera B. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase®, and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitates. *J Venom Anim Toxins*. 1998 4:120-36.

[17] Wayne F. Cascio and Ramiro Montealegre. How Technology Is Changing Work and Organizations. *Annu. Rev. Organ. Psychol. Organ. Behav.* 2016 3:349-75.

[18] Heath C, Luff P. *Technology in Action*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press; Henfridsson O, Bygstad B. 2013. The generative mechanisms of digital infrastructure evolution. *MIS Q.* 2000 37(3):907–31

[19] Lorenz, I.; Vogt, S et al. Investigations on the Association of D-lactate Blood Concentrations with the Outcome of Therapy of Acidosis, and with Posture and Demeanour in Young Calves with Diarrhoea. *Journal of Veterinary Medicine Series* 2006 53;9:490-94.

[20] Hultén, C. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobins markers of treatment efficacy in pigsexperimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*. 2003 95:75-89.

[21] Gregory L, Rossi RS, Mendes JPG, et al. Ocorrência dos principais agentes bacterianos e parasitários em fezes diarreicas de bezerros búfalos nos estados de São Paulo e Paraná. *Arq Inst Biol* 2014 81;2:180-85.

[22] Bionaz, M. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR research*. 2013 13;4:23-34.

[23] BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 1.271, De 6 De Junho De 2014.

Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Diário Oficial da União p.67-69, seção 1, 09/06/2014. [acesso 28 out 2018]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.

[24] BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária E Abastecimento. Instrução Normativa nº 50 de 24 de set. de 2013. Lista De Doenças De Notificação Obrigatória Ao Serviço Veterinário Oficial. Diário Oficial da União, n. 186, 25 de set. de 2013, Seção 1, p. 47. [acesso 29 novemb 2018]. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/0arquivos/a/IN%2050%20Lista%20DNO_%20DOU%202013_09_25.pdf

[25] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual do Sistema Nacional de Informação Zoossanitária – SIZ / Ministério da Agricultura. Brasília: MAPA/ACS, 2013. 40p. [acesso 21 agost 2018]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/Downloads/Manual_SIZ_09_12_2013%20\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/Downloads/Manual_SIZ_09_12_2013%20(1).pdf)

[26] Farid, AS. Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. BMC veterinary research. 2013 9;1;73.

[27] Colla, MF. 2009. Valor da haptoglobina no plasma comparado com a contagem de células somáticas do leite no diagnóstico da mastite subclínica em vacas leiteiras. 2009. 67 f. Diss. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

[28] González FHD. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. Anal Vet Mur. 2007 23:5-17.

[29] Murata H. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Veterinary Journal. 2004 168;1:28-40.

[30] Cray, C. Acute phase proteins in animals. Prog Mol Bio Transl Science. 2012 105:113-50.

[31] Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics*. 2012 19;75(14):4207-31.

[32] Ganheim C. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J Vet Med*. 2003 50:183-90.

[33] Gifford CA. Impacts of inflammation on cattle growth and carcass merit. *J An Sci* 2012 90:1438-51.

[34] Charles LE, Burchfiel CM, Fekedulegn D. et al. Sleep Duration and Oxidative Stress: The Buffalo Cardio-Metabolic Occupational Police Stress (BCOPS) Study. *The Open Sleep Journal*. 2008 1:15-25.

[35] Bastos BL, Rocha-Filho JTRR, Santana ÍP. et al. Aplicabilidade da proteína haptoglobina como bioindicador de saúde na bovinocultura de corte e leite. *PUBVET* 2018 12;3(48)1-13.

[36] Pirlot A, Janssens J, Skinner G, Godeau JM. Quantitative determination of haptoglobin (HAP) in human and bovine sera by capillary zone electrophoresis (CZE). *Vet Res*. 1999 30(5):483-93.

[37] Smith BI, Donovan GA, Risco CA et al. Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis. *Vet Rec*. 1998 Jan 24;142(4):83-5.

[38] Wells B, Innocent GT, Eckersall PD et al. Two major ruminant acute phase proteins, haptoglobin and serum amyloid A, as serum biomarkers during active sheep scab infestation. *Vet Res*. 2013 31;44:103.

[39] Elson EC. Quantitative determination of serum haptoglobin. A simple and rapid method. *Amer J Clinica Pathology*. 1974 62:655-3.

[40] Skinner JG1, Brown RA, Roberts L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Vet Rec.* 1991 16;128(7):147-9.

[41] Bowen RAR, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Med (Zagreb).* 2014 24;(1):31-44.

[42] World Organization for Animal Health (OIE). World animal health information database (WAHID). Bovine tuberculosis: January 2005 – October 2007. Paris:OIE; 2007. [acesso 28 out 2018].Disponível em:http://www.oie.int/wahidprod/public.php?page=disease_status_lists&disease_id=32.

[43] World Organization for Animal Health (OIE) . Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [online]. Paris: OIE; 2006. Bovine tuberculosis [acesso 28 out 2018].Disponível em:http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00054.htm. * Accessed 7 Oct 2007.

[44] U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service [USDA APHIS]. [acesso 7 set 2018]. Disponível em: <http://www.aphis.usda.gov/oa/pubs/fsbtb.html>.

[45] Ploeger HW, Ankum L, Moll L. et al. Presence and species identity of rumen flukes in cattle and sheep in the Netherlands. *Vet Parasitol.* 2017 30;243:42-46.

[46] Smith RA, Rogers KC, Husae S. et al. Pasture deworming and (or) subsequent feedlot performance with fenbendazole. I. Effects on grazing performance, feedlot performance and carcass traits in yearling steers. *The Bovine Practitioner.* 200 34;104-114.

[47] Alton G, Jones L, Angus R, et al. Techniques for the brucellosis laboratory. *Clin Chim Acta.* 2012 469:1-9.

[48] Corbel MJ. Identification of the immunoglobulin class active in the Rose Bengal

plate test for bovine brucellosis. *The Journal of Hygiene* 2002 70:779-95.

[49] Abertnethy DA, Menzies FD, McCullough SJ. et al. Field trail of six serological tests for bovine brucellosis. *The Veterinary Journal* 2012 191:364-370.

[50] BRASIL. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina. 9p. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Defesa Animal. [acesso 26 set 2018]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>

[51] Hajikolaei MRH, Ghorbanpour M, Abdollahpour G. Seroprevalence Of Leptospiral Infection In Buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Bull Vet Inst Pulawy* 2006 50:341-44.

[52] Lavioria MÁ, Di-Giacomo S, Bucafusco D, et al. Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle. *Vaccine*. 2012 6;30(48):6845-50.

[53] Antonella Cianferoni. Wheat allergy: diagnosis and management. *J Asthma Allergy*. 2016 9:13-25.

[54] Singh RK, Hosamani M, Balamurugan V. et al. Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim Health Res Rev* 2007 8;(1):105-14.

[55] Venkatesan G, Balamurugan V, Prabhu M. et al. Emerging and re-emerging zoonotic buffalopox infection: a severe outbreak in Kolhapur (Maharashtra), India. *Vet Ital*. 2010 46;(4):439-48.

[56] Afshar A. Bluetongue: laboratory diagnosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1994 17;(3-4):221-42.

[57] Maan S, Tiwari A, Chaudhary D. et al. A comprehensive study on seroprevalence of bluetongue virus in Haryana state of India. *Vet World*. 2017 10(12):1464-70.

[58] Kramps JA, Van Maanen K, Mars MH. et al. Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus (BTV)-specific antibodies in individual milk samples of Dutch dairy cows. *Vet Microbiol* 2007 27;130(1-2):80-7.

[59] Longjam N, Deb R, Sarmah AK. et al. A Brief Review on Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease of Livestock: Conventional to Molecular Tools. *Vet Med Int*. 2011 90:5768.

[60] Cargnelutti JF, Olinda RG, Maia LA. et al. Outbreaks of Vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. *J Vet Diagn Invest*. 2014 26;(6):788-94.

[61] González T, Licursil M, Bonzol E. Enzootic bovine leukosis: performance of an indirect ELISA applied in serological diagnosis. *Braz J Microbiol*. 2007 38.

[62] González ET, Bonzo EB, Echeverría MG. et al. Enzootic Bovine Leukosis: Development Of An Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (I-Elisa) In Seroepidemiological Studies. *Rev Microbiol*. 1999 30;1.

[63] Peruski AH, Leonard F, Peruski, Jr. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 10;(4):506-13.

[64] Shah VB, Shah BS, Puranik GV. Evaluation of noncyanide methods for hemoglobin estimation. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2011 (54):764-68.

[65] Cookson P, Sutherland J, Cardigan R. A simple spectrophotometric method for the quantification of residual haemoglobin in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2004 87: 264-71.

[66] Moharram NM, Aouad R, Busaidy S. et al. An international collaborative assessment study of the AHD- 575 method for the measurement of blood

haemoglobin. *East Mediterr J* 2006 12:722-34.

[67] Pelissari CB, Stighen ST, Nascimento AJ. et al. Padronização para a dosagem de hemoglobina extracelular pelo método da cianometahemoglobina. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*.1993 25:14 -16.

[68] Fukujima MM, Martinez TL, Pinto LE. et al. Fibrinogen as independent risk factor for ischemic stroke. *Arq Neuropsiquiatr*. 1997 55;(4):737-40.

[69] Gerspach C, Maja R, Barbara R. Investigation of coagulation and serum biochemistry profiles in dairy cattle with different degrees of fatty liver. *Band 158, Heft 12*. 2016,811-18.

[70] Sadigursky M, Brodskyn CI. A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 35;(5):942-4.

[71] Schuster FL, Sullivan JJ. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin Microbiol Rev*. 2002 15(3):374-89.

[72] Da Cruz AS, Silva DC, Costa EO, et al. Verificação Da Qualidade De Dna Genômico Extraído De Plasma Bovino Para Pcr. 2012 39;2:245-251.

[73] Ausubel FM. Epidemiology of varicose veins. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1991 1;1:68.

[74] Flores N. Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. *Biotechniques*. 1992 13:203-205.

[75] Reiniger ABF. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. *Ciência Rural*. 2004 34:5.

[76] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

[77] Yung-Sharp D, Kumar R. *Protocols for the visualisation of DNA in*

electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. *Technique*. 1989 1;3:183-87.

[78] Cao S, Zhang S, Jia L, et al . Molecular detection of *Theileria* species in sheep from northern China. *J Vet Med Sci*. 2013 75;(9):1227-30.

[79] Zanet S, Trisciuglio A, Bottero E. et al. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasit Vectors*. 2014 17;7:70.

[80] Todd C. Lorenz. *Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies*. *J Vis Exp*. 2012 63:3998-99.

[81] Razali NM, Wah YB. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *J Stat Mod Anal* 2011 2;1:21-33.

[82] Birgel EH. Influência Dos Fatores Raciais, Sexuais, Etários E Alimentares Sobre As Funções Vitais De Caprinos (*Capra Hircus*) Sadios Criados No Estado De São Paulo. *Arquivos Da Escola De Medicina Veterinária Da Ufba*, 1990 13;1:89-111.

[83] Smith MC, Sherman DM. *Goat medicine*. Lea e Febiger. 1994 23;5:620.

[84] Dalcin, VC. Physiological parameters for thermal stress in dairy cattle. *R. Bras. Zootec*. [acesso 12 nov 2018]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-92902016000800006>.

[85] MAPA - Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Regulamento técnico do programa nacional de combate e erradicação da brucelose e tuberculose, 2011. [acesso 20 nov 2018]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/das/dda>.

[86] Tizard IR. *Veterinary immunology*. *J Tissue Viability*. 2000 20;3:482.

[87] Silva RM, Facury-Filho EJ, Souza MF, Ribeiro MF. Natural infection by *Eimeria* spp. in a cohort of lambs raised extensively in Northeast Brazil. *Rev Bras Parasitol*

Vet. 2011 20;(2):134-9.

[88] Reddy BS, Sivajothi S, Rayulu VC. Clinical coccidiosis in adult cattle. *J Parasit Dis.* 2015 39;(3): 557-9.

[89] Khan MN, Rehman TU, Sajid MS. et al. Determinants influencing prevalence of coccidiosis in Pakistani buffaloes. *Pak Vet J* 2013 33;(3):287-90.

[90] Dauschies A, Eimeriosis NM. Cow: Current understanding. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005 52;(10):417-27.

[91] Pires P, Capêlo P, Ferreira D. et al. Prevalência de *Eimeria* spp. em vitelos clinicamente sãos estabulados em explorações leiteiras. *Rev electrón vet.* 2013 14;2:123-7.

[92] Lustigman S, Prichard RK, Gazzinelli A. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 6;(4):e1582.

[93] Charlier J, De Waele V, Ducheyne E. et al. Decision making on helminths in cattle: diagnostics, economics and human behaviour. *Ir Vet J.* 2016; 69:14.

[94] Merlin A, Chauvin A, Madouasse A, et al. Explaining variability in first grazing season heifer growth combining individually measured parasitological and clinical indicators with exposure to gastrointestinal nematode infection based on grazing management practice. *Vet Parasitol* 2016;225:61-9.

[95] Charlier J, Höglund J, Sanson-Hmmelstjema V. et al. Gastrointestinal Nematode Infections. *Veterinary Parasitology.* 2009 164:70-9.

[96] Höglund J, Dahlstrom F, Sollenberg S, Hesse A. Weight gain-based targeted selective treatments (TST) of gastrointestinal nematodes in first-season grazing cattle. *Vet Parasitol.* 2013 196;(3–4):358–65.

[97] Voort M, Charlier J, Lauwers L. et al. Conceptual framework for analysing farm-specific economic effects of helminth infections in ruminants and control strategies. *Prev Vet Med.* 2013 109;(3–4):228–35.

[98] Barros Ms. Seasonal Variation Of Energy Reserves And Reproduction In Neotropical Free-Tailed Bats *Molossus Molossus* (Chiroptera: Molossidae). *Braz J Biol.* 2013 73;3:629-635.

[99] Bronson FH. Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 27;364(1534):3331-40.

[100] Kabore H, Salembere MS, Tamboura HH. Seasonal variation of ticks on cattle in Burkina Faso. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 29;849:398-401.

[101] Coelli TJ, Rao DSP, O' Donnell CJ, Battese GE. An introduction to efficiency and productivity analysis. Second. New York: Springer Science and Business Media, 2005 23;45:109-123.

