

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Investigação de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale* em *Stomoxys calcitrans* no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Seropédica - RJ**

Thamires Rezende Araújo

Julho, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

**INVESTIGAÇÃO DE *Trypanosoma vivax* E *Anaplasma marginale* EM
Stomoxys calcitrans, NO CAMPUS DA UNIVERSIDADE FEDERAL
RURAL DO RIO DE JANEIRO, SEROPÉDICA - RJ**

THAMIREZ REZENDE ARAÚJO

Sob a Orientação de
Patrícia Fampa Negreiros Lima
e Co-orientação de
Huarrisson Azevedo Santos

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestra em Ciências**, no
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Julho de 2019

**Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca Central / Seção de
Processamento Técnico**

Ficha catalográfica elaborada com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)

A658i

Araújo, Thamires Rezende, 1992-
Investigação de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale* em *Stomoxys calcitrans* no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ / Thamires Rezendo Araújo. - Valença, 2019.

53 f.: il.

Orientadora: Patricia Fampa Negreiros Lima.

Coorientador: Huarrisson Azevedo Santos.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, 2019.

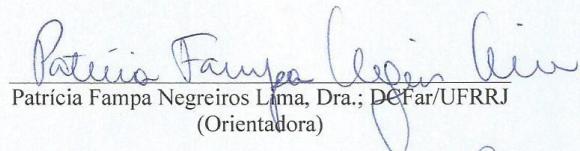
1. Diagnóstico molecular. 2. Doenças transmitidas por vetores. 3. Hemoparasitos. 4. Dipteros. I. Lima, Patricia Fampa Negreiros, 1976-, orient. II. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

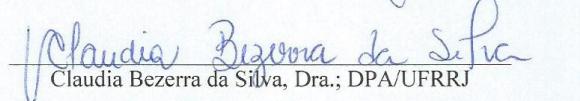
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

THAMIRES REZENDE ARAÚJO

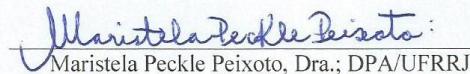
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

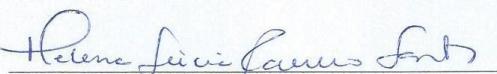
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/07/2019


Patrícia Fampa Negreiros Lima, Dra.; DCFar/UFRRJ
(Orientadora)


Cláudia Bezerra da Silva, Dra.; DPA/UFRRJ

Lilian Cristina de Sousa Oliveira Batista Cirne, Dra.; CESVA/FAA


Maristela Peckle Peixoto, Dra.; DPA/UFRRJ


Helena Lúcia Carneiro Santos, Dra.; Fiocruz

Dedico esta dissertação aos meus pais Cesário Ferraz de Araújo Júnior e Silvia Helena de Rezende Araújo por todo apoio e incentivo ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder sabedoria, me guiar e acompanhar ao longo desta árdua trajetória. Por ter sido minha força diária na luta contra os obstáculos que me foram colocados e por ter me deixado apoiar em sua fé para chegar até aqui.

Aos meus pais Cesário e Silvia, que mesmo de longe e às vezes sem entender minhas reclamações foram o apoio necessário para que eu nunca desistisse deste sonho. Foram eles os verdadeiros incentivadores e financiadores desta pesquisa.

Ao meu irmão Thales, por todo apoio e incentivo, por tentar entender as vezes que eu chegava em Valença estressada e acabava descontando nele. Agradeço também a todos os meus familiares que de alguma forma estiveram presentes durante toda essa trajetória.

A minha amiga Samara Lopes, agradeço por ter incentivado e me mostrado que comprar a ideia desta pesquisa valeria a pena. Agradeço pelas conversas incansáveis nas idas e vindas de Valença x Seropédica, pelas experiências de me levar pra campo, por me ouvir nos momentos de desespero e por me mostrar que desistir nunca é o caminho, mas sim persistir. Você faz parte desta conquista.

À Letícia Lemes, que mesmo sem me conhecer abriu a porta do seu quarto e me acolheu no alojamento, permitindo assim que eu pudesse dar início a esta jornada em busca do meu sonho. Por um ano foi minha companheira e agora, mesmo longe, está no meu coração.

As minhas companheiras de luta diária, loucura e vida, presentes que ganhei no alojamento, Mônica, Ana, Sheyla, Marina, Rafa e Otávia vocês foram essenciais em tudo que vivi até aqui. Nossos momentos de convivência, de puxões de orelha, risadas e tudo que passamos estarão guardados na minha memória e no meu coração para sempre. Obrigada por tudo, amo vocês.

Aos meus amigos de graduação, Fernanda, Guilherme, Mateus e Luan que desde 2012.1 me acompanham e me incentivam, que me ouviram reclamar, chorar e comemorar cada momento deste mestrado. Obrigada por existirem e tornarem a trajetória na Rural mais leve. Vocês são os melhores companheiros do mundo. Viva o nosso bonde!

Aos meus amigos de longa data, Léo e Lili, que de longe ou de perto me acompanharam e compreenderam as vezes que eu não pude estar presente. Vocês são a prova de que uma amizade de verdade resiste a qualquer situação.

Às minhas companheiras de laboratório e também de vida Mel, Jéssica e Day, que puderam acompanhar meu sofrimento e minha alegria, que sempre me incentivaram e também foram fundamentais para que eu não desistisse. Obrigada por compartilhar os momentos felizes e também os de ranço, levo vocês no meu coração.

Aos melhores presentes que eu poderia ganhar neste mestrado, que me receberam de braços abertos no Laboratório de Sanidade Avícola - LASAVE, para que eu pudesse realizar meus experimentos, Thamyris Vilela e Miguel Mota. Vocês viveram de perto todo o meu sofrimento, angustia e realização. Vocês me incentivaram, me

mostraram como fazer dar certo. Vocês se tornaram os melhores amigos que poderia ter encontrado em um laboratório. Vocês fazem parte desta conquista!

Ao Jô, técnico do LASAVE, que me levou para coletas, que colocou a mão na massa junto comigo, sempre mostrando muita boa vontade. Agradeço também a todos os ic's, mestrandos, doutorandos e residentes do laboratório que sempre se mostraram solícitos.

Ao professor Avelino Bittencourt, por ter cedido o espaço para que pudéssemos aprender como estabelecer uma colônia de *Stomoxys*.

Aos funcionários do HVE, da Estação de Parasitologia e do Setor de Reprodução por sempre se mostrarem solícitos quando precisei de ajuda com os animais nos momentos de coleta.

Aos animais, por me permitir usá-los para as coletas. Um agradecimento especial *in memoriam* ao Caramelo, o melhor boi que eu conheci nesta trajetória.

À minha orientadora Patrícia Fampa pela orientação, por ter acreditado no meu potencial e por todo o aprendizado adquirido dentro e fora do laboratório.

Ao professor Huarrisson Azevedo, por ter me co-orientado, por ter acreditado neste trabalho e por toda ajuda ao longo do caminho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo aprendizado recebido nesse curso.