[102] Hamilton W, Ruto E. Entrepreneurial younger farmers and the “Young Farmer Problem” in England. *Agric For.* 2016;62:61–9.

[103] Millar J, Curtis A. Moving farmer knowledge beyond the farm gate: An Australian study of farmer knowledge in group learning. *Eur J Agric Educ Ext.* 1997 4:133-42.

[104] Sczesny-Moraes EA, Bianchin I, Da Silva KF. et al. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesq Vet Bras.* 2010;30(3):229-36.

[105] Borges SL, Oliveira AA, Mendonça LR. et al. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. *Pesq Vet Bras.* 2015 35(7):643-48.

[106] Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N. et al. Therapeutic Limitations due to Antibiotic Drug Resistance: Road to Alternate Therapies. *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery*. 2014 3;5:72-141

[107] Regea G. Review on Antibiotics Resistance and its Economic Impacts. *J of Pharmacol & Clin Res*. 2018 5(5):675.

[108] Samson-Himmelstjerna GV, Blackhall WW. Technology Provide Solutions For Drug Resistance In Veterinary Helminthes? *Veterinary Parasitology*. 2005 132(3-4):223-39.

[109] Paulin LMS, Samartino LE, Conde SB. et al. Avaliação de testes sorológicos de triagem para diagnóstico da brucelose bubalina. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010 62;4:989-92.

[110] Paulin LMS, Ferreira Neto JS. Brucelose Em Búfalos. *Arq Inst Biol*. 2008 75;3:389-401.

[111] MAPA - Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico do programa nacional de combate e erradicação da brucelose e tuberculose, 2015. [acesso 19 out 2018]. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/das/dda>.

[112] Fosgatea GT, Dipteeb MD, Ramnananc A. et al. Brucellosis in domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) of Trinidad and Tobago with comparative epidemiology to cattle. *Tropical Animal Health and Production*. 2014 3(8):1479-86.

[113] Srivastava A, Chaudhary HS. Brucellosis: Its Diagnosis, Prevention and Treatment. *J Chem Pharm Res*. 2011 3(6):912-17.

[114] Khan MZ, Zahoor M. An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies. *Trop Med Infect Dis*. 2018 3:65.

[115] Jardim GC, Pires PP, Mathias LA. et al. Diagnóstico sorológico da brucelose bovina em animais adultos vacinados com dose reduzida da cepa 19 de *Brucella abortus*. Pesq Vet Bras. 2006 26(3):177-82.

[116] Poester FP, Ramos ET, Gomes MJP. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 2000 37;(1):123-124.

[117] Mathias LA, Chaves LF, Chen AA. Evolução de títulos sorológicos, nas provas de soroaglutinação em placa, antígeno acidificado tamponado e fixação de complemento, em bezerros Nelore vacinados aos 18 meses de idade com *Brucella abortus* amostra B 19. Pesq Vet Bras. 2001 21(4):139-142.

[118] Costa GM, Abreu VLV, Lobato FCF. et al. Avaliação do teste de imunodifusão mediante emprego do polissacarídeo "O" no diagnóstico da brucelose bovina. Arq Bras Med Vet Zootec. 1999 51;(4):317-22.

[119] Samartino L, Buffoni L, Conde S, Gregoret R. Nuevas metodologías para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. Revta Med Vet. 2000 82(2):90-94.

[120] Viana FC, Villela LG, Silva JA. et al. Vacinação contra brucelose bovina com dose reduzida da vacina (amostra 19) por via conjuntival. Arq Esc Vet. 1982 34:279-87.

[121] Kuster K, Cousin M, Jemmi T. et al. Expert Opinion on the Perceived Effectiveness and Importance of On-Farm Biosecurity Measures for Cattle and Swine Farms in Switzerland. PLoS One. 2015 10;10(12):e0144533.

[122] Radostits OM. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 2007 23;4:2156.

[123] Del Fava, C. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema de produção semi-intensivo. Arquivos do Instituto Biológico. 2003 70;1:25-33.

[124] Barkallah M, Gharbi Y, Hassena AB. et al. Survey of infectious etiologies of

bovine abortion during mid- to late gestation in dairy herds. PLoS One. 2014 24;9(3):e91549.

[125] Hemmatzadeh F, Boardman W, Alinejad A. et al. Molecular and Serological Survey of Selected Viruses in Free-Ranging Wild Ruminants in Iran. PLoS One. 2016 20;11(12):e0168756.

[126] Brito D. Fernandez FAS. Dealing with extinction if forever: understanding the risks faced by small populations. Ciência e Cultura. 2000 52:161-170.

[127] Sauter-Louis C, Jones BA, Henning J. et al. Herd-level animal management factors associated with the occurrence of bovine neonatal pancytopenia in calves in a multi-country study. PLoS One. 2017 5;12(7):e0179878.

[128] Dubay S, Jacques C, Golden N. et al. Environmental Factors Influencing White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) Exposure to Livestock Pathogens in Wisconsin. Environmental Factors Influencing White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) Exposure to Livestock Pathogens in Wisconsin. PLoS One. 2015 Jun 1;10(6):e0128827.

[129] Flores, Eduardo F. et al. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil: histórico, situação atual e perspectivas. Pesq Vet Bras. 2005 25;3:125-134.

[130] Dias FC, Samara SI. Detecção de anticorpos contra o vírus da diarreia viral bovina no soro sanguíneo, no leite individual e no leite de conjunto em tanque de expansão de rebanhos não vacinados. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2003 40:161-68.

[131] Poletto R, Kreutz LC, Gonzales JC. et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo. Ciência Rural. 2004 34;2:595-8.

[132] Álvarez-García G, Pereira-Bueno J, Gómes-Bautista M, et al. Pattern Of Recognition Of Neospora Caninum Tachyzoite Antigens By Naturally Infected Pregnant Cattle And Aborted Foetuses. *Veterinary Parasitology*. 2002 107;1-2:15-27.

[133] Del fava C, Arcaro JRP, Pozzi CR. et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2003 70;1:25-33.

[134] Frandoloso R, Anziliero D, Spagnolo J, et al. Prevalência de leucose enzoótica bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 2008 9;4:1102-6.

[135] Clazer M, Rodrigues GV; Martins-Ferreira BP. et al. Toxoplasmosis, leptospirosis, and brucellosis seroepidemiology in veterinary medical students and their relation with unique health. *Ciências Agrárias*. 2017;38:3,1347-60.

[136] Huong LTT, Ljungstrom BLL, Ugglá A. et al. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and buffaloes in southern Vietnam. *Vet. Parasitol*. 1998 75:53-7.

[137] Magalhães FJR, Ribeiro-Andrade M, Alcântara AM. et al. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle from Fernando de Noronha Island, Brazil. *Braz. J Vet Parasitol*. 2;16:89-93.

[138] López-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K. et al. Neospora-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J. Vet. Med*. 2004 51:348-352.

[139] Da Silval JB, Castrol NS, Dos Santos PN. et al. Detection of a high prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cattle in Northern and Midwestern Brazil. *Rev Salud Anim*. 2015;37(1):52-56.

[140] Barros AAM, Molnár E, Carvalho M, Molnár L. IELISA e latex- aglutinação

utilizados para detectar anticorpos anti-Toxoplasma gondii em diferentes animais domésticos. Rev Bras Cienc Farm. 1999 41:43-8.

[141] Wang Y, Wang G, Cai J, Yin H. Review on the identification and role of Toxoplasma gondii antigenic epitopes. Parasitol Res. 2016 115(2):459-68.

[142] Vogel FSF, Arenhart S, Bauermann FV. Anticorpos anti-Neospora caninum em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. Ciência Rural. 2006 36;6:1948-51.

[143] Fujii TU, Kasai N, Vasconcellos SA. et al. Anticorpos Anti-Neospora Caninum E Contra Outros Agentes De Abortamentos Em Búfalas Da Região Do Vale Do Ribeira, São Paulo, Brasil. Arq Inst Biol. 2001 68;2:5-9.

[144] Lima DN, Neves MF. Neosporose. Revista científica eletrônica de medicina veterinária. J Am Acad. 2008 58:185-206.

[145] Nie LB, Zou Y, Hou JL et al. First report of Neospora caninum seroprevalence in farmed raccoon dogs in China. Acta Trop. 2018 5;190:80-82.

[146] Bártová E, Kobédová K, Lamka J, Kotrba R, Vodička R, Sedlák K. Seroprevalence of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in exotic ruminants and camelids in the Czech Republic. Parasitol Res. 2017 116(7):1925-29.

[147] Marugan-Hernandez V. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. J Comp Pathol. 2017 157;(2-3):193-200.

[148] Aguado-Martínez A, Basto AP, Leitão A. et al. *Neospora caninum* in non-pregnant and pregnant mouse models: cross-talk between infection and immunity. Int J Parasitol. 2017 47(12):723-35.

[149] ANUALPEC 2000: Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2000. p. 330.

[150] Camargo ME. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop.* 1964 6;(3):117-18.

[151] Chhabra MB, Gupta SL, Gautam OP. Toxoplasma seroprevalence in animals in Northern India. *Int J Zoon.* 1985 12:136-42.

[152] Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res.* 1996 60;2:133-39.

[153] Huong LTT, Ljungstrom BL, Uggla A. et al. Prevalence of antibodies to Neospora caninum and Toxoplasma gondii in cattle and water buffaloes in Southern Vietnam. *Vet. Parasitol.* 1998 75:53-7.

[154] BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2016. [acesso 28 out 2018].Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai.pdf

[155] Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the Polymerase Chain Reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in a endemic region of North-Eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1996 90:129-32.

[156] Chiari E. Chagas Disease Diagnosis using Polymerase Chain Reaction, hemoculture and serologic methods. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1999 94:299-300.

[157] Silveira JM, Melo HJH, Paiva F, Ribeiro OC. Trypanosoma em bovinos, no estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq Agropec Bras.* 1984 19;11:1433- 1436.

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

- [159] BRASIL elimina transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans. NEWS. MED.BR, 2006. [acesso 10 ago 2018]. Disponível em: <<http://www.news.med.br/p/saude/1317/brasilelimina-transmissao-da-doenca-de-chagas-pelo-triatoma-infestans.htm>>.
- [160] Soosaraei M1, Haghi MM2, Etemadifar F2, Fakhar M3, Teshnizi SH4, Hezarjaribi HZ3, Asfaram S1. Status of theileriosis among herbivores in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Vet World*. 2018 11(3):332-41.
- [161] Laisser EL, Chenyambuga SW, Karimuribo ED. et al. A review on prevalence, control measure, and tolerance of Tanzania Shorthorn Zebu cattle to East Coast fever in Tanzania. *Trop Anim Health Prod*. 2017 49;(4):813-22.
- [162] Mans BJ, Pienaar R, Abdalla A. Latifa. A review of Theileria diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2015 4;(1):104-18.
- [163] Kock RA, Woodford MH, Rossiter PB. Disease risks associated with the translocation of wildlife. *Rev Sci Tech*. 2010 29(2):329-50.
- [164] Parizi LF, Pohl PC, Masuda A, Vaz Ida S Jr. New approaches toward anti-Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2009 18(1):1-7.
- [165] Lourenço-Junior JB, Garcia AR, Costa NA, Da Silva MB. Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. *Climate Risk Management*. 2017 16:145-63.
- [166] Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, Krause PJ, David H. Persing. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*. 2000 13;(3):451-9.
- [167] Weerasooriya G, Sivakumar T, Lan DT. et al. Epidemiology of bovine hemoprotozoa parasites in cattle and water buffalo in Vietnam. *J Vet Med Sci*. 2016 1;78(8):1361-7.

- [168] Singh NK, Singh H, Haque JM, Rath SS. Prevalence of Parasitic Infections in Buffaloes in and around Ludhiana District, Punjab, India: A Preliminary Study. *Journal of Buffalo Science*. 2012 11(1):1-14.
- [169] Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011 3(1):118-127.
- [170] Sorensen NS, Tegtmeier C, Andresen LO. et al. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006 15;113(1-2):157-68.
- [171] Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*. 2004 35;(2):163-87.
- [172] Tourlomoussis P, Eckersall PD, Waterson MM, Buncic S. A comparison of acute phase protein measurements and meat inspection findings in cattle. *Foodborne Pathog Dis*. 2004 1;(4):281-90.
- [173] Takahashi E, Uzuka Y, Tanabe S, Satoh M, Furuoka H. Serum amyloid A and haptoglobin levels in bovine amyloidosis. *J Vet Med Sci*. 2007 69(3):321-3.
- [174] Tothova C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Veterinari Medicina*. 2014 59, (4):163-80.
- [175] Lomborg SR, Nielsen LR, Heegaard PM, Jacobsen S. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet Res Commun*. 2008 32(7):575-82.
- [176] Moisé SJ, Aly SS, Lehenbauer TW. Association of plasma haptoglobin concentration and other biomarkers with bovine respiratory disease status in pre-weaned dairy calves. *J Vet Diagn Invest*. 2018 17:1040638718807242.
- [177] Kähn W, Fraunholz J, Kaspar B, Pyczak T. Sonographic diagnosis of early

pregnancy in horses, cattle, sheep, goats, swine, dogs and cats. Standard values and limitations. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1990 1103;(6):206-11.

[178] Kapralov A, Vlasova II, Feng W. et al. Peroxidase activity of hemoglobin-haptoglobin complexes: covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages. *J Biol Chem.* 2009 30;284(44):30395-407.

[179] Grigorieva DV, Gorudko IV, Sokolov AV. et al. Measurement of plasma hemoglobin peroxidase activity. *Bull Exp Biol Med.* 2013 155;(1):118-21.

[180] Pimenova T, Pereira CP, Gehrig P. et al. Quantitative mass spectrometry defines an oxidative hotspot in hemoglobin that is specifically protected by haptoglobin. *J Proteome Res.* 2010 6;9(8):4061-70.

[181] Banerjee S, Jia Y, Siburt CJ, Abraham B, Wood F, Bonaventura C, Henkens R, Crumbliss AL, Alayash AI. Haptoglobin alters oxygenation and oxidation of hemoglobin and decreases propagation of peroxide-induced oxidative reactions. *Free Radic Biol Med.* 2012 15;53(6):1317-26.