A todos que de alguma forma fizeram parte e contribuíram para que a vitória fosse alcançada!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

ARAÚJO, Thamires Rezende. **Investigação de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale* em *Stomoxys calcitrans*, no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ.** 2019. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Moscas do gênero *Stomoxys* têm sido caracterizadas como vetores mecânicos e biológicos de diversos patógenos. *Stomoxys calcitrans*, mosca cosmopolita de hábito alimentar hematofágico, onde tanto macho quanto fêmea se alimentam de sangue, apresentam comportamento agressivo e persistente, o que leva à alimentação em diferentes hospedeiros, sendo um fator importante na sua incriminação como vetor mecânico de patógenos. Este estudo teve como objetivo detectar a presença de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale* em moscas da espécie *Stomoxys calcitrans* coletadas em três pontos dentro do campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. As moscas coletadas foram dissecadas, separadas em órgãos e armazenadas para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) e análise molecular por PCR convencional (cPCR) e semi nestedPCR para *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale*, agentes de importantes doenças em bovinos. Em cPCR todas as 55 amostras testadas foram negativas para a presença de *T. vivax*. Em semi nested PCR, 19 amostras foram positivas para a presença de *A. marginale* e as demais foram negativas. Este trabalho foi o primeiro relato da presença de *A. marginale* em *S. calcitrans* mostrado no estado do Rio de Janeiro e também em nosso país, indicando que a importância epidemiológica na transmissão de doenças com importante impacto econômico desse vetor não pode ser ignorada. Apesar de moscas coletadas no campus de Seropédica da UFRRJ terem sido negativas para *T. vivax*, a coleta em outras regiões do estado devem ser consideradas, uma vez que casos de bovinos infectados no estado do Rio de Janeiro foram relatados recentemente.

Palavras-chave: *Stomoxys calcitrans*, *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, doenças transmitidas por vetores, diagnóstico molecular

ABSTRACT

ARAÚJO, Thamires Rezende. **Investigation of *Trypanosoma vivax* and *Anaplasma marginale* in *Stomoxys calcitrans*, at the campus of Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ.** 2019. 53p. Dissertation (Master in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Flies of the *Stomoxys* genus have been characterized as mechanical and biological vectors of several pathogens. *Stomoxys calcitrans*, a cosmopolitan fly with males and females that presents hematophagy as feeding habits, present aggressive and persistent behaviour which leads to feeding in different hosts and being an important factor for their incrimination as mechanical vector of pathogens. The objective of this study was to detect the presence of *Trypanosoma vivax* and *Anaplasma marginale* in *Stomoxys calcitrans* flies collected at three points inside the *campus* of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. The flies collected were dissected, theirs orgnas were separated and stored for extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) and molecular analysis by conventional PCR (cPCR) and semi *nested*PCR for *Trypanosoma vivax* and *Anaplasma marginale*. In cPCR all the 55 samples tested were negative for the presence of *T. vivax*. In semi *neste* PCR, 19 samples were positive for the presence of *A. marginale* and the others were negative. This work is the first report of the presence of *A. marginale* in *S. calcitrans* at Rio de Janeiro state and also in our country, pointing the epidemiological importance of this vector in the transmission of diseases with great economic impact must not be ignored. Although the flies collected at Seropédica campus of UFRRJ have been negative for the presence of *T. vivax*, the collection of fly sample at other different regions of the state must considered, once infected cattle have been recently reported at Rio de Janeiro state.

Keywords: *Stomoxys calcitrans*, *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, vector-borne diseases, molecular diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Stomoxys calcitrans</i>	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Stomoxys calcitrans</i>	3
Figura 3. Principais fases do ciclo de vida do <i>T. vivax</i> – hospedeiro invertebrado e hospedeiro vertebrado.....	6
Figura 4. <i>Trypanosoma vivax</i> -forma tripomastigota em esfregaço sanguíneo.....	7
Figura 5. Eritrócito bovino infectado com <i>Anaplasma marginale</i>	8
Figura 6. Pontos de coleta na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.....	13
Figura 7. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de <i>Trypanosoma vivax</i> por PCR convencional de 13/12/2018.	36
Figura 8. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação para <i>Trypanosoma vivax</i> por PCR convencional de 22/01/2019.....	18
Figura 9. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de <i>Anaplasma marginale</i> por semi nested PCR de 31/01/2019..	19
Figura 10. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de <i>Anaplasma marginale</i> por semi nested PCR de 06/02/2019..	20
Figura 11. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de <i>Anaplasma marginale</i> por semi nested PCR de 07/02/2019..	21
Figura 12. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de <i>Anaplasma marginale</i> por semi nested PCR de 20/02/2019..	21
Figura 13. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de <i>Anaplasma marginale</i> por semi nested PCR de 18/02/2019..	42
Figura 14. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de <i>Anaplasma marginale</i> por semi nested PCR.....	43
Figura 15. Relação de identidade obtida através do contig do sequenciamento da amostra M1 I.	44
Figura 16. Identidade de 99,56% da amostra com <i>Anaplasma marginale</i> obtida através do contig do sequenciamento da amostra M1 I.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agentes causadores de doenças associados à <i>Stomoxys</i> spp.....	4
Tabela 2. Maiores produtores de leite no mundo em 1998.....	9
Tabela 3. Produção de Leite, vacas ordenhadas e produtividade animal em dez países, 2000/2015.....	10
Tabela 4. Amostras positivas para <i>Anaplasma marginale</i>	18
Tabela 5. Controles F1 que amplificaram positivos para <i>Anaplasma marginale</i>	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cPCR	Reação da Cadeia de Polimerase convencional
PCR	Reação da Cadeia de Polimerase
Est	Estação Experimental W. C. Neitz
HVE	Hospital Veterinário de Grandes Animais
Repro	Setor de Reprodução
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
MSPs	Principais proteínas de superfície
rpm	rotações por minuto

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Stomoxys calcitrans</i>	2
2.2 <i>Stomoxys calcitrans</i> como vetor de patógenos	3
2.3 <i>Trypanosoma vivax</i>	5
2.4 <i>Anaplasma marginale</i>	7
2.5 Economia x Doenças Parasitárias	9
2.6 Diagnósticos moleculares	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Local de coleta	13
3.2 Insetos	13
3.2.1 Coleta de moscas	13
3.2.2 Dissecção	13
3.2.3 Moscas de colônia para controle negativo	14
3.3 Extração de DNA	14
3.3.1 Salting Out	14
3.4 Diagnóstico Molecular	14
3.4.1 PCR convencional para detecção de <i>Trypanosoma vivax</i>	14
3.4.2 Semi Nested PCR para detecção de <i>Anaplasma marginale</i>	15
3.4.3 Purificação dos produtos de PCR	15
3.4.4 Sequenciamento e alinhamento das sequências	15
4. RESULTADOS	17
4.1 Detecção de <i>Trypanosoma vivax</i>	17
4.2 Detecção de <i>Anaplasma marginale</i>	18
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
8. ANEXOS	36

1. INTRODUÇÃO

Vetores mecânicos são caracterizados como transportadores de formas infectantes dos agentes infecciosos de um hospedeiro para outro, não ocorrendo nenhuma mudança do agente infeccioso quando albergado pelo vetor. Este transporte de patógenos pode ocorrer pelas patas ou partes do corpo incluindo as peças bucais do vetor.

Neste contexto, moscas do gênero *Stomoxys* podem se apresentar como vetores mecânicos de diversos patógenos, sejam eles vírus, protozoários, bactérias e helmintos. São moscas hematófagas, onde tanto macho quanto fêmea se alimentam de sangue, sendo caracterizados como dípteros agressivos e persistentes. São frequentemente encontradas em ambientes onde há criação de animais, mas também podem estar presentes em áreas residenciais próximas a produções agrícolas. (BALDACCHINO et al., 2013).

Muito se debate sobre integrar saúde humana e animal, mas foi no século XX que o epidemiologista C. W. Schwabe começou a aplicar o conceito de Medicina Única comumente chamado de Saúde Única, propondo então uma unificação da medicina humana e veterinária e meio ambiente, em combate as doenças zoonóticas e segurança alimentar (ZINSSTAG et al., 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde, Saúde Única é uma estratégia para de desenvolver e implementar programas, políticas, legislações e pesquisa onde múltiplos setores se comunicam e trabalham juntos para alcançar melhores resultados em saúde pública (OMS, 2017).

Doenças transmitidas por vetores, como por exemplo, malária e leishmaniose, podem ser difíceis de controlar, devido à sua complexa epidemiologia, que podem envolver diversos vetores e hospedeiros. Por isto, uma abordagem integrada, principalmente para os casos de ocorrência de zoonoses, poderia auxiliar nas decisões de tratamento e implementação de medidas preventivas por parte de médicos e médicos veterinários (DANTAS-TORRES et al., 2012). Fatores ambientais em especial relacionados a mudanças geográficas como aquecimento global, desmatamentos e globalização têm impactado a dinâmica de na dinâmica populacional vetores e disseminação de doenças.

Stomoxys calcitrans, mosca cosmopolita, causa impactos na saúde animal, uma vez que pode ser vetor mecânico de patógenos, além de causar estresse nos animais por decorrência de sua picada dolorosa. Este parasitismo afeta até mesmo os seres humanos, pois é capaz de impactar nas produções de leite e carne nas criações de bovinos, afetando principalmente a economia.

Portanto, a realização de estudos para que se possa entender melhor a dinâmica da mosca como vetor é de grande importância. Estes estudos podem então elucidar os questionamentos a respeito da epidemiologia de doenças em determinadas localidades.

No estado do Rio de Janeiro não há muitos estudos sobre a epidemiologia e importância de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale*, na dinâmica de transmissão por *Stomoxys calcitrans*.

Com isto, este trabalho teve como objetivos detectar a presença de *Trypanosoma vivax* e *Anaplasma marginale* nos intestinos, peças bucais e carcaça contendo corpo gorduroso de *Stomoxys calcitrans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Stomoxys calcitrans*

Stomoxys calcitrans (Figura 1), artrópode popularmente conhecido como mosca dos estábulos, podendo ser vetor mecânico de agentes patogênicos presentes no sangue e na pele de seus hospedeiros (BALDACCHINO et al., 2013). Suas formas larvais desenvolvem-se comumente em matéria orgânica em fermentação, principalmente contendo estrume e urina bovinos, substratos industriais como fardos de feno, silagem, bioassólidos desidratados, entre outros (CORRÊA E. C. et. al., 2013).



Figura 1. *Stomoxys calcitrans*.

Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Stomoxys_calcitrans_01.jpg. Acesso em: 03 dezembro 2018.

São cosmopolitas e apresentam alimentação sanguínea. Podem atingir densidades populacionais muito altas em locais de manejo de gado, como por exemplo, em fazendas leiteiras. Por apresentarem uma picada dolorosa, muitas vezes ocorrem interrupções durante a alimentação da mosca, devido ao comportamento defensivo do hospedeiro. O número elevado de interrupções durante a alimentação proporciona uma oportunidade ideal para transmissão mecânica de diversos patógenos de hospedeiros infectados para não infectados (SCOLES, 2005).

Tem como hospedeiro preferencial os bovinos e neles, as partes do corpo de maior preferência são orelhas e boletos e quando não perturbada cada mosca leva de três a cinco minutos se alimentando (BRITTO et al., 2008). Por ser um fator de incômodo para o animal, a picada da mosca pode resultar em perdas na produção de leite e redução do ganho de peso para gados de corte, o que pode vir a afetar diretamente a economia (MULLENS, et al., 2006). Estudos realizados por Campbell et al., (1987), demonstraram reduções no ganho de peso, que variam de 13,2 a 20% em animais infestados por estas moscas, bem como a redução de até 0,7% na produção de leite. Estas perdas podem gerar um déficit anual de mais de US\$ 100 milhões no Brasil (CORRÊA et al., 2013), sem contar as perdas causadas pelas doenças por ela transmitidas que não entram nos cálculos e que podem ser muitas vezes subestimadas.

Fatores como umidade, temperatura, pH e competição interespecífica estão diretamente ligados com o aumento da população de *S. calcitrans* no ambiente (CORRÊA et al., 2013). Surtos eventuais da mosca têm sido notificados há alguns anos, ocorrendo próximos a áreas canavieiras e em confinamentos de bovinos, tendo ou não associação com usinas alcooleiras ou sucroalcooleiras (KOLLER et al., 2009).

Sabe-se que alguns substratos são propícios para o desenvolvimento de todo o ciclo de vida do inseto, como por exemplo, resíduos de produtos hortícolas (KING AND LENERT, 1936; SIMMONS, 1944; HERRERO et al., 1989), resíduos de cana de açúcar, álcool, torta de filtro de cana e vinhaça (GILLES et al., 2008; BITTENCOURT, 2012).

O ciclo biológico (Figura 2) compreende as fases de ovo, larva de 1º instar (L1), larva de 2º instar (L2), larva de 3º instar (L3), pupa e adultos. A temperatura ideal para o desenvolvimento e maior sobrevivência da mosca está ao redor de 25°C. De acordo com estudos realizados, sob esta temperatura, após a postura, por volta de dois a três dias ocorre a eclosão da larva L1 que irá sofrer duas ecdises até atingir a fase L3, levando então de dez a treze dias para completar esta fase do desenvolvimento. A larva L3 dará origem à pupa que, após seis dias dará origem à mosca adulta. O ciclo evolutivo de *S. calcitrans* se completa em aproximadamente duas a três semanas em localidades de clima quente (AGUIAR-VALGODE; MILWARD-DE-AZEVEDO, 1992).