[182] Eckersall PD. The Plasma Proteins. *Rev Med Vet.* 2000;151:577-84.

[183] Doolittle, R.F., The Structure and Evolution of Vertebrate Fibrinogen. *Acad. Sci.* 1983 408:13-27.

[184] Henschen A. Covalent Structure of Fibrinogen. *Acad Sci.* 1983 408:28-43.

[185] Blomback M. Cell biology of wound healing. *Nature.* 1968;218:134-137.

[186] Takagi T, Doolittle RF. Essentials of Veterinary hematology. *Biochemistry.* 1975 14(5),940-946.

[187] Horadagoda A, Eckersall P.D. Purification and qualitative measurement of bovine serum amyloid-A. *Res Vet Sci.* 1993 55:317- 25.

[188] Kaneko JJ. Clinical biochemistry of domestic animals. *Nat Biotechnol.* 1997;14:932.

- [189] Jain NC. Essentials of veterinary haematology. J Biol Chem. 1993;250:989.
- [190] Nielsen BH, Jacobsen S, Andersen PH. et al. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. Vet. Rec. 2004 154:361-5.
- [191] Simplício KMMG, Sousa FC, Fagliari JJ, Silva PC. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. Arq Bras Med Vet Zootec. 2013 65;5:1339-47.
- [192] Eckersall, P.D. Proteins Proteomics and the Dysproteinemias. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bruss, M.L., Eds., Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6th Edition, Academic Press, San Diego, 2008, 117-155.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Proc. No. 2012/08101-8 (RSFJr), Proc. No. 2014/13299-7 (LDS); pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Proc. Nº 563582/2010-3 (BB), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) AUX-PE Toxinologia Proc. 23038.006285/2011-21 e PNPD nº 23038.008557/2010 (BB). Agradecimentos especiais também são estendidos ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), por possibilitar a publicação deste artigo; ao Instituto Biológico de São Paulo, por possibilitar os exames sorológico e parasitológico dos animais; ao Laboratório Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) de Bauru por auxiliar nas análises de hemocultura e, ao proprietário Sr. Aristides da propriedade privada situada na cidade de Pereiras, SP por ceder seu rebanho de búfalos para a realização do estudo clínico Fase I/II no tratamento de úlceras venosas crônicas.

Artigo Científico II

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS CANDIDATOS A BIOMARCADORES EM
SORO DE BÚFALOS COM BRUCELOSE, PELA ANÁLISE PROTEÔMICA**

***Identification of potential candidates to biomarcadores in sof of buffalo with
brucellosis, by proteomal analysis***

RESUMO

Introdução

Brucella spp. (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*) é um patógeno intracelulares facultativos que causam a brucelose crônica em humanos e animais. A virulência de *Brucella spp.* depende primariamente de sua sobrevivência bem sucedida nas células do hospedeiro. Isto sugere que *Brucella spp.* seja capaz de regular sua adaptação metabólica em resposta ao hospedeiro. Uma investigação sobre os potenciais candidatos à biomarcadores de brucelose (ferramentas úteis para o diagnóstico clínico) em soro de búfalos utilizando análise proteômica pode contribuir para uma melhor compreensão de sua patogênese e resposta adaptativa. Neste artigo utilizamos cromatografia líquida de afinidade para remoção de albumina, proteína majoritária no soro, para que possamos observar possíveis marcadores diagnósticos para brucelose nas proteínas minoritárias.

Resultados

As principais diferenças no proteoma do soro de búfalos em estudo foram 12 proteínas reguladas positivamente [dentre elas hemoglobina B (gi|223864), beta-2-glicoproteína 1 (gi|2506196), região constante da cadeia pesada de IgG3 (gi|1575493), hemoglobina B (gi|223864), imunoglobulina (gi|98991288)] e 5 reguladas negativamente [dentre elas, precursores de ceruloplasmina (gi | 375065868)], pertencentes à interação proteína-proteína, metabolismo energético e transporte iônico.

Conclusões

Em conclusão, nossos resultados fornecem uma melhor compreensão das adaptações metabólicas da *Brucella spp.* em búfalos. A identificação de possíveis biomarcadores de brucelose em soro de búfalos utilizando análise proteômica é crucial para elucidar o processo infeccioso, a fim de controlar a brucelose, e facilitar a descoberta de alvos terapêuticos e vacinas eficazes.

Palavras-chave: Brucelose, análise proteômica, biomarcadores moleculares, *shotgun*.

ABSTRACT

Background

Brucella spp. (*B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*) is a facultative intracellular pathogen that causes chronic brucellosis in humans and animals. The virulence of *Brucella* spp. depends primarily on their successful survival in host cells. This suggests that *Brucella* spp. is able to regulate its metabolic adaptation in response to the host. An investigation into potential biomarkers of buffalo serum brucellosis using proteomic analysis (useful tools for clinical diagnosis) may contribute to a better understanding of its pathogenesis and adaptive response. In this paper we used liquid affinity chromatography to remove albumin, the major protein in the serum, so that we can observe possible diagnostic markers for brucellosis in the minority proteins.

Results

The major differences in the buffalo serum proteome under study were 12 positively regulated proteins [among them we have the hemoglobin B group (gi | 223864 [11]), beta-2-glycoprotein 1 (gi | 2506196 [6+]), region IgG3 heavy chain constant (gi | 1575493 [1+]), hemoglobin B (gi | 223864), immunoglobulin heavy chain variable region (gi | 98991288), and negatively regulated [among them we have precursor ceruloplasmin (gi | 375065868 [2+])], belonging to the protein-protein interaction, energy metabolism and ionic transport.

Conclusion

In conclusion, our results provide a better understanding of the metabolic adaptations of *Brucella* spp in buffaloes. The identification of possible brucellosis biomarkers in buffalo serum using proteomic analysis is crucial to elucidate the infectious process in order to control brucellosis and facilitate the discovery of effective therapeutic targets and vaccines.

Keywords: Brucellosis, proteomic analysis, biomarkers, shotgun.

1. INTRODUÇÃO

A *Brucella spp.* é um patógeno intracelular facultativo que causa a brucelose, que resulta em aborto e infertilidade no hospedeiro natural^{1,2}. Sua patogenicidade depende principalmente de sua capacidade de sobreviver e proliferar dentro de células do hospedeiro³⁻⁵.

No Brasil, Brucelose é de notificação obrigatória animais positivos devem ser abatidos imediatamente, fato que causa grandes perdas econômicas na indústria pecuária^{6,7}. Para que isso não ocorra, nos últimos anos, a proteômica tornou-se um instrumento indispensável para investigar os mecanismos de adaptação metabólica de vários organismos⁸⁻¹⁰. A avaliação dos padrões do proteoma de um patógeno como a *Brucella ssp.* pode contribuir para uma melhor compreensão da patogênese do patógeno. No entanto, as abordagens proteômicas anteriores empregaram eletroforese bidimensional (2-D), técnica limitada devido sua baixa reprodutibilidade¹¹.

As estratégias de controle da brucelose têm como base a redução constante do número de focos da doença, além do controle do trânsito de animais¹². A introdução dos animais infectados em rebanhos sadios constitui o principal risco nas propriedades rurais, por isso o comércio de animais só deve ocorrer quando há condições sanitárias ideais e que todos os animais sejam submetidos a testes de diagnóstico que garantam a sanidade do rebanho¹³⁻¹⁵.

A erradicação da brucelose em animais de fazenda, associada à prevenção da infecção humana, pode ser alcançada através de um diagnóstico preciso¹⁶. O desenvolvimento de um diagnóstico de brucelose específico para bubalinos é o início para estabelecermos a ocorrência, distribuição e caracterização do agente^{17,18}.

Os biomarcadores podem ser utilizados na rotina de inspeção sanitária, fiscalização e inspeção nos estabelecimentos de abate ¹⁹⁻²². Neste contexto, objetivou-se realizar a busca de potenciais candidatos à biomarcadores de brucelose em soro de búfalos, utilizando a análise proteômica como principal ferramenta.

2. MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos e seleção de animais

Os soros dos bubalinos sadios foram coletados da veia jugular dos animais, segundo os procedimentos descritos por Pontes e colaboradores ²³. Foram coletados 50ml de sangue em tubos BD Vacutainer® Seditainer® de vinte bubalas sadias da espécie *Bubalus bubalis*, raça Murrah, com idades entre três a quatro anos. Os procedimentos de manejo e monitoramento foram segundo Pontes e colaboradores ²³. Vinte amostras de sangue de búfalos infectados com brucelose foram gentilmente cedidas pelo Instituto Biológico de São Paulo. Todos os experimentos com animais aqui descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob o processo CEEA 1134/2015 - CEUA, e de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Alíquotas de soro foram armazenadas a -80° C e os espécimes analisados foram congelados e descongelados apenas uma vez. Todos os animais deste estudo foram vacinados para brucelose seguindo normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) ¹³.

2.2 Diagnóstico sorológico para detecção de brucelose

O diagnóstico sorológico foi realizado com 2-mercaptoetanol e o teste de fixação do complemento da brucela (CFT), utilizando-se antígenos e procedimentos previamente descritos na literatura²⁴⁻²⁵. A CFT foi considerada positiva quando pelo menos 50% da hemólise ocorreu na diluição sérica > 20 ICFTU [Unidades internacionais de teste de fixação do complemento]/mL²⁶.

2.3. Cromatografia líquida de afinidade

As quarentas amostras de soro dos búfalos foram filtradas utilizando um filtro de 0,22 µm para remover potenciais materiais particulados. Uma cromatografia líquida de afinidade para cada amostra foi elaborada utilizando um equipamento AKTA Purifier S-100 (GE Healthcare), uma coluna anti-BSA [Multi Affinity Removal HSA Column (4.6 x 50mm, código 5188-6562, Agilent Technologies)], tampão A (código 5185-5987, Agilent Technologies) e tampão B (código 5185-5988, Agilent Technologies). A força iônica do tampão B é maior que do tampão A, de acordo com o fabricante. O gradiente utilizado foi de 0% do tampão por 20 minutos à 0,25 µL/min, 0% do tampão B por 2 minutos à 1 mL/min, 100% do tampão B por 6 minutos à 1 mL/min e 0% do tampão B por 6 minutos à 1mL/min. Frações de 1 mL/tubo foram coletadas e a absorbância utilizada foi de 280 nm.

2.4 Quantificação de proteínas

A concentração total protéica de cada amostra oriunda da cromatografia líquida de afinidade foi determinada em triplicata pelo ensaio de Bradford (BioRad, CA,

EUA) de acordo com as instruções do fabricante ²⁷.

2.5 Quantificação de Albumina

A determinação da concentração sérica da albumina foi realizada por meio de um kit de dosagem de albumina, código 02B (Katal, Belo Horizonte, Brasil), por meio da técnica de ligação do corante verde de bromocresol, utilizando equipamento espectrofotométrico a 630nm (Sysmex CA-660, Siemens Healthineers USA).

2.6 Digestão de proteínas em solução

A digestão de proteínas do soro total e amostras depletadas foi realizada conforme descrito por Pontes e colaboradores²³ na presença de DTT e IAA. A enzima tripsina (Promega V5111) foi usada na proporção de 1:50.

2.7 Análise de Espectrometria de Massas

Uma alíquota de 4,5µL de cada amostra foi injetada individualmente em uma coluna analítica C18 1.7 µm BEH 130 em um sistema de cromatografia líquida de fase contínua (NanoAcquity UPLC, Waters, Milford, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa Q-TOF-PREMIER (MicroMass, Waters, Milford, EUA) ²³. O equipamento foi gentilmente cedido pelo Laboratório Nacional de Biociência (LNBio) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil. O gradiente linear utilizado foi de 2 a 90% (v/v) de acetonitrila em ácido fórmico à 0,1% (v/v) durante 60 minutos com um caudal de 600 nL/min. O equipamento foi operado no modo de ionização positiva e os dados foram continuamente monitorados em massas moleculares variando entre 100 e 2.000 m/z.

2.8 Análise dos dados

O alinhamento estrutural da proteína albumina de *Bos taurus*, *Bubalus bubalis* e *Homo sapiens* disponíveis no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) foi realizado com o software Multialign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>)²⁴

Os dados de espectrometria de massas foram submetidos à análise automática com o software MASCOT v.2.1 (www.matrixscience.com), utilizando os seguintes parâmetros: banco de dados NCBI; Taxonomia *Bos taurus*; Enzima tripsina; uma clivagem perdida pela enzima; carbamidometilação como modificação fixa; oxidação de metionina como modificação variável; massa molecular do monoisotopo; erro de tolerância do peptídeo para MS e MS/MS $\pm 0,1$ Da; protonação + 2, +3, +4 e instrumento ESI-Q-TOF. As contagens espectrais para todas as proteínas identificadas foram realizadas com a ferramenta Scaffold Q+ (Proteome Software, Inc., Portland, OR), e a taxa de descoberta falsa (FDR) foi de 1% para as proteínas e 0,1% para os peptídeos, com uma confiabilidade de 95%. Para a quantificação de proteínas por espectrometria de massas utilizou-se o quesito de que pelo menos dois peptídeos fossem partilhados entre amostras do mesmo grupo, sendo que a média das contagens espectrais das três análises para cada proteína foram consideradas neste estudo²⁵⁻²⁷.

Para a análise dos potenciais biomarcadores proteicos para a doença brucelose foi construída uma matriz compatível ao programa Metaboanalyst ²⁸⁻²⁹ (<https://www.metaboanalyst.ca/>) que possibilitou a obtenção do *Heatmaps* das proteínas, do gráfico no formato de Vulcano-plot de pontuação e do PLS-DA. As contagens espectrais foram normalizadas para cada proteína identificada pela média

ponderada das triplicatas de cada amostra. Proteínas que foram identificadas em menos de 30% das amostras foram excluídas da análise, e para as outras proteínas, as quantificações que resultaram em zero foram estimadas por múltipla imputação. A normalidade das amostras foi estimada pelo teste de Shapiro-Wilk. Análise de componentes principais (PCA) foi realizada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O alinhamento da seqüência protéica da albumina de *Bubalus bubalis*, *Bos taurus* e *Homo sapiens* demonstrou uma alta identidade de seqüência entre eles (Figura 1). Esses alinhamentos estruturais indicaram 75,9% e 77% de identidade entre a albumina humana e as albuminas de *Bubalus bubalis* e *Bos taurus*, respectivamente.