Pode-se destacar que ambos os sexos se alimentam de sangue, uma ou duas vezes ao dia, dependendo da temperatura ambiente, vindo a interromper completamente essa atividade nas épocas frias (BOWMAN, 2010).

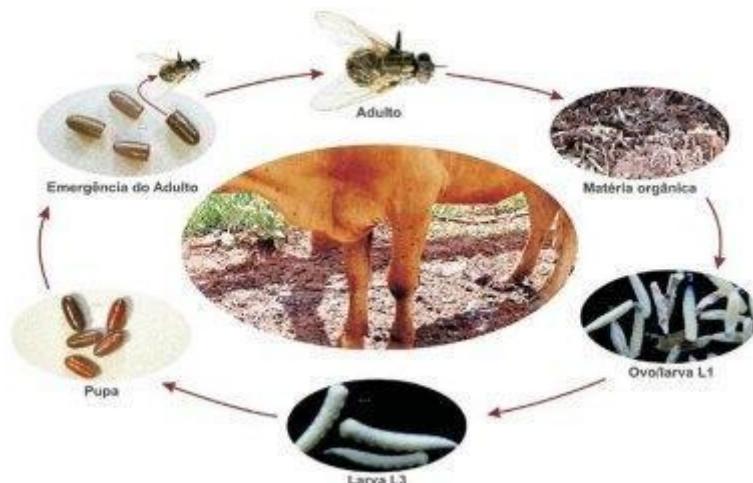


Figura 2. Ciclo de vida de *Stomoxys calcitrans*.

Fonte: <http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/pragas/resistencia-da-mosca-dos-estabulos-stomoxys-calcitrans-a-cipermetrina.html>. Acesso em 03 dezembro 2018.

2.2 *Stomoxys calcitrans* como vetor de patógenos.

O gênero *Stomoxys* apresenta 18 espécies descritas. São insetos obrigatoriamente hematófagos, sendo algumas espécies consideradas pragas econômicas em diversas partes do mundo (ZUMPT, 1973). São moscas consideradas persistentes e agressivas. Na ausência de seus hospedeiros preferenciais, podem até se alimentar de sangue humano. Apesar de serem consideradas hematófagas estudos demonstraram que as moscas *S. calcitrans* e *Stomoxys niger* também podem se alimentar de açúcares de flores ou frutos maduros (MULLER et al., 2012).

A transmissão de patógenos de forma mecânica é considerada uma das mais importantes conquistas indiretas dos insetos hematófagos, e esta transmissão pode ocorrer por

contaminação das peças bucais ou regurgitação do conteúdo do trato digestório. Evidências experimentais mostram que *S. calcitrans* podem regurgitar parte de uma primeira alimentação antes de começar uma nova alimentação (BUTLER et al., 1977). A regurgitação de uma quantidade relativa do sangue que foi ingerido previamente poderia ser uma importante forma de se transmitir agentes patogênicos. Porém este fenômeno pode acabar se limitando apenas a determinados patógenos, pois alguns apresentam uma curta sobrevivência, podendo então ser inibidos pela secreção digestiva (FRENC et al., 1988).

O potencial de capacidade vetorial para transmissão mecânica de patógenos está ligado ao volume de sangue que fica no aparelho bucal após a alimentação, que vai ser diretamente proporcional ao tamanho da parte bucal do inseto, a densidade de insetos que estão presentes ao redor dos animais, a parasitemia do hospedeiro vertebrado, entre outros fatores. De forma mais específica, pode variar em relação à dose infecciosa mínima do patógeno, à sobrevivência no inseto e em relação aos períodos entre uma alimentação e outra (FOIL & GORHAM, 2000; SCHOFIELD, 2002).

Sabe-se que moscas pertencentes ao gênero *Stomoxys* podem ser vetores de diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias, protozoários e helmintos (BALDACCHINO et al., 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Agentes de doenças associados à *Stomoxys* spp.

Agente Patogênico	Ocorrência Geográfica	Transmissão
Vírus		
Anemia Infecciosa Equina	No mundo todo	Mecânica
Vírus da Peste Suína	África e Itália	Mecânica
Vírus da Febre do Nilo Ocidental	No mundo todo	Mecânica
Vírus da Febre do Vale do Rift	África e Oriente Médio	Mecânica
Vírus da Doença de Pele Irregular	África e Oriente Médio	Mecânica
Vírus da Herpes Bovina	No mundo todo	Mecânica
Vírus da Leucose Bovina	No mundo todo	Mecânica
Vírus da Estomatite Vesicular	América	Mecânica
Bactéria		
<i>Bacillus anthracis</i>	No mundo todo	Mecânica
<i>Pasteurella multocida</i>	No mundo todo	Mecânica
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	No mundo todo	Mecânica
<i>Francisella tularensis</i>	América do Norte, Europa, norte da África, Oriente Médio e Ásia	Mecânica
<i>Enterobacter sakazakii</i>	No mundo todo	Biológica e Mecânica
<i>Dermatophilus congolensis</i>	No mundo todo	Mecânica
Rickettsia		

<i>Anaplasma marginale</i>	No mundo todo (trópico e subtrópico)	Mecânica
Protozoa		
<i>Trypanosoma evansi</i>	América do Sul, norte da África, Ásia e Europa	Mecânica
<i>Trypanosoma vivax</i>	América do Sul e África	Mecânica
<i>Trypanosoma brucei</i>	África	Mecânica
<i>Trypanosoma congolense</i>	África	Mecânica
<i>Besnoitia besnoiti</i>	América do Sul, Europa, África, Oriente Médio e Ásia	Mecânica
<i>Leishmania tropica</i>	Norte da África, Oriente Médio e Ásia	Mecânica
Helminto		
<i>Habronema microstoma</i>	No mundo todo	Biológica

Fonte: Adaptado de BALDACCHINO et al., 2013.

De acordo com Marcondes (2011), a mosca dos estábulos pode transmitir mecanicamente alguns tripanossomas de animais domésticos, como *Trypanosoma evansi*, causadora do mal das cadeiras ou quebra-bunda, importante especialmente nos estados do Pará e Mato Grosso, além de agentes causadores de outras doenças, como anemia infecciosa em equinos. Também atua como vetor biológico de *Habronema microstoma*, nematódeo parasito do estômago do equino (BOWMAN, 2010).

Em estudo realizado por Batista et al. (2008) na Paraíba, proprietários relataram que os períodos de surto da tripanosomiase bovina, foram correlacionados com um aumento na população de mutucas (*Tabanus spp.*) e moscas dos estábulos (*S. calcitrans*).

2.3 *Trypanosoma vivax*

Trypanosoma vivax, agente etiológico da tripanossomiase bovina apresenta amplo espectro de hospedeiros, infectando um grande número de espécies domésticas e selvagens. Na África, a mosca tsé-tsé é a principal vetor (CUGLOVICI et al., 2010).

T. vivax africano é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé (Figura 3). As formas sanguíneas de tripanosomas do hospedeiro infectado são ingeridas pela mosca e localizam-se no esôfago e faringe, onde se transformam em formas epimastigotas. Após 24 horas, os epimastigotas migram em direção ao canal alimentar onde se multiplicam e permanecem então próximas a parede do labro. As formas epimastigotas migram do labro para a hipofaringe, onde se transformam em formas tripomastigotas, e depois em formas infectantes que podem ser chamadas de metatripanosomas. Nos mamíferos, o desenvolvimento é considerado simples. É iniciado pela inoculação dos metatripanosomas pelo inseto através de picada ou passivamente, pela contaminação de membranas mucosas do mamífero ou pele. Os *T. vivax* encontrados na América do Sul são apenas transmitidos mecanicamente por espécies hematófagas, não apresentando então um ciclo de desenvolvimento no inseto vetor (SILVA, 2002).

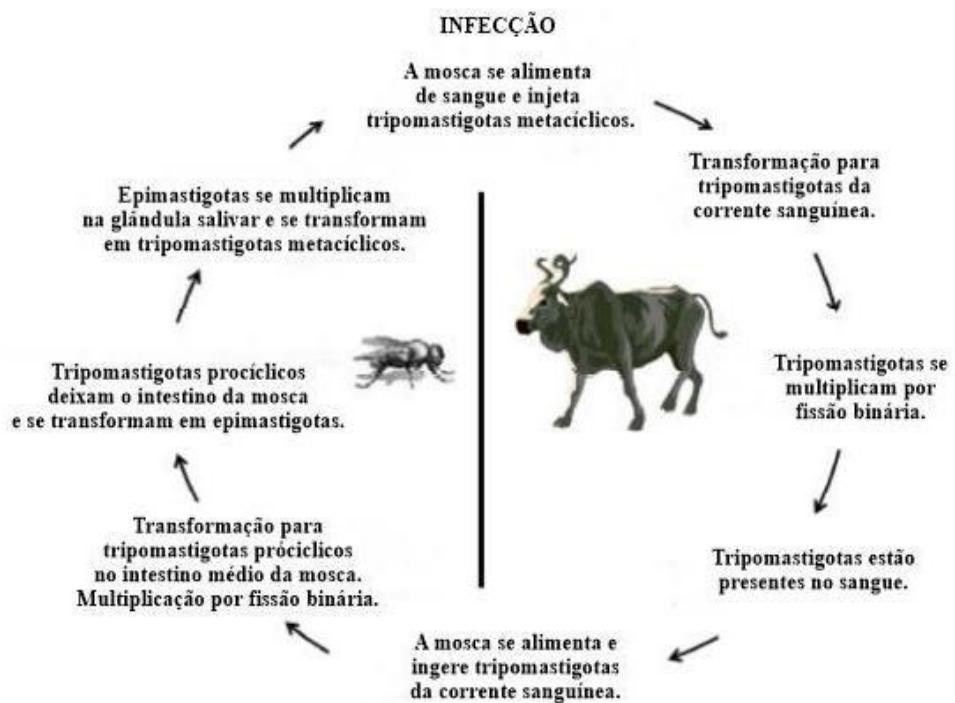


Figura 3. Principais fases do ciclo de vida do *T. vivax* – hospedeiro invertebrado e hospedeiro vertebrado.

Fonte: Adaptado de DGNACHEW et al., 2015.

Na América do Sul, foi provavelmente introduzida por volta de 1830 através de gado infectado trazido da África. A transmissão mecânica por aqui ocorre por meio de tabanídeos e provavelmente outras moscas como *S. calcitrans* (CADIOLI et al., 2012). Levando-se em consideração a diversidade ecológica existente no novo mundo, *T. vivax* conseguiu manter-se na ausência de seu vetor biológico, adaptando-se então à transmissão mecânica por insetos hematófagos do grupo dos tabanídeos, subordem Brachycera, família Tabanidae e por *S. calcitrans*. (PAIVA et al., 2000).

É uma espécie de importância considerável para as criações na África Ocidental. Nos bovinos, a infecção pode ser assintomática, podendo provocar doença aguda ou crônica. Quando crônica, os bovinos se tornam anêmicos e magros, com sinais de debilidade grave. Já nos casos agudos pode ocorrer parasitemia alta associada a extensas hemorragias nas superfícies mucosas e serosas do corpo (BOWMAN, 2010).

Apresenta como características morfológicas um formato de foice, achatado, núcleo grande e central, cinetoplasto grande e uma extremidade posterior mais arredondada (MONTEIRO, 2011) (Figura 4).

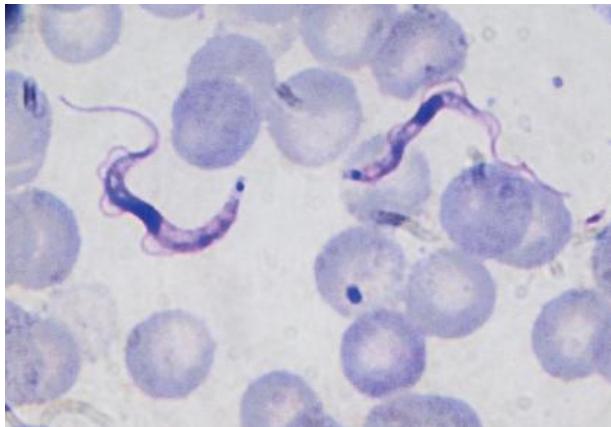


Figura 4. *Trypanosoma vivax*-forma tripomastigota em esfregaço sanguíneo.

Fonte: MONTEIRO, Silvia Gonzalez, 2011.

2.4 *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é uma bactéria gram-negativa parasita intracelular obrigatório encontrado exclusivamente em vacúolos no citoplasma das células de hospedeiros vertebrados. Sua transmissão para bovinos no Brasil ocorre principalmente por meio de vetores mecânicos (moscas hematófagas) e biológicos (sendo a espécie de carapato *Rhipicephalus (Boophilus.) microplus*, muito importante nessa dinâmica) (LOPES et al., 2016).

A transmissão biológica de *A. marginale* por várias espécies de ixodídeos tem sido demonstrada experimentalmente (STILLER; COAN 1995). O desenvolvimento de colônias de *A. marginale* no intestino de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (B.) microplus* foi comprovado pro Ribeiro & Lima em 1996. Porém a transmissão transovariana não ocorre nesta espécies (RIBEIRO et al., 1996).

Apesar de *R.(B) microplus* realizar a ecdise sobre o hospedeiro, foi comprovado que, frequentemente, mudam de hospedeiro, ao deslocar-se do local de fixação do instar anterior para fixar-se e reiniciar a alimentação do novo instar. Isso se explica devido à mobilidade dos novos instares e dos machos. O hábito dos bovinos, de estar em grande maioria agregados, tendo contatos físicos frequentes, facilita a passagem de um bovino para o outro (KESSLER, 2001).