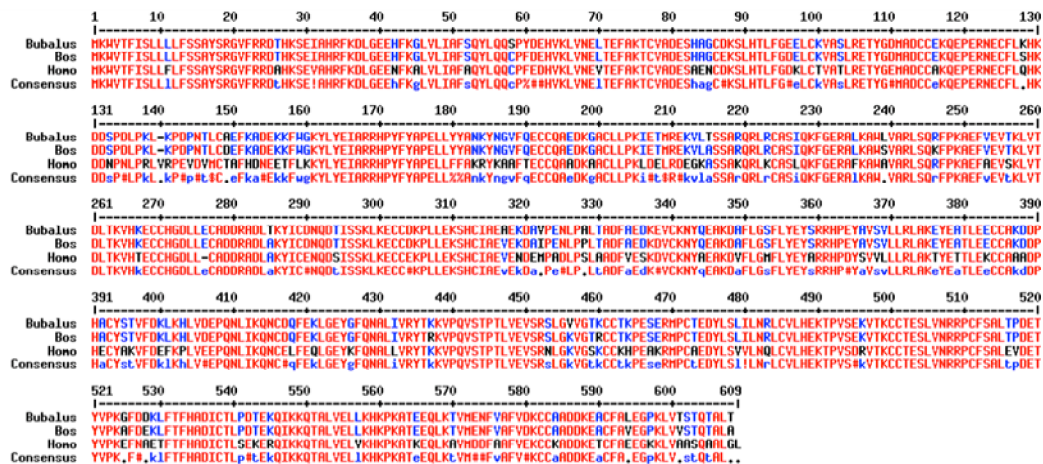


Figura 1: Alinhamento estrutural de albumina de *Bos taurus* (AAA51411), *Bubalus bubalis* (XP_006047011) e *Homo sapiens* (AAA98797) disponível no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein). Este alinhamento foi realizado usando o software Multialign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>).

Como não há matrizes cromatográficas com ligantes específicos para isolar proteínas específicas de animais como as de bubalinos, e diante dos dados de alinhamento estrutural evidenciado anteriormente, utilizou-se uma coluna anti-BSA humana, a qual permitiu o isolamento da albumina do soro total dos búfalos por

cromatografia de afinidade e, desta forma, proporcionou a redução da complexidade da amostra. O perfil de cromatográfico de afinidade mostrou duas frações: fração não ligante [pico A] e fração do ligante [pico B] (Figura 2).

A dosagem de albumina no soro total e nas frações resultantes da cromatografia de afinidade evidenciou que a concentração de albumina no soro total foi em média de 298 g/L, enquanto a concentração de BSA no pico A foi de 5 g/L e no pico B, 250 g/L. A quantificação da albumina mostrou uma redução importante do nível de albumina de 98,3% no pico A comparado com a amostra antes da cromatografia de afinidade.

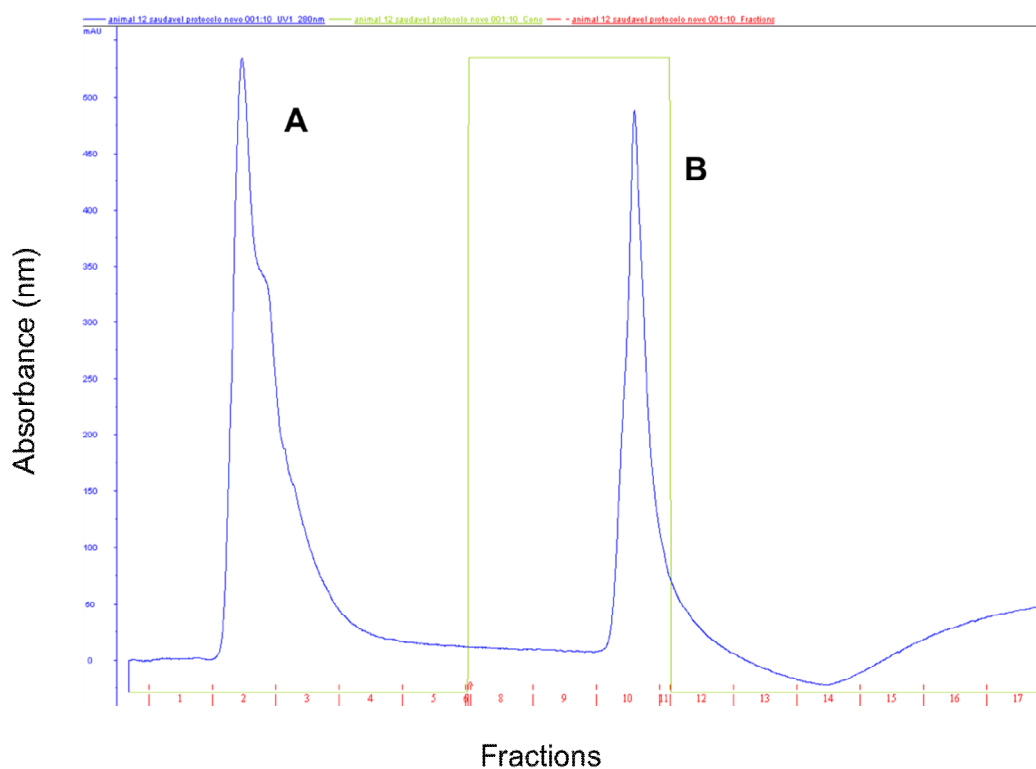


Figura 2: Perfil proteico do soro total de bubalinos utilizando uma coluna anti-BSA humana [Multi Affinity Removal HSA Column Agilent Technologies). Pico A: fração não ligante. Pico B: fração ligante (UV – 280nm).

Uma vez avaliada a efetividade da estratégia de depleção de BSA no soro dos búfalos, as amostras foram submetidas à espectrometria de massas e, cento e quinze proteínas totais no pico A foram identificadas (entre os perfis proteômicos dos animais saudáveis e animais não saudáveis) enquanto que, apenas onze proteínas foram detectadas no soro total dos animais saudáveis (Tabela 1). Todos os picos B apresentaram uma identificação de proteína com massa molecular de 69 kDa, sendo caracterizados como albumina.

Tabela1: Identificação das proteínas do soro total e do soro depletado de búfalos *Bubalus bubalis* pela estratégia *Shotgun*.

| # | Proteínas identificadas | Código de acesso | Massa molecular | Soro total Animais Saudáveis | Soro depletado Animais Saudáveis | Soro depletado Animais com Brucelose |
|----|--|------------------|-----------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | Serum albumin | gi 1351907 | 69 kDa | x | x | x |
| 2 | Ig heavy chain precursor | gi 108750 | 50.6kDa | | x | x |
| 3 | Alpha-2-macroglobulin precursor | gi 157954061 | 168 kDa | | x | x |
| 4 | Serotransferrin precursor | gi 296490958 | 776 kDa | x | x | x |
| 5 | Complement C3 | gi 124056491 | 187 kDa | | x | x |
| 6 | Immunoglobulin heavy chain | gi 34538498 | 49.9 kDa | | x | x |
| 7 | Apolipoprotein A-I | gi 113988 | 30 kDa | x | x | x |
| 8 | Immunoglobulin light chain | gi 2323374 | 11.4 kDa | | x | x |
| 9 | Vitamin D-binding protein precursor | gi 78369364 | 53 kDa | | x | x |
| 10 | Apolipoprotein A-II | gi 109940051 | 11 kDa | x | x | x |
| 11 | Hemoglobin beta | gi 223864 | 15.9 kDa | | x | x |
| 12 | Alpha-1-antitrypsin precursor | gi 27806941 | 46 kDa | x | x | x |
| 13 | Alpha-2-HS-glycoprotein | gi 112909 | 38 kDa | | x | x |
| 14 | Complement C4 precursor | gi 262050656 | 192.8 kDa | | x | x |
| 15 | Alpha-1B-glycoprotein precursor[Bos taurus] | gi 114053019 | 54 kDa | x | x | x |
| 16 | IgG3 heavy chain | gi 1575493 | 38.6 kDa | | x | x |
| 17 | Beta-2-glycoprotein 1 | gi 2506196 | 38 kDa | x | x | x |
| 18 | Prothrombin | gi 135806 | 71 kDa | x | x | x |
| 19 | Complement factor B | gi 146345391 | 85 kDa | x | x | x |
| 20 | Immunoglobulin mu heavy chain variable region, partial | gi 98991288 | 13.4 kDa | | x | x |
| 21 | Pregnancy-zone protein-like | gi 296487204 | 158.9 kDa | | x | x |
| 22 | Ceruloplasmin precursor | gi 375065868 | 121 kDa | | x | x |
| 23 | Protein HP-25 homolog 2 | gi 114052108 | 23 kDa | | x | x |
| 24 | Hemopexin | gi 122140288 | 52 kDa | | x | x |
| 25 | Kininogen-2 isoform I precursor | gi 164450479 | 69 kDa | | x | x |
| 26 | Histidine-rich glycoprotein | gi 13358874 | 61.9 kDa | | x | x |
| 27 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain | gi 122140331 | 102 kDa | | x | x |
| 28 | Pigment epithelium-derived factor | gi 2500778 | 46 kDa | | x | x |
| 29 | Serpin A3-5 precursor | gi 126165236 | 46 kDa | | x | x |
| 30 | Talin-1 | gi 329664158 | 270 kDa | | x | |
| 31 | IGK protein | gi 115545495 | 26.6 kDa | | x | x |
| 32 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor | gi 148238273 | 106 kDa | | x | x |
| 33 | Immunoglobulin heavy chain variable region | gi 1293580 | 14.6 kDa | x | x | x |
| 34 | Hemoglobin alpha chain | gi 6006423 | 15.6 kDa | | | x |
| 35 | Transitional endoplasmic reticulum ATPase | gi 122140828 | 89 kDa | | x | |
| 36 | Tubulin alpha-1B chain | gi 168804008 | 50 kDa | | x | |
| 37 | Fibrinogen alpha chain precursor | gi 75812954 | 67 kDa | | | x |
| 38 | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 precursor | gi 115496418 | 101 kDa | | x | x |
| 39 | Clusterin | gi 116530 | 51 kDa | | x | x |

| | | | | | | |
|----|---|--------------|-----------|---|---|---|
| 40 | Tubulin beta-5 chain | gil114052731 | 50 kDa | | | x |
| 41 | Immunoglobulin heavy chain | gil1322324 | 11.7 kDa | | | x |
| 42 | Protein HP-20 homolog precursor | gil114051225 | 21 kDa | | x | x |
| 43 | Hypothetical protein BOS_8753 | gil296484830 | 151.2 kDa | | x | x |
| 44 | Alpha-1-microglobulin | gil2506821 | 39 kDa | | | x |
| 45 | Haptoglobin precursor | gil2144490 | 14.2 kDa | | x | x |
| 46 | Nucleolin | gil331284195 | 78 kDa | | x | |
| 47 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A | gil30315666 | 18 kDa | | x | |
| 48 | Serpin A3-7 precursor | gil75832097 | 47 kDa | | x | x |
| 49 | N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase isoform X3 | gil119894607 | 63.5 kDa | | | x |
| 50 | Haptoglobin | gil122137096 | 45 kDa | | | x |
| 51 | Primary amine oxidase | gil30794300 | 85 kDa | | | x |
| 52 | Complement factor H | gil115298718 | 140 kDa | | x | x |
| 53 | Annexin A2 | gil113948 | 39 kDa | | x | |
| 54 | Keratin, type II cytoskeletal 5 | gil56710317 | 63 kDa | | x | x |
| 55 | Alpha-enolase | gil109940077 | 47 kDa | | x | |
| 56 | Alpha-1-acid glycoprotein | gil121957959 | 23 kDa | | x | x |
| 57 | Uncharacterized protein LOC614970 | gil528924507 | 33.7 kDa | | x | |
| 58 | Transthyretin precursor | gil27806789 | 16 kDa | | x | |
| 59 | 60 kDa heat shock protein | gil262205489 | 61 kDa | | x | |
| 60 | Fibrinogen beta chain | gil1346006 | 53 kDa | | | x |
| 61 | Myosin-9 | gil300795444 | 227 kDa | | x | |
| 62 | Heat shock cognate 71 kDa protein | gil148887198 | 71 kDa | | x | |
| 63 | Tropomyosin alpha-4 chain | gil155372051 | 33 kDa | | x | |
| 64 | Profilin-Beta-Actin | gil313507212 | 41.7 kDa | | x | |
| 65 | Plectin-like | gil359072156 | 526.6 kDa | | x | |
| 66 | Cofilin-1 | gil62751777 | 19 kDa | | x | |
| 67 | Immunoglobulin J chain precursor | gil32401410 | 18 kDa | | x | |
| 68 | Signal recognition particle 14 kDa protein | gil154152053 | 12 kDa | | x | |
| 69 | Fibrinogen gamma-B chain isoform X1 | gil528981276 | 49.2 kDa | | | x |
| 70 | Gelsolin | gil122140093 | 81 kDa | | x | |
| 71 | Fetuin-B | gil75057635 | 43 kDa | x | | x |
| 72 | Uncharacterized protein LOC524810 precursor | gil326937675 | 52 kDa | | | x |
| 73 | Factor XIIIa inhibitor precursor | gil296479521 | 51.7 kDa | | x | x |
| 74 | Immunoglobulin lambda light chain variable region | gil1276607 | 13.6 kDa | | x | x |
| 75 | Fascin | gil78045491 | 55 kDa | | x | |
| 76 | T-complex protein 1 subunit beta | gil115305838 | 57 kDa | | x | |
| 77 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 | gil109892458 | 49 kDa | | x | |
| 78 | T-complex protein 1 subunit | gil114051425 | 59 kDa | | x | |
| 79 | Keratin, type II cytoskeletal 79 | gil115496454 | 58 kDa | | x | |
| 80 | Filamin-B | gil300794998 | 282 kDa | | x | |
| 81 | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 isoform X2 | gil528961974 | 64.9 kDa | | x | |
| 82 | Histidine triad nucleotide-binding | gil27805917 | 17 kDa | | x | |