A infecção do carapato e a transmissão interestadial ou transestadial (que ocorre quando há a infecção em um estádio e a transmissão no estádio seguinte) por *R. microplus* (Aguirre et al., 1994) e por *Dermacentor variabilis* (KOCAN et al., 1980), e intraestadial (que ocorre quando o macho adulto em um bovino portador e transmite, posteriormente, para outro bovino sensível) por *Dermacentor andersoni* (GE et al., 1996) e por *R. microplus* (SAMISH et al., 1993), foram cientificamente provadas. A importância epidemiológica dos machos, devido a sua capacidade maior de mobilidade e longevidade pode ser destacada. Além disto, Eriks et al. 1993, destacou que *D. andersoni* é capaz de adquirir a infecção por *A. marginale* mesmo quando o bovino portador apresenta parasitemia extremamente baixa, podendo então transmitir para bovinos sensíveis, mesmo com uma baixa quantidade de machos, demonstrando assim uma efetiva transmissão.

Anaplasma marginale pode ser considerado o patógeno mais prevalente transmitido por carapatos no mundo, pois está presente nos seis continentes e é o responsável por um alto

índice de morbidade e mortalidade de bovinos em regiões temperadas, subtropicais e tropicais, incluindo o Brasil (KOCAN et al., 2010).

O sítio de infecção conhecido de *A. marginale* em bovinos são os eritrócitos (Figura 5). Alguns trabalhos relatam a propagação da bactéria em linhagens de células endoteliais bovinas, mas a infecção dessas células *in vivo* não foi demonstrada (MUNDERLOH et al., 2004). Nos eritrócitos formam-se inclusões ligadas à membrana, que contém de 4 a 8 riquétsias, podendo até 70% dos eritrócitos serem parasitados em casos de infecção aguda (RICHEY, 1981).

Sabe-se que além de serem parasitos das células hematopoiéticas dos hospedeiros mamíferos, *A. marginale* pode invadir e se replicar em células do intestino médio e da glândula salivar de artrópodes vetores (RAMABU et al., 2011).

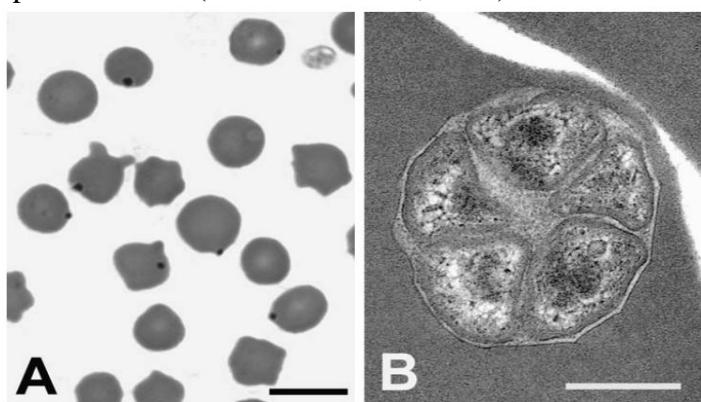


Figura 5. Eritrócito bovino infectado com *Anaplasma marginale*.

Fonte: KOCAN, K. M. et al., 2004.

O tempo de infecção pode variar de 7 a 60 dias, tendo uma média de 28 dias. Esta variação se dá pela carga parasitária do animal. Depois de detectada a infecção, o número de eritrócitos parasitados aumenta geometricamente. Estes eritrócitos são posteriormente fagocitados pelas células reticuloendoteliais bovinas, levando os animais a desenvolverem anemias de leve a grave e icterícia. Os sinais clínicos da doença podem ser febre, perda de peso, letargia, aborto e em animais com mais de dois anos, pode levar a morte (RISTIC, 1977).

A infecção de bovinos com *A. marginale* causa anaplasmosse bovina, podendo resultar em perdas econômicas consideráveis para as indústrias de laticínios e corte (KOCAN et al., 2010).

Endêmica no México, América Central e do Sul e nas Ilhas do Caribe, é enzoótica em todos os países da América Latina, exceto em áreas desérticas e algumas cadeiras de montanhas, como a Cordilheira dos Andes (GUGLIELMONE, 1995). Na Europa é encontrada principalmente nos países do Mediterrâneo, em bovinos e alguns animais selvagens. Também é endêmica em regiões da Ásia e da África (DE LA FUENTE et al., 2005).

Pelo menos doze espécies já se mostraram capazes de transmitir mecanicamente *A. marginale*, incluindo *Stomoxys calcitrans*, oito espécies de Tabanidae e três espécies de Culicidae (SCOLES, 2005).

Em um estudo realizado por Bautista et al. (2018) foi sugerido que *S. calcitrans* transmitia mecanicamente *A. marginale* pois os bovinos estudados eram livres de carapatos e as moscas capturadas na área se apresentaram positivas para a bactéria. Também neste estudo levanta-se a hipótese de uma ampliação na epidemiologia da anaplasmosse, pois a bactéria tem

sido encontrada em hospedeiros diferentes do gado, como o *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) fazendo então uma correlação com o fato de *S. calcitrans* se alimentar de diversos mamíferos contribuindo para a transmissão mecânica.

2.5 Economia x Doenças Parasitárias

O setor de leite e derivados encontra-se em todo o território nacional e é um importante gerador de empregos, renda e tributos, podendo ser considerado um dos principais sistemas agroindustriais brasileiros (MARTINS & GUILHOTO, 2001). O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, onde a produção nacional é praticamente o dobro da Nova Zelândia e mais que o dobro da produção na Argentina, que são países considerados referência na produção mundial (Tabela 2) (GOMES, 1999).

Tabela 2. Maiores produtores de leite no mundo em 1998.

PAÍS	BILHÕES DE LITROS/ANO
1º ESTADOS UNIDOS	70,5
2º ÍNDIA	34,5
3º RÚSSIA	32,5
4º ALEMANHA	28,6
5º FRANÇA	25,0
6º BRASIL	21,0
7º UCRÂNIA	16,5
8º REINO UNIDO	14,5
9º POLÔNIA	11,8
10º NOVA ZELÂNDIA	11,5

Fonte: Adaptado de GOMES, Sebastião Teixeira.

Além de o Brasil ser um grande importador de lácteos, abriga um dos maiores rebanhos produtivos do mundo, com mais ou menos 23 milhões de cabeças. No período de 2000 a 2015 a produção teve um crescente de 72,3%, um aumento de 28,7% no rebanho, gerando um aumento de 33,8% na produtividade (Tabela 3) (REVISTA BALDE BRANCO, ABRIL 2017).

Tabela 3. Produção de Leite, vacas ordenhadas e produtividade animal em dez países, 2000/2015.

País	PRODUÇÃO DE LEITE, VACAS ORDENHADAS E PRODUTIVIDADE ANIMAL EM DEZ PAÍSES, 2000/2015					
	Produção - mil t		Vacas ordenhadas- mil cab.		Produtividade mil L/vaca	
	2000	2015	2000	2015	2000	2015
Reino Unido	14.488	15.050	2.354	1.851	6.155	8.131
Turquia	8.732	16.999	5.280	5.609	1.654	3.031
Nova Zelândia	12.235	21.317	3.337	5.176	3.666	4.119
França	24.998	25.333	4.203	3.698	5.948	6.849
Rússia	31.959	30.511	12.771	7.573	2.502	4.029
Alemanha	28.331	32.395	4.628	4.296	6.122	7.541
Brasil	20.380	35.124	17.885	23.028	1.140	1.525
China	8.632	37.610	4.866	12.561	1.774	2.994
Índia	32.967	66.423	32.883	45.949	1.003	1.446
Estados Unidos	76.023	93.461	9.210	9.208	8.254	10.150
Total - 10	258.745	374.223	97.417	118.949	3.822	4.982
Mundo	489.981	655.958	219.963	274.002	2.228	2.394

Fonte: FAOSTAT, 2017

Fonte: Revista Balde Branco, Abril/2017.

A agropecuária foi um dos maiores motores para a economia do país em 2017 e o mercado financeiro aposta que pode ter sido o setor com o maior crescimento no ano, esperando-se que com isso o Produto Interno Bruto (PIB) agrícola e agropecuário tenha crescido 3,61% (PORTAL BRASIL, 2017). Em registros de 2015 a atividade agropecuária respondeu por 21% do PIB, 27% dos empregos e 43% das exportações (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA NO BRASIL, 2015).

Fazendas produtoras de leite desempenham um relevante papel social na geração de empregos, tendo no Brasil mais ou menos 1 milhão e 100 mil propriedades que desempenham esta função de produção, gerando cerca de 3,5 milhões de empregos. Para se avaliar o impacto deste setor na economia pode-se dizer que o valor alcançado anualmente supera os setores que são colocados tradicionalmente como mais importantes, como automobilismo, construção civil, siderurgia e têxtil (VILELA, 2001).

O impacto econômico de parasitas externos no gado está associado principalmente à infestação pelo carrapato *R. (B) microplus*, mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*), *Dermatobia hominis* e *Cochliomyia hominivorax*. Além disso, a importância da mosca dos estábulos (*S. calcitrans*) aumentou por seu surto estar associado a resíduos pós-colheita da cana-de-açúcar (BARROS et al., 2010). Em 2002, Grisi et al. estimaram que as perdas econômicas totais para ectoparasitas em bovinos no Brasil teriam sido de U\$ 2,650 milhões.

As perdas econômicas causadas por infestação de mosca dos estábulos nos Estados Unidos em bovinos de confinamento são estimadas em cerca de 100g por boi por dia e uma redução de 27 kg na produção de leite por vaca por ano, em situações onde a presença da mosca era confirmada por pelo menos 6 meses (KUNZ et al., 1991). Considerando que no Brasil existem 4,08 milhões de bovinos em confinamento as perdas relacionadas à mosca podem ser estimadas em U\$ 59,49 milhões, e em relação à produção de leite as perdas foram estimadas em U\$ 275,97 milhões. As perdas associadas a *S. calcitrans* é provavelmente uma subestimativa, já que o impacto da mosca em gados de pasto e o tamanho da população afetada, principalmente surtos severos, ainda é desconhecido, mas sabe-se que a frequência e a gravidade desses surtos no Brasil estão aumentando devido à expansão da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar (GRISI et al., 2014).

2.6 Diagnósticos moleculares

Para que se possa constatar a presença de um agente infeccioso conta-se com alguns métodos que podem ser de diagnósticos diretos, com a visualização direta do patógeno como: esfregaços corados preparados com parte da amostra clínica, técnicas de cultura ou indiretos como métodos moleculares/imunológicos que detectam anticorpos do hospedeiro contra os patógenos ou amplificação de genes dos mesmos. Algumas vezes combinações de mais de um destes métodos podem ser utilizadas. Em exames diretos como a técnica de esfregaço sanguíneo a informação obtida pode ser valiosa por ser a primeira indicação e algumas vezes única, da presença de um microrganismo infeccioso. Com esta técnica podem-se observar características morfológicas e de coloração que irão auxiliar na identificação e escolha do tratamento antes que os resultados de cultura estejam disponíveis. Nas técnicas de cultura, meios são inoculados com parte da amostra. A determinação do número relativo de microrganismos na amostra auxilia muito na interpretação do grau de relevância de uma infecção. Os métodos moleculares/imunológicos são importantes para detectar a presença ou ausência de um microrganismo em particular (KENNEDY et al. Microbiologia Veterinária – 3^a Edição, 2016. Guanabara Koogan).

A procura de soluções para diminuir o impacto das doenças e a necessidade de se provar a eficácia de métodos propedêuticos e de procedimentos terapêuticos abriu as portas para o que hoje se denomina medicina baseada em evidências. Não se deve esquecer que todos os exames, desde os mais simples aos mais complexos estão limitados pela sensibilidade e especificidade (KAWAMURA, 2002).

Mediante os surtos epidêmicos de doenças notou-se a necessidade de se desenvolver métodos de controle e prevenção e para que medidas eficazes sejam tomadas se fazendo necessário o uso de métodos de diagnósticos acurados. Métodos decorrentes do aprimoramento da biologia molecular e celular têm propiciado a utilização de técnicas diagnósticas que produzem resultados confiáveis em poucos minutos ou horas (CAVALCANTI et al., 2008).

Nos últimos vinte anos o desenvolvimento de métodos mais rápidos de diagnóstico proporcionou um avanço importante. A maior parte desses métodos baseia-se na detecção do complexo antígeno-anticorpo. (PERUSKI & PERUSKI, 2003; ROURA et al., 1999).

A citometria de fluxo é um método utilizado para avaliar as propriedades ópticas de partículas e/ou células que fluem em suspensão líquida. Células variadas podem ser identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, que por sua vez se ligam a抗ígenos da superfície celular ou intracitoplasmáticos. O tamanho e a complexidade celular (aspectos morfológicos) são avaliados mediante a dispersão luminosa frontal e lateral. Os sinais fluorescentes são decorrentes da positividade dos抗ígenos de membrana nas células que são captados, analisados e quantificados por um programa de computador (TRAGANOS, 1994).

As técnicas relacionadas à biologia molecular têm sido amplamente aplicadas no diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias (YANG & ROTHMAN, 2004). A reação da cadeia da polimerase (PCR) reproduz *in vitro* a replicação de regiões da molécula de DNA em grande escala e, de todas as técnicas moleculares é considerada a mais sensível (WENG et al., 2006). Os métodos moleculares se diferem dos imunológicos, pois evidenciam moléculas do DNA na amostra (MENDONÇA et al., 2004). Esta metodologia requer primeiramente o conhecimento pelo menos parcial do DNA alvo do organismo a ser testado para o desenvolvimento dos iniciadores específicos ou de sondas que irão hibridizar-se com a sequência alvo (YANG & ROTHMAN, 2004).