| | protein 2 | | | | | |
|-----|--|--------------|----------|--|---|---|
| 83 | Pancreatic elastase inhibitor | gij1683363 | 63 kDa | | | x |
| 84 | Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 | gij77735745 | 32 kDa | | x | |
| 85 | 10 kDa heat shock protein | gij27805927 | 11 kDa | | x | |
| 86 | Retinol-binding protein 4 | gij132403 | 21 kDa | | x | |
| 87 | Protein disulfide-isomerase A6 precursor | gij329744598 | 48 kDa | | x | |
| 88 | HNRNPU protein | gij115305387 | 61.8 kDa | | x | |
| 89 | Annexin A5 | gij120474983 | 36 kDa | | x | |
| 90 | Stathmin | gij77736560 | 17 kDa | | x | |
| 91 | Obg-like ATPase 1 | gij114051331 | 45 kDa | | x | |
| 92 | Conglutinin precursor | gij31982388 | 38 kDa | | x | x |
| 93 | Apolipoprotein A-IV | gij118598012 | 43 kDa | | x | |
| 94 | Antithrombin-III | gij109940161 | 52 kDa | | | x |
| 95 | ATP synthase subunit betar | gij114543 | 56 kDa | | x | |
| 96 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R | gij129277529 | 71 kDa | | x | |
| 97 | Keratin, type II cytoskeletal | gij119892108 | 60.6 kDa | | x | |
| 98 | Elongation Factor | gij56967054 | 44.9 kDa | | x | |
| 99 | Stress-70 protein | gij122144079 | 74 kDa | | x | |
| 100 | Heparin cofactor 2 precursor | gij157280001 | 55 kDa | | x | |
| 101 | Peroxiredoxin-4 | gij22095987 | 31 kDa | | x | |
| 102 | 40S ribosomal protein S8 | gij70778956 | 24 kDa | | x | |
| 103 | Immunoglobulin heavy chain variable region | gij1293604 | 16.8 kDa | | | x |
| 104 | Immunoglobulin variable region | gij2353736 | 14.7 kDa | | x | x |
| 105 | Septin-2 | gij114052905 | 42 kDa | | x | |
| 106 | Leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor | gij114051379 | 38 kDa | | x | x |
| 107 | Apolipoprotein C-III precursor | gij47564119 | 11 kDa | | x | x |
| 108 | Protein HP-25 homolog 1 precursor | gij114050753 | 23 kDa | | x | |
| 109 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | gij77404273 | 36 kDa | | x | |
| 110 | Alpha-actinin-1 | gij118586150 | 103 kDa | | x | |
| 111 | Serine/threonine-protein phosphatase isoform | gij122142947 | 65 kDa | | x | |
| 112 | Histone H2B type 1-K | gij110278997 | 14 kDa | | x | |
| 113 | Vitronectin precursor | gij78045497 | 54 kDa | | x | |
| 114 | Vimentin | gij110347570 | 54 kDa | | x | |
| 115 | Platelet factor 4 precursor | gij155371855 | 13 kDa | | | x |

Para estudos proteômicos envolvendo amostras de soro/plasma, a estratégia de depleção de albumina é particularmente importante porque essa proteína pode constituir mais de 45% do conteúdo total de proteínas no soro/plasma. Existem vários kits e colunas de depleção de albumina comercialmente disponíveis, mas

nenhum deles é específico para uso com sangue de animais silvestres e/ou animais de fazenda.

Em nosso estudo, o procedimento de depleção de albumina sérica de bubalinos foi capaz de reduzir em 98,3% a quantidade dessa proteína abundante na amostra biológica usando uma coluna de cromatografia líquida de afinidade anti-HSA (albumina anti-humana), conforme os dados de quantificação de BSA apontou anteriormente. Analisando os dados de espectrometria de massas, os mesmos mostraram que as amostras depletadas (115 proteínas identificadas entre os animais saudáveis e animais não saudáveis [Brucelose]) tiveram um enriquecimento proteico de 90,5% em relação ao soro total (11 proteínas), revelando várias proteínas importantes do sistema imunológico e complemento e, cascata de coagulação como alfa-2-macroglobulina, componente C4, várias imunoglobulinas e proteínas menos abundantes, como proteína de ligação à vitamina D, inibidor inter-alfa-tripsina, ceruloplasmina e clusterina, presentes nas amostras de soro depletadas dos animais saudáveis e não saudáveis [Brucelose]. A alta homologia de seqüência entre as albuminas humana e de búfalo neste estudo encorajou os autores a realizem métodos de depleção por afinidade para trabalharem com outras espécies animais.

Em seguida, as análises de dados das proteínas identificadas determinam possíveis biomarcadores para brucelose no soro de *Bubalus bubalis* da raça Murrah. Cabe ressaltar que, este estudo de marcadores para brucelose em búfalos é pioneiro. Assim, evidenciou-se mudanças significativas no proteoma do soro de búfalos acometidos por brucelose. As principais diferenças no proteoma dos animais em estudo podem ser observadas na Figura 3, por meio da apresentação de um mapa de calor (*Heat map*) de cluster hierárquico das 12 proteínas que se

expressaram diferentemente neste estudo. Dentre elas, 8 proteínas reguladas positivamente [dentre elas, têm-se: beta-2-glicoproteína 1 (gi|2506196), Imunoglobulina do tipo IgG3 (gi|1575493), hemoglobina B (gi|223864), imunoglobulina (gi|98991288), imunoglobulina (gi|34538498), Fator de complemento B (gi|146345391), precursor homólogo da proteína HP-25 (gi|146345391) e, cinco reguladas negativamente [dentre elas, têm-se: cinco precursores de ceruloplasmina (gi|375065868), atuantes na interação proteína-proteína, metabolismo energético e transporte iônico.

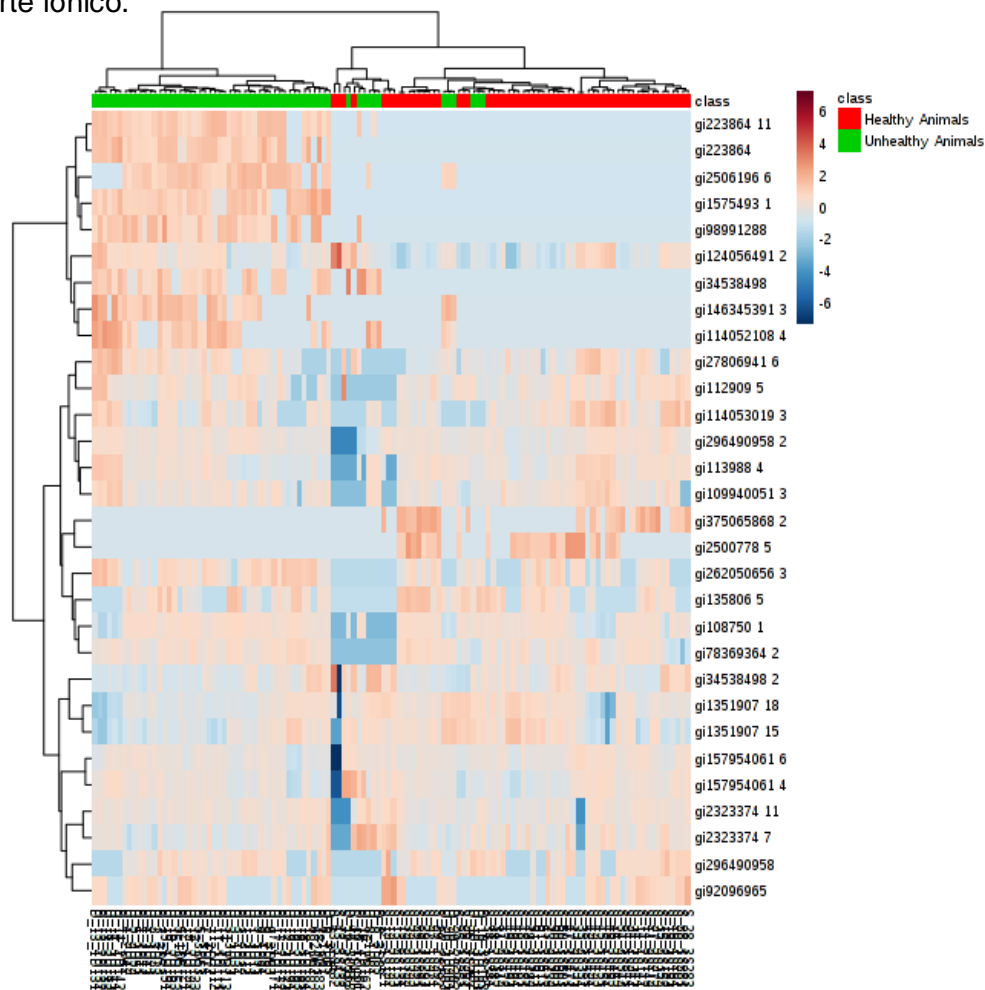


Figura 3. Heatmap das proteínas identificadas diferentemente no proteoma do soro de búfalos saudáveis em comparação com o proteoma do soro de animais acometidos por brucelose. As proteínas são identificadas pelo seu número de acesso. A escala lateral está representada pela cor azul como a menor alteração e a cor vermelho representa a maior alteração.

A regulação positiva de proteínas que atuam na interação proteína-proteína também pode indicar um aumento no dano celular nos animais acometidos por brucelose³⁰. Proteínas como albumina e imunoglobulinas, as quais juntas constituem mais de 85% das proteínas totais constituintes do soro, podendo mascarar as proteínas menos abundantes neste tipo de amostra biológica, as quais podem ser biomarcadores em potenciais^{31,32}. Para resolver este problema, o presente trabalho utilizou-se de uma coluna contendo um ligante anti-albumina, a qual possibilitou reduzir a complexidade da amostra. Porém, cabe resaltar que, novos estudos podem ser realizados para atuar na remoção de imunoglobulinas presentes nas amostras animais, caso seja necessário^{33,34}.

Duas abordagens foram utilizadas para análise estatística: análise multivariada e a análise do escore: da pontuação e da Vip (Figura 4B, C, respectivamente), e uma análise univariada, que pode ser observada no gráfico no formato de vulcão, como mostrado na Figura 4A.

Na Figura 4A, oito proteínas poderiam ser consideradas as que mais contribuí para a distinção entre o grupo de animais saudáveis e animais positivos para brucelose, podendo estas serem consideradas possíveis biomarcadoras de resposta inflamatória no soro de búfalos: beta-2-glicoproteína 1 (gi|2506196), Imunoglobulina do tipo IgG3 (gi|1575493), hemoglobina B (gi|223864), imunoglobulina (gi|98991288), imunoglobulina (gi|34538498), Fator de complemento B (gi|146345391), precursor homólogo da proteína HP-25 (gi|146345391) e precursor de ceruloplasmina (gi|375065868).

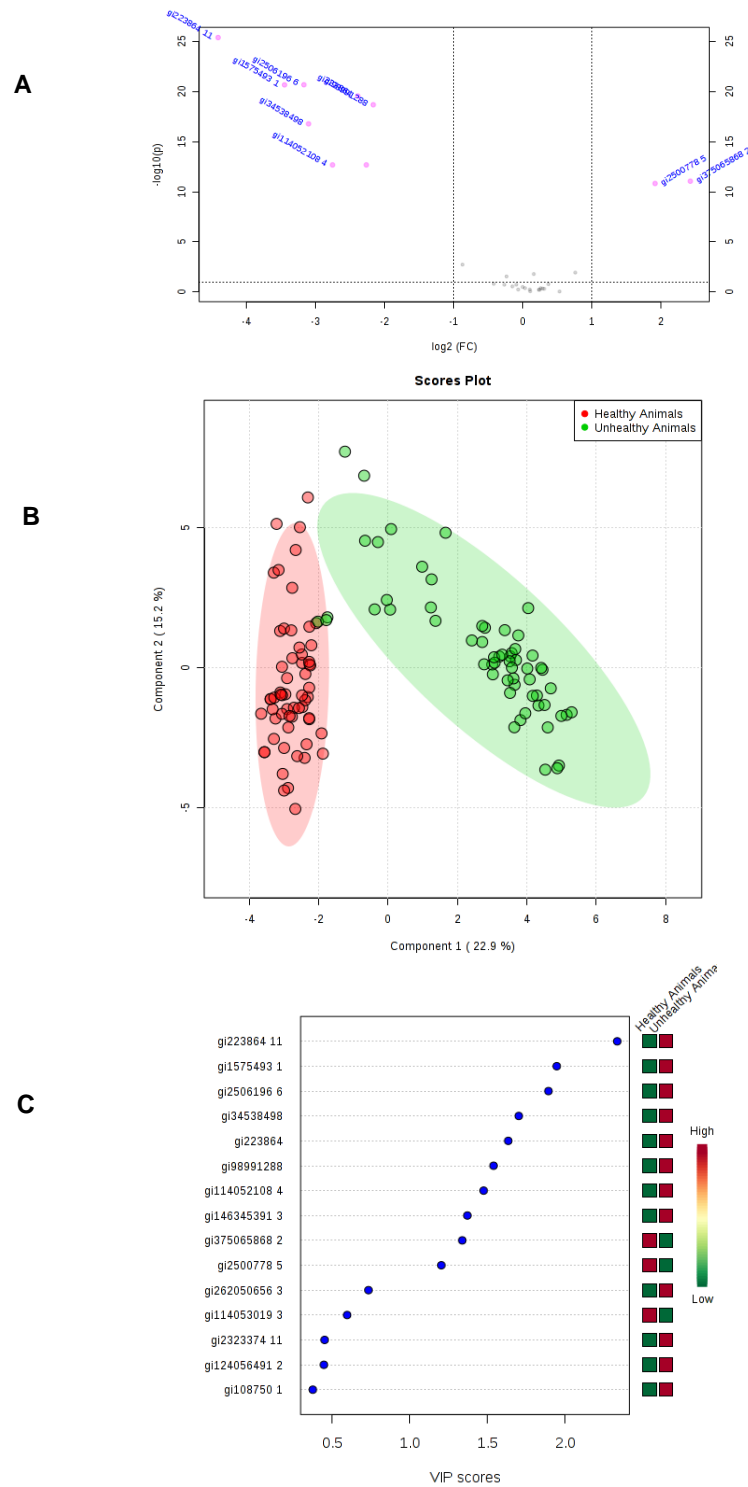


Figura 4: A - Gráfico no formato de vulcão: análise estatística univariada das proteínas quantificadas nas amostras de soro dos búfalos saudáveis (Healthy Animals) e doentes (Unhealthy Animals). B - Plot de pontuação: ele separa o grupo saudável do grupo doente com base na análise estatística da quantidade de proteínas. C - Pontuações VIP. Análise estatística multivariada mostrando as 15 proteínas que mais contribuíram para a separação dos dois grupos: saudável e acometido por brucelose.

A Figura 4B indica que o soro do animal saudável e dos animais acometidos por brucelose difere significativamente, uma vez que é possível separar dois grupos distintos de proteínas em relação à existência ou não da enfermidade. Além do que, os dois grupos contribuíram positivamente para se estabelecer um bom modelo de análise (valor de Q2 positivo = 84,4%), e a variação das proteínas foi de 96,7%. Valores do $Q2 > 0,08$ indica que um modelo é melhor que o acaso e pontuações de 0,7 ou superior, demonstram uma tendência muito robusta de separação ³⁵.

Dentre os biomarcadores identificados, tem-se as hemoglobinas e imunoglobulinas, sendo que as hemoglobinas identificadas foram hemoglobina B (gi|223864) e seus agrupamentos (gi|223864). Em bezerros, a hemoglobina fetal representa 41% a 100% do total da hemoglobina ao nascimento ³⁶. Ela diminui rapidamente e é normalmente substituída pela hemoglobina tipo A (o tipo mais comum nos adultos) aos dois ou três meses de idade. Em alguns bezerros a hemoglobina B (um tipo menos comum no adulto) aparece no início da vida e tem a mesma mobilidade eletroforética da hemoglobina fetal ³⁷. Ao observarmos os dados obtidos por Garwin e colaboradores, evidenciamos que mesmo após realizarem imunodepleção de proteínas majoritárias e utilizarem a mesma estratégia de análise deste estudo a subunidade B da hemoglobina ainda se encontrava na amostra ³⁸. Paralelamente, as imunoglobulinas observadas neste estudo, são as imunoglobulinas IgG3 (gi|1575493), sua cadeia pesada (gi|98991288) e agregados parciais (gi|34538498) que são comumente descritos como possíveis biomarcadores possíveis biomarcadoras de resposta inflamatória no soro de bovinos e outros animais de fazenda³⁹. As imunoglobulinas foram relatadas como alteradas no leite de bovinos afetados por *Streptococcus uberis* ^{40,41}, no sangue de porcos com stress térmico ⁴² e biomarcadora de asma em gatos ⁴³.

Por sua vez, o fator de complemento B (gi|146345391) já foi descritos no diagnóstico e monitoramento no plasma e leite de vacas infectadas com mastite⁴³⁻⁴⁵ no plasma e soro de ovinos com *Escherichia coli*⁴⁶ e descrita no perfil proteico de cavalos e animais selvagens que se alimentam de herbáceas selvagens e herbáceas cultivadas⁴⁷⁻⁵¹. Acreditamos que o papel das proteínas identificadas como possíveis biomarcadoras de resposta inflamatória no soro de búfalos ocorre durante a fase aguda da infecção fato crucial para o diagnóstico⁵¹.

Neste estudo, evidenciamos o precursor homólogo da proteína HP-25 (gi|146345391) como possível biomarcadora para búfalos acometidos por brucelose também. Há vários trabalhos sendo realizados com o soro de cavalo de competição competições de longa duração e alto desempenho, no decorrer de anos, diferentes ferramentas proteômicas já foram utilizadas⁵²⁻⁵⁴. Na maioria dos trabalhos a proteína haptoglobina é citada como possível biomarcador para a condição de retorno do animal as competições de longa duração^{55,56}. Acredita-se que as competições de longa duração são capazes de gerar uma reação de fase aguda e que o monitoramento da concentração de haptoglobina pode ser um sinalizador de processo inflamatório e baixo desempenho do animal⁵⁷. Semelhante a condição encontrada no soro de búfalos acometidos por tuberculose na fase aguda da inflamação onde as concentrações de haptoglobina são diferentemente expressas em comparação ao soro de animais sadios⁵⁸. Acreditamos que devido as semelhanças no processo de inflamação nós observamos esta diferença significativa na análise do soro de búfalos com brucelose.

Segundo Filippo e colaboradores, ao analisarem o perfil de proteínas expressas no soro e líquido cefalorraquidiano de novilhos com doenças infecciosas, de ambos os sexos, neste estudo evidenciou-se que os valores séricos de

glicoproteínas foram significativamente mais elevados nas novilhas em comparação aos novilhos ⁵⁹. Eles acreditam que essa pesquisa possa ser útil no diagnóstico e monitoramento da progressão de doenças ou traumas neurológicos em bovinos, talvez até para orientar procedimentos terapêuticos ⁶⁰. Em nosso estudo, evidenciou-se a beta-2-glicoproteína 1 (gi|2506196) e acredita-se que ela possa ser utilizada para o monitoramento de búfalos com brucelose porque é descrita na literature como um anticoagulante natural, com ações inibitórias na ativação do fator XII⁶¹. Além do mais, parece inativar o complexo ativador da protrombina ao interagir com fosfolípidos de carga negativa ⁶². Os efeitos da beta-2-glicoproteína sobre a cascata da coagulação são aparentemente semelhantes aos observados na trombose ⁶².

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas em negativas ou positivas. As proteínas de fase aguda positivas aumentam suas concentrações em casos de inflamação⁶³. Neste estudo, evidenciamos a ceruloplasmina (gi|375065868). A ceruloplasmina possuem também ação antioxidante, que protegem o organismo dos metabólitos de oxigênio liberados por células fagocitárias durante a inflamação ^{64,65}. Blakley e Hamilton evidenciaram que os níveis de ceruloplasmina no sangue de vacas aumentam significativamente na presença de endometrite ⁶⁶. Estudos posteriores realizados por Kaya e colaboradores identificaram que os níveis de ceruloplasmina no sangue de vacas também variação significativa em diferentes níveis de gravidade da endometrite ⁶⁷. O papel dessa proteína se torna determinante ao analisarmos condições diferentes de infecções agudas no sangue de bovinos acreditamos que ela atue de forma semelhante ao processo parasite-hospedeiro que ocorre na infecção aguda por brucelose.

5. CONCLUSÕES

No caso do diagnóstico de brucelose em búfalos, os biomarcadores devem ser utilizados concomitantemente com o diagnósticos padrão-ouro. Neste estudo, os animais acometidos por brucelose possuem deficiência em seu metabolismo energético e em seu sistema imunológico. Sendo assim, os efeitos da infecção por *Brucella spp.* alteram o sistema imunológico sugerindo que a infecção desempenha grande custo energético. Esses achados sugerem que pesquisas futuras são necessárias para entender como várias doenças afetam os biomarcadores e mais testes devem ser realizados.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Akpınar O. Historical perspective of brucellosis: a microbiological and epidemiological overview. *Infez Med* 2016;24:77-86.
- [2] Ko KY, Kim JW, Her M et al. Immunogenic proteins of *Brucella abortus* to minimize cross reactions in brucellosis diagnosis. *Vet Microbiol* 2016;156: 374-80.
- [3] Byndloss MX, Tsolis RM. *Brucella spp.* virulence factors and immunity. *Annu Rev Anim Biosci* 2012;4:111-27.
- [4] Lista F, Reubsaet FA, De Santis R et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol* 2011;11:267.
- [5] Cash P. Investigating pathogen biology at the level of the proteome. *Proteomics* 2011;11:3190-02.
- [6] Santana AM, Thomas FC, Silva DG, et al. Reference 1D and 2D electrophoresis maps for potential disease related proteins in milk whey from lactating buffaloes and blood serum from buffalo calves (Water buffalo, *Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci* 2018;5:1016.
- [7] Tiwari AK, Kumar S, Pal V, Bhardwaj B, Rai GP. Evaluation of the recombinant 10-kilodalton immunodominant region of the BP26 protein of *Brucella abortus* for specific diagnosis of bovine brucellosis. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:1760-64.
- [8] Zhang N, Huang D, Wu W et al. Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: A systematic review of experiences and lessons learned. *Prev Vet Med* 2018;15:160:105-15.
- [9] Ntirandekura JB, Matemba LE, Kimera SI et al. Association of Brucellosis with Abortion Prevalence in Humans and Animals in Africa: A Review. *Afr J Reprod Health* 2018;22(3):120-36.

- [10] Yon L, Duff JP, Ågren EO et al. Recent Changes In Infectious Diseases In European Wildlife. *J Wildl Dis* 2018;4:172-78.
- [11] Lamontagne J, Forest A, Marazzo E et al. Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J. Proteome Res* 2009;8:1594-09.
- [12] Ducrotoy MJ, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2016;171:81-102.
- [13] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/url/ITEM/3D2720AF1E0FD67FE040A8C07502246C>.
- [14] Lage AP, Poester FP, Paixão TA et al. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução animal* 2008;32:202-12.
- [15] Ribeiro MG, Motta RG, Almeida CAS. Brucelose equina: aspectos da doença no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2008;32(2)83-92.
- [16] De Macedo AA, Galvão NR, Sá JC et al. *Brucella*-associated cervical bursitis in cattle. *Trop Anim Health Prod* 2018;9:1745-7.
- [17] Franc KA, Krecek RC, Häsler BN, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health* 2018;18:125.
- [18] Yasmin B, Sajad AL. Brucellosis: An Economically Important Infection. *J Med Microb Diagn* 2015, 4:4-14.
- [19] De Souza RM, Vicente AF, Peres MG et al. Brucellosis Prevalence in Brazilian

Slaughterhouses with Different Meat Inspection Systems. *J Food Prot* 2018 Jul;81(7):1073-78.

[20] Aylate A, Shah S, Aleme H, Gizaw TT. Bovine tuberculosis: prevalence and diagnostic efficacy of routine meat inspection procedure in Woldiya municipality abattoir north Wollo zone, Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 2013;45(3):855-64.

[21] Asseged B, Woldesenbet Z, Yimer E, Lemma E. Evaluation of abattoir inspection for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle at Addis Ababa abattoir. *Trop Anim Health Prod* 2004;36(6):537-46.

[22] Santos RL, Martins, TM et al. Perdas econômicas devidas à brucelose bovina no Brasil. *Pesq Vet Bras* 2013;33(6)759-64.

[23] De Pontes LG, Cavassan NRV, Barros LC, et al. Plasma proteome of buffaloes, *Proteomics Clin Appl* 2017;17:1-7.

[24] Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res* 1988;1:10881-87.

[25] Dos Santos LS, Sá JC, Dos Santos Ribeiro DL, et al. Detection of *Brucella* sp. infection through serological, microbiological, and molecular methods applied to buffaloes in Maranhão State, Brazil. *Trop Anim Health Prod* 2017;5:1238-42.

[26] Office International Des Epizooties-OIE. Bovine brucellosis. In: Manual of diagnosis test and vaccines for terrestrial animals. 2010.

[27] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

- [28] Lima LA et al. Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. *PLoS One* 2014:e106646.
- [29] Orchard, S. Molecular interaction databases. *Proteomics* 2012;12:1656-62.
- [30] Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, L. Adams G. Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis. *Am J Pathol* 2015;185(6):1505-17.
- [31] Santos HM, Lodeiro C, Capelo JL. Analytical proteomics: an emerging field?. *J Proteomics* 2010;73(8):1411-4.
- [32] Kolla V, Jenö P, Moes S, Tercanli S, Lapaire O, Choolani M, Hahn S. Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ). *J Biomed Biotechnol* 2010;10:952047.
- [33] Song F, Poljak A, Kochan NA, Raftery M, Brodaty H, Smythe GA, Sachdev PS. Plasma protein profiling of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease using iTRAQ quantitative proteomics. *Proteome Sci* 2014;12:5.
- [34] Pendyala G, Trauger SA, Siuzdak G, Fox HS. Quantitative plasma proteomic profiling identifies the vitamin E binding protein afamin as a potential pathogenic factor in SIV induced CNS disease. *J Proteome Res* 2010;9:352-58.
- [35] Alek RM, Xia J, Innes A, et al. A metabolomic study of the CRND8 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2010;56:937-47.
- [36] Morimatsu M, Syuto B, Shimada N et al. Isolation and Characterization of Bovine Haptoglobin from Acute Phase Sera. *J App Vet Med*. 1999;266(18):11833-37.
- [37] Swenson MJ. *Propriedades fisiológicas e constituintes químicos e celulares do sangue*. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan 1996;3:20-41.
- [38] Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, Holdt DLM, Teupser D, Mann M. Plasma

Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Systems* 2016;2:185-95.

[39] Danielsen M, Thymann T, Jensen BB, Jensen ON, Sangild PT, Bendixen E. Proteome profiles of mucosal immunoglobulin uptake in inflamed porcine gut. *Proteomics* 2006;6:6588-96.

[40] Boggsa I, Hineb B, Smolenskia G, et al. Changes in the repertoire of bovine milk proteins during mammary involution. *EuPA Open Proteom* 2015;2:001-6.

[41] Sorensen NS, Tegtmeier C, Andresen LO et al. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;113(1-2):157-68.

[42] Royer E, Barbé F, Guillou D, Rousselière, Chevaux E. Development of an oxidative stress model in weaned pigs highlighting plasma biomarkers' specificity to stress inducers. *J Anim Sci* 2016;94:48-53

[43] Smith KF, Quinn RL, Rahilly LJ, Biomarkers for differentiation of causes of respiratory distress in dogs and cats: Part 2 - Lower airway, thromboembolic, and inflammatory diseases, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2015;25(3):330-37.

[43] Jacob T, Subramani G, Sivaprakasam P et al. Immuno-Detection of C3a, a C3 Complement Activated Product in Mastitis Milk. Potential Diag Marker *Vet Sci* 2017;10013-21.

[44] Hosseini A, Odhiambo JF, Iqbal S et al. Application of Acute Phase Proteins for Monitoring Inflammatory States in Cattle, in: Prof. Francisco Veas (Eds.), *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*, University of Alberta, Canada, 2011:300-54.

[45] Boggsa I, Hineb B, Smolenskia G, et al. Changes in the repertoire of bovine milk proteins during mammary involution. *EuPA Open Proteom.* 2015;2(4):123-132.

[46] Chemonges S, Tung JP, Fraser JF. Proteogenomics of selective susceptibility to endotoxin using circulating acute phase biomarkers and bioassay development in sheep: a review. *Proteome Science* 2014;12:12-17.

[47] Miletoa S, Kaisera E, Rassamakin Y, Wheltonb H, Evershedb RP. Diferentes modos de exploração animal no Eneolítico Norte-Pónico e Bronze Sociedades de idade. *Estrela: Ciência E Tecnologia Da Pesquisa Arqueológica* 2018;3(1)112-25.

[48] Richard PE, Dudd SN, Copley MS, Berstan R et al. Chemistry of Archaeological Animal Fats. *Accounts of Chemical Research* 2002;35(8):660-68.

[49] Charters S, Evershed RP, Goad LJ et al. Quantification and Distribution of Lipid in Archaeological Ceramics: Implications for Sampling Potsherds for Organic Residue Analysis and the Classification of Vessel Use. *Archaeometry* 1993;35(2):211-23.

[50] Dudd SN, Evershed RP. Direct Demonstration of Milk as an Element of Archaeological Economies. *Science American Association* 1998;282(5393)1478-83.

[51] Reis JF, Madureira KM, Silva CPC. et al. Serum protein profile of Holstein cows during the transition period. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2016 68;3:587-595.

[52] Valle E, Zanatta R, Odetti P et al. Effects of competition on acute phase proteins and lymphocyte subpopulations - oxidative stress markers in eventing horses. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2015;99(5):856-63.

[53] Poltep K, Tesena P, Yingchutrakul Y, Taylor J, Wongtawan T. Optimisation of a serum albumin removal protocol for use in a proteomic study to identify the protein biomarkers for silent gastric ulceration in horses. *J Equine Sci* 2018;29(3):53-60.

[54] Bell RJ, Mogg TD, Kingston JK. Equine gastric ulcer syndrome in adult horses: a review. *N Z Vet J* 2007;55(1):1-12.

[55] Amaral LA, Paz CF, Haetinger C, Crespo EP, Nogueira CEW. Reação de fase aguda e sua relação com o desempenho de cavalos em competição de longa

distância. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2015;67(2):365-71.

[56] Hulten C, Gronlund U, Hirvonen J et al. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Vet J* 2002;34:699-704.

[57] Robert MFD, Gentilini LF, Monti FDA et al. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: Association with common clinicopathological variables and short-term outcome. *The Veterinary Journal* 2015(1):15-21.

[58] Oliveira GC, Roxo E, Bürger KP, Carvalho AAB. Tuberculosis diagnostic methods in buffaloes. *Semina: Ciências Agrárias* 2015 363(1) 2047-2054.

[59] Colla, MF. Valor da haptoglobina no plasma comparado com a contagem de células somáticas do leite no diagnóstico da mastite subclínica em vacas leiteiras. 2009. 67 f. Diss. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

[59] Di Filippo PA, Lannes ST, Meireles MAD et al. Acute phase proteins in serum and cerebrospinal fluid in healthy cattle: possible use for assessment of neurological diseases. *Pesq Vet Bras* 2018;38(4):779-84.

[60] Di Filippo PA, Nogueira AFS, Santana AE. Determination of serum haptoglobin, ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein, transferrin and α 1- antitrypsin in colic horses. *Ciência Rural* 2011;41(12):2108-13.

[61] Itoh H, Tamura K, Izumi M et al. The influence of age and health status and the serum alpha-1 acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen free pigs. *Can J Vet Res* 1993;57(2):74-78.

[62] Goldsmith GH, Pierangeli SS, Branch DW et al: Inhibition of prothrombin activation by antiphospholipid antibodies and beta-2-gp1. *Br J Haematol* 1994 87: 548-554.

[63] Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology* 2005;34(2)85-99.

[64] Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004 35;(2):163-87.

[65] Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The veterinary journal* 2010;185(1)23-27.

[66] Blakley BR , Hamilton DL. Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep. *Can J Comp Med.* 1985 49(4);405-08.

[67] Kaya S, Merhan O, Kacar C. et al. Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis. *Vet World.* 2016 9(10): 1056-62.

Artigo Científico III

**VESICULAS EXTRACELULARES IN DOENÇAS INFECCIOSAS CAUSADAS POR
PARASITAS APICOMPLEXOS: UM ESTUDO PILOTO**

***Extracellular vesicles in infectious diseases caused by apicomplexan
parasites: pilot study***

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are small membrane-bound vesicles of growing interest in research of infectious diseases, since they are known to be released in parasitic diseases and acting in parasite-parasite intercommunication. In this short communication, we presented the isolation of EVs from buffaloes' serum from buffaloes positive for *Theileria* spp. and *Babesia bovis*, and healthy buffaloes. The aim of this report was to provide the first isolation and quantification of EVs from buffaloes' serum in theileriosis and babesiosis in buffaloes. Further steps are strongly encouraged regarding expanded studies of EVs in Apicomplexa infections in animals, including proteome characterization of these EVs, with inspiring perspectives for understanding pathogenesis and clinical progression of these diseases, besides new approaches for development of biotechnological applications of both clinical and economic interest for medicine and veterinary medicine.

KEYWORDS: Exosomes, *Babesia bovis*, *Theileria* spp, hemoparasites, western blotting, size exclusion chromatography.

1. BACKGROUND

Extracellular vesicles (EVs) are small membrane-bound vesicles known to play major roles in intercellular communication, currently categorized in three types based on their size, biogenesis and composition: exosomes, microvesicles and apoptotic bodies (1). Exosomes are the smallest, 40–150 nm diameter vesicles of endocytic origin create by the fusion of multivesicular bodies (MVBs – a subset of endosomes) with the plasma membrane (2-3). EVs have been of growing interest in research of infectious diseases, since they are known to be released in parasitic diseases and can play many roles, such as modulating the immunity in parasite-host interaction and acting in parasite-parasite intercommunication. The Apicomplexa is a diverse group of obligate intracellular parasites, and most known species are pathogens of human and domestic animals. Among these *Babesia ssp.* and *Theileria ssp.* are tick-borne diseases protozoan hemoparasites, of great economic, veterinary and medical impact worldwide, especially in tropical areas.

Many clinical uses of exosomes in Apicomplexa infections in humans have been described (4-6), but little has been reported regarding the use of EVs in the field of diagnosis/prognosis and ethiology of either domestic and farm animal diseases. The role of EVs in apicomplexan parasites infections of livestock is a promising field, with extended potential to develop biotechnological applications of both clinical and economic interest for veterinary medicine. Furthermore, babesiosis shares many clinical aspects with malaria (7) and *Babesia* infection of domestic animals can serve as a disease model for both infections (8). As such, advances in EVs research in diseases caused by Apicomplexa parasites can reveal vaccine candidates along with therapeutic and diagnostic tools of interest for neglected tropical and vector-borne human diseases conjointly with animal health and production (9-11).

The aim of this investigation was to isolate and enrich exosome-like vesicles from serum during *Theileria* and *Babesia* infection in buffaloes. This is the first report of isolation of EVs from buffaloes' serum and the first report of isolation and quantification of EVs in theileriosis and babesiosis.

2. METHODS

Serum samples were collected from buffaloes (*Bubalus bubalis*) of the Murrah breed, and tested for *Theileria* spp. and *Babesia bovis* using PCR (12) (Table 1). Samples were divided in four groups: Th - positive for *Theileria* spp. and untreated (two animals); ThT – negative for *Theileria* after being treated with dibenzamidine diacetate - Ganaseg® Plus (three animals, blood collected after three months of treatment – prior diagnosis was made by PCR); Ba - positive for *Babesia* (one animal and one pool of three animals); and C - control (three animals). First round primers were 18S rRNA 778pb forward 5'-GAAACGGCTACCACATCT-3', 18S rRNA 778pb reverse 5'-CGCCTATTCTAACTTGACCTGAAT-3', GAU9 forward 5'-CTGTTCGTACCGTTGGTTGAC-3' and GAU10 reverse 5'-CGCACGGACGGAGACCGA-3'. All PCR reactions were performed in a Thermal Cyclorx (Eppendorf Mastercycle Gradient®). An initial denaturation step was performed at 94 °C for 30 seconds, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s, annealing at 63.5 °C for 30 seconds, extension at 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 5 min. Staining gel was SYBr Gold (Invitrogen®). Amplicons were visualised on agarose gel through UV transillumination.

Table 1: Identification of buffalo samples (*Bubalus bubalis*), Murrah breed with PCR results for *Theileria* spp. and *Babesia bovis*.

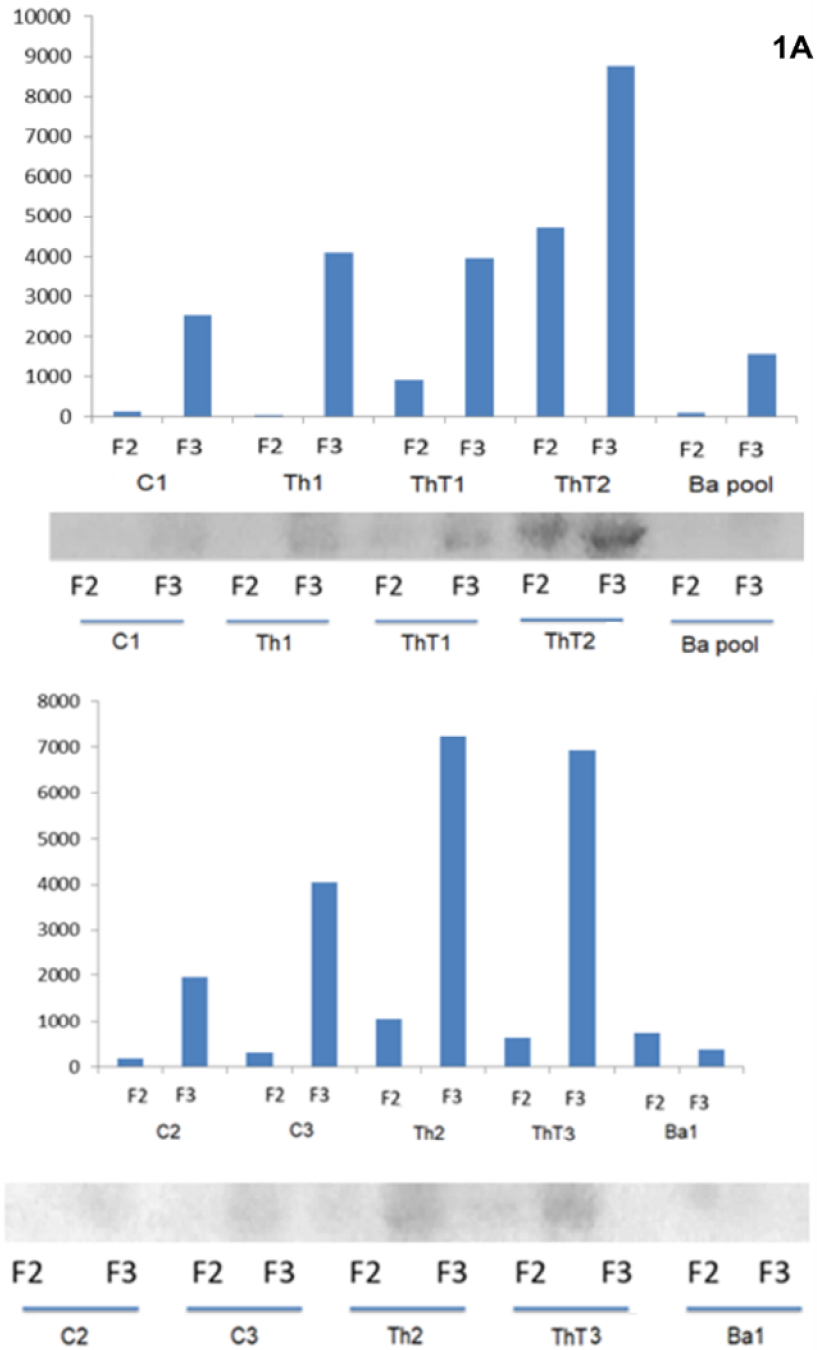
| Buffalo ID | DNA quantification | PCR positive | Sex | Age (years) | Weight (kg) |
|------------|--------------------|----------------------|-----|-------------|-------------|
| Th1 | 48.4 | <i>Theileria</i> | F | 1,3 | 380 |
| Th2 | 41.8 | <i>Theileria</i> | F | 1,5 | 455 |
| ThT1 | 6 | Negative* | M | 1,7 | 480 |
| ThT2 | 2.5 | Negative* | F | 1,9 | 530 |
| ThT3 | 1.8 | Negative* | F | 1,3 | 370 |
| Ba Pool | 3 | <i>Babesia bovis</i> | F | 1,7 | 500 |
| B1 | 4 | <i>Babesia bovis</i> | F | 1,5 | 425 |
| C1 | 1.6 | Negative | F | 1,4 | 410 |
| C2 | 1.6 | Negative | F | 1,7 | 480 |
| C3 | 1.6 | Negative | F | 1,5 | 445 |

* ThT group was first positive in PCR for *Theileria* and then treated with dibenzamidine diacetate. These PCR results were performed 3 months after treatment.

Vesicles were isolated by loading 750 μ L of serum samples onto Izon qEV size-exclusion chromatography columns pre-equilibrated with PBS (Izon Science, Oxford, UK) and eluted with PBS buffer. After discarding the void volume of column (3 mL), 3 fractions of each sample were collected (500 μ L each) and the second and third fractions were submitted to western blotting (VWR® Mini Vertical PAGE System; OmniPAGE Mini electroblotting system, Cleaver Scientific). Primary antibodies used were anti-flotillin-1 and anti-CD9 raised in goat and mouse, respectively (diluted at 1:500, Antibodies-online, Aachen, Germany). To avoid nonspecific protein binding, the membranes were blocked for 1 h at room temperature in blocking buffer (1% non-fat milk and 0.2% I-block protein-based blocking reagent (Applied Biosystems) dissolved in tris-buffered saline with 0.1% (v/v) Tween-20 (TBST). After the membranes had been washed three times with TBST buffer, the blots were incubated for 1h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies raised in goat for anti-flotillin-1 and raised in mouse for anti-CD9 (diluted at 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Membranes were imaged in LI-COR Odyssey chemiluminescence and fluorescence imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Images obtained were quantified using freeware ImageJ (NIH REF) and values were represented as histograms.

3. RESULTS

Results are displayed in Figure 1A for anti-flotillin and Figure 1B for anti-CD9. The western blots showed that third fraction showed prominently higher results for exosome-like quantification. Present results suggest an increase in exosome quantification for *Theileria* treated groups (ThT1, ThT2 and ThT3), followed by *Theileria* positive group (Th1 and Th1), compared to control (C1, C2 and C2) regarding representative blots for anti-CD9 and anti-flotillin1. *Babesia* infected animals did not display significant increased compared to control groups.



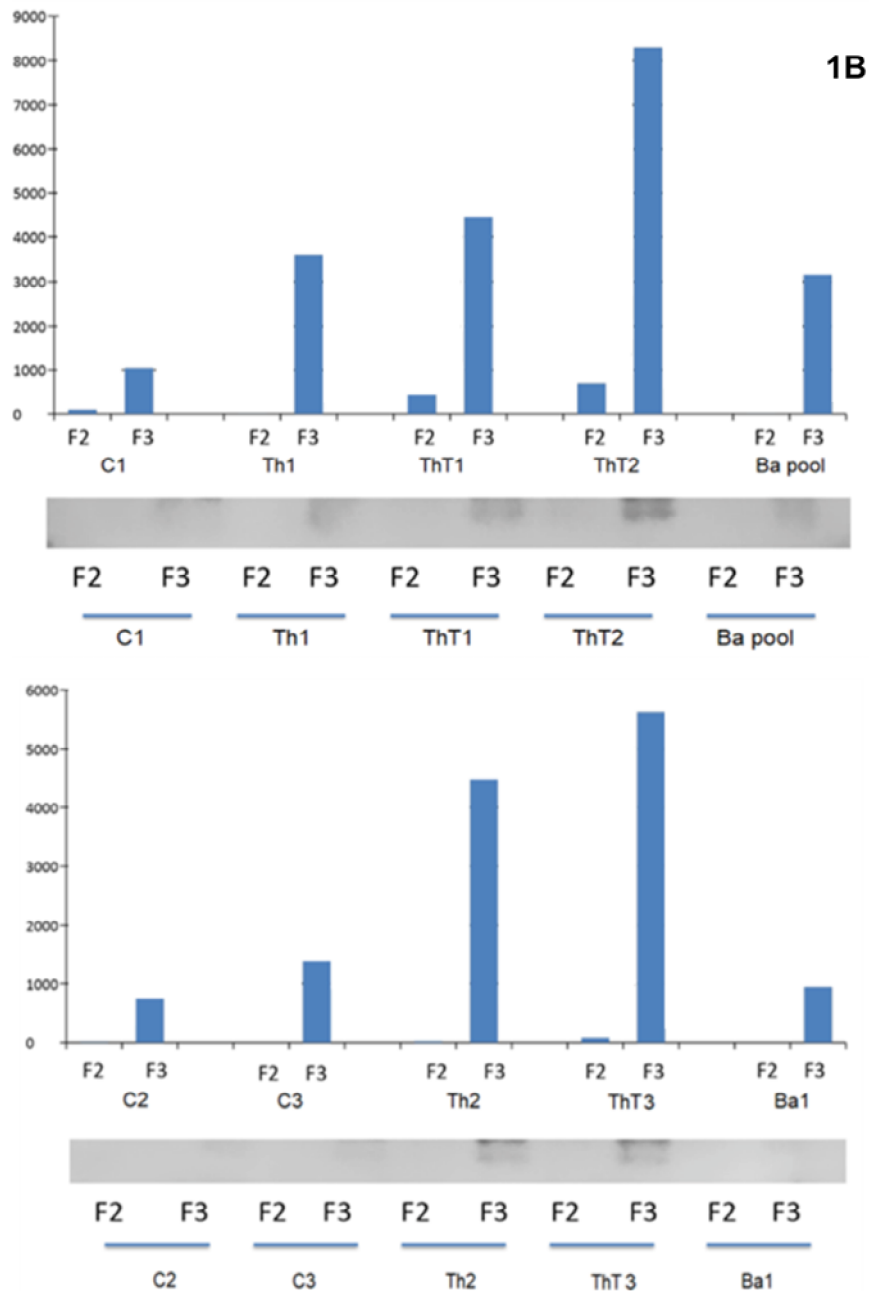


Figure 1. Second and third fractions of each samples were loaded onto Izon qEV size-exclusion chromatography columns, characterized as: control buffaloes (C), positive for *Theileria* and untreated (Th), positive for *Theileria* and treated (ThT), positive for *Babesia* (Ba pool/Ba1). EVs were isolated, concentrated by 10kDa cut-off ultrafiltration and then subjected to SDS/PAGE, followed by western blotting with anti-flotillin1 and CD9. **1A** - Representative blots for anti-flotillin1 and respective quantification with ImageJ (arbitrary units). **1B** - Representative blots for anti-CD9 and respective quantification with ImageJ (arbitrary units).

4. DISCUSSION

Extracellular vesicles (EVs) are generally defined as membrane bound nano-sized vesicles released from cells, which can be produced during an infection derived from pathogen or host. First described in 1967 as “platelet products” (13), EVs have been increasingly studied for their mechanism for intercellular communication and may be of particular significance in infectious diseases as the production and activity of EVs can potentially benefit the host immune response or promote pathways for pathogen survival (14).

EVs consist of a lipid bilayer membrane surrounding cargo of biomolecules, and can be classified into three types based on their biogenesis: exosomes; ectosomes or shedding microvesicles (MVs); and apoptotic bodies. Exosomes were first described as a mechanism to eliminate specific proteins and allow remodeling of plasma membrane for reticulocyte maturation (15). Exosomes are 30–150 nm in diameter vesicles formed by budding of endosomal membranes resulting in the progressive accumulation of intraluminal vesicles (ILVs) within large multivesicular bodies (MVBs), and shed by exocytosis (2,3). MVs (ectosomes) are large vesicles ranging from 100–1000 nm in diameter which are secreted by outward budding of plasma membrane followed by fission of their membrane stalk (2,16). Apoptotic bodies are formed during the late stage of apoptosis as fragments of dying cells, believed to be 50–5000 nm in diameter (3). Despite having known differences in their biogenesis and function, differentiation between exosomes and MVs is not always possible, so that a consensus and establishment of standardized methods is necessary to provide more reliable and interchangeable premises among studies (17, 18).

The apicomplexan phylum is composed of more than 6,000 named species, including genera of clinical and/or economic importance in human and veterinary medicine. Apicomplexans cause human malaria (*Plasmodium* spp.), babesiosis (*Babesia* spp.), theileriosis (*Theileria* spp.), coccidiosis (*Eimeria* spp.), cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* spp.) and toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). In fact, all animal species are believed to play host to at least one Apicomplexan species (19).

Babesiosis and theileriosis are tick-borne diseases which have historically caused great economic loss in the farming industry. *Theileria* species causes many diseases in livestock: corridor disease (*T. parva*), East Coast fever (*T. parva*), Tropical theileriosis (*T. annulata*) in cattle and malignant theileriosis (*T. lestoquardi*) in goats and sheep (20). *Babesia*, considered to be the second most commonly found parasites in the blood of mammals and bovine babesiosis (*B. bovis*), is economically the most important arthropod-transmitted pathogen of cattle, with losses associated with abortions, mortalities, trade restrictions and decreased production (21). Human babesiosis is also considered to be an emerging zoonosis (22).

Given the background, this short communication has evidenced the isolation and enrichment of exosome-like vesicles in *Babesia* and *Theileria* infections in buffaloes. Isolation of exosome-like vesicles was conducted by means of size exclusion chromatography columns and identification of exosomes was assessed through western blotting, using known exosomal markers: tetraspanin CD9 and membrane lipids raft-associated Flotillin-1 (3). These markers are compatible with validated studies of exosomes (23, 17). However, they are not specific in exosomes and could represent other types of EVs, thus being referred as exosome-like.

These results remarkably suggest that for exosome isolation using size exclusion chromatography columns, third fraction should be the one assessed for further analysis. This fraction has great importance. as we have shown in the literature that it is the fraction that belongs to the greatest quantity of exosomes (23). Despite the fact that ultracentrifugation remains by far the most frequently used primary isolation technique for EVs, vesicles isolated by ultracentrifugation are known to suffer from non-vesicular macromolecule contamination and vesicular aggregation, hampering omics and functional analysis. For this reason, ultracentrifugation is often combined with other purification techniques (23). The use of size-exclusion chromatography (SEC) and other chromatographic techniques (e.g. HPLC) was recently validated and it is increasingly used to isolate EVs since it provides in many cases lower contamination with macromolecular complexes than ultracentrifugation. Nevertheless, different isolation techniques might isolate different EV subpopulations. Identifying surface markers of a certain subpopulation would be

required to achieve the highest purity by means of affinity-based isolations such as antibody-coated bead-based EV capture.

Our results suggest an increase in exosome quantification for *Theileria* treated groups (ThT1, ThT2 and ThT3), followed by *Theileria* positive group (Th1 and Th1), compared to control (C1, C2 and C2) regarding representative blots for anti-CD9 and anti-flotillin1. Babesiosis infected animals did not display all together ultimately significant increased compared to control groups, suggesting that the exosomes change so much to initiate and / or progress the infection. In the literature we can see that with the increase of exosomes, the parasite load increases because they carry genes that cause the mechanism of the disease (parasite-host) to sustain itself for a longer time, increasing consecutively the infection time (18). Our results from this study suggest that *Babesia* and *Theileria* may have similar outcomes; however, expanded further studies are needed to validate this hypothesis.

5. CONCLUSION

In conclusion, the present study reports a first isolation of EVs from buffaloes' serum and the first report of isolation and quantification of EVs in theileriosis and babesiosis. Theileriosis and babesiosis represent diseases of elevated economic interest or farming animals, besides medical importance for both veterinary and human medicine. Research of EVs in Apicomplexa infections is progressively revealing new perspectives for both understanding pathogenesis and clinical progression of these diseases, besides new approaches for development of vaccines, prognostic and diagnostic tools. Further steps are strongly encouraged regarding expanded studies of EVs in Apicomplexa infections in animals, including proteome characterization of these EVs.

6. REFERENCES

- [1] Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- [2] Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 170. <http://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- [3] Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* 73: 1907–1920 <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
- [4] Li, Y., Liu, Y., Xiu, F., Wang, J., Cong, H., He, S., ... Zhou, H. (2018). Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma Gondii* and their functions in modulating immune responses. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 467–477. <https://doi.org/10.2147/IJN.S151110>
- [5] Li, Y., Xiu, F., Mou, Z., Xue, Z., Du, H., & Zhou, C. (2018). Exosomes derived from *Toxoplasma gondii* stimulate an inflammatory response through JNK signaling pathway. *Nanomedicine (Lond)*. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0035>. [Epub ahead of print]
- [6] Hu, G., Gong, A. Y., Roth, A. L., Huang, B. Q., Ward, H. D., Zhu, G., ... Chen, X. M. (2013). Release of Luminal Exosomes Contributes to TLR4-Mediated Epithelial Antimicrobial Defense. *PLoS Pathogens*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003261>
- [7] Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Ben Mamoun, C., & Krause, P. J. (2015). Babesiosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 29(2), 357–370. <https://doi.org/10.1016/J.IDC.2015.02.008>

- [8] Krause, P. J., Daily, J., Telford, S. R., Vannier, E., Lantos, P., & Spielman, A. (2007). Shared features in the pathobiology of babesiosis and malaria. *Trends in Parasitology*, 23(12), 605–610. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.09.005>
- [9] del Cacho, E., Gallego, M., Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Quilez, J., Lillehoj, E. P., & Sánchez-Acedo, C. (2012). Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria acervulina* infections using dendritic cell-derived exosomes. *Infection and Immunity*, 80(5), 1909–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.06413-11>
- [10] Schnitzer, J. K., Berzel, S., Fajardo-Moser, M., Remer, K. A., & Moll, H. (2010). Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine*, 28(36), 5785–5793. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2010.06.077>
- [11] Bhatnagar S., Shinagawa K., Castellino F.J., Schorey J.S. 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 110: 3234-3244 <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079152>
- [12] Kundave, V. R., Patel, A. K., Patel, P. V., Hasnani, J. J., & Joshi, C. G. (2015). Detection of theileriosis in cattle and buffaloes by polymerase chain reaction. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 39(3), 508–513. <http://doi.org/10.1007/s12639-013-0386-2>
- [13] Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology* 13(3):269–288. PMID: 6025241
- [14] Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>
- [15] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*. 1987 Jul 5; 262(19):9412-20. PMID: 3597417

[16] Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska- Wieczorek A, Ratajczak MZ (2006) Membrane- derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20: 1487–1495. <http://doi.org/10.1038/sj.leu.2404296>

[17] Sampaio, N. G., Cheng, L., & Eriksson, E. M. (2017). The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis. *Malaria Journal*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1891-z>

[18] Bayer-Santos E, Aguilar-Bonavides C, Rodrigues SP. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res.* 2013 1;12(2):883-97. [doi: 10.1021/pr300947g](https://doi.org/10.1021/pr300947g).

Mantel, P. Y., & Marti, M. (2014). The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, 16(3), 344–354. <https://doi.org/10.1111/cmi.12259>

[19] Morrison DA. Evolution of the apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology* (2009) 25:375–82. <https://doi:10.1016/j.pt.2009.05.010>

[20] Mans, B. J., Pienaar, R., & Latif, A. A. (2015). A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.12.006>

[21] Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788–1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>

[22] Storey-Lewis, B., Mitrovic, A., & McParland, B. (2018). Molecular detection and characterisation of *Babesia* and *Theileria* in Australian hard ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(3), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.12.012>

[23] Böing, A. N., Pol, E. Van Der, & Grootemaat, A. E. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography, 1, 1–11. *Journal of Extracellular Vesicles*. 23430 - <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.23430>