Apesar dos avanços tecnológicos, os métodos de amplificação da molécula de DNA apresentam limitações que podem incluir resultados falso-positivos, que são decorrentes de

contaminação com DNA, e resultados falso-negativos relacionados com a presença de inibidores da PCR (YANG & ROTHMAN, 2004).

Um significante avanço para o diagnóstico das doenças infecciosas foi o desenvolvimento da PCR em tempo real. Neste modelo diagnóstico há o uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento do produto amplificado (MORTARINO et al., 2004). A PCR em tempo real possibilita a eliminação da etapa pós-amplificação (gel para eletroforese), que é uma etapa necessária para a visualização do produto amplificado. As vantagens da PCR em tempo real em relação a PCR convencional são inúmeras e incluem: velocidade, reproduzibilidade e capacidade de quantificação. Esta tecnologia vem sendo utilizada para o acompanhamento de doenças como hepatite C, toxoplasmose e leishmanioses (SUNDSFJORD et al., 2005; YANG & ROTHMAN, 2004).

A PCR vem sendo aplicada em diversos estudos, como por exemplo, na investigação da doença de Chagas, atuando como método confirmatório no diagnóstico de pacientes onde a sorologia era duvidosa e também no controle pós-terapêutico da doença crônica em comparação às técnicas sorológicas e parasitológicas (PORTELA-LINDOSO & SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Pöschchl realizou um estudo comparativo em 2010, com a intenção de verificar três métodos, microscopia, *nested* PCR e amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) para diagnosticar malária em amostras de sangue humano. Eles puderam avaliar que LAMP não foi tão confiável quanto o *n*PCR, porém mais confiável que a microscopia e sugerem que ambos podem ser utilizados em conjunto para detecções precoces da malária e como métodos suplementares para uso clínico e epidemiológico.

Dentre as técnicas de diagnóstico molecular utilizadas, muitas estão presentes no diagnóstico dos patógenos nos hospedeiros vertebrados e também nos hospedeiros invertebrados, como por exemplo, na detecção de patógenos em artrópodes vetores.

Odeniran et al, 2019 através de diagnóstico molecular buscou entender a dinâmica da transmissão da tripanossomíase bovina na Nigéria. Com este estudo ele pode comprovar que moscas como *Glossina*, *Stomoxys* e *Tabanus* apresentavam em seu trato digestivo sangue de oito espécies hospedeiras diferentes: humanos, gado, hipopótamo, girafa, gazela, hiena-malhada, rato e outra espécie que eles não identificaram.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de coleta

O local escolhido para a realização do presente estudo foi o *campus* Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro. Foram selecionados três pontos de coleta: Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (1), Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVE) (2), pertencentes ao Instituto de Veterinária e Setor de Reprodução (3), pertencente ao Departamento de Reprodução e Avaliação Animal, do Instituto de Zootecnia, conforme demonstrado na imagem abaixo (Figura 6).

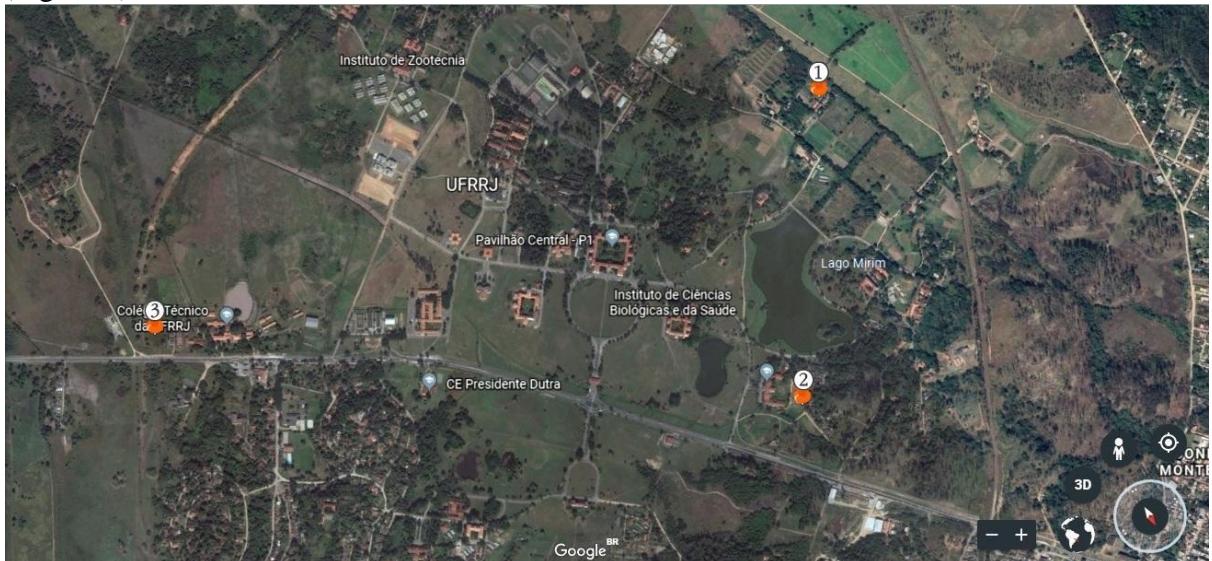


Figura 6. Pontos de coleta na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Fonte: Google Earth.

3.2 Insetos

3.2.1 Coleta de moscas

As coletas foram realizadas ao longo do ano de 2018, nos meses de março, junho, outubro e novembro sempre no período da manhã. Como uma tentativa de padronização das coletas, a permanência no ambiente com os bovinos era de aproximadamente 40 minutos. As moscas foram capturadas com o auxílio de um puçá e transferidas para uma gaiola para serem transportadas até o laboratório. Por coleta eram capturadas aproximadamente de 10 a 20 moscas.

3.2.2 Dissecção

Em laboratório, as moscas coletadas foram anestesiadas a - 20°C cerca de 5 minutos, lavadas com PBS e com auxílio de um microscópio binocular – estereoscópio 20x-40x e pinças Dumont nº5, comprimento 11 cm da Sigma-Aldrich® (MO, USA) foram dissecadas. Intestino, partes bucais e carcaça contendo corpo gorduroso foram colocados separadamente em microtubos de polipropileno contendo 200 microlitros de RNAlater® (Invitrogen, CA, USA). Os microtubos foram identificados por mosca, tecido, sexo e estado alimentar, o que foi determinado pela presença ou não de sangue a olho nu no tubo digestório. Após estes procedimentos, foram mantidos em freezer a -20°C.

3.2.3 Moscas de colônia para controle negativo

Sete moscas emergidas em colônia de linhagem F1 foram retiradas de gaiola e levadas ao laboratório para dissecção e posterior armazenamento. O procedimento de dissecção foi o mesmo realizado com as moscas coletadas a campo. Das 7 moscas retiradas, no momento da dissecção pode ser observado que 3 apresentavam sangue em seu intestino. Isso se dá pelo fato de as moscas na colônia terem a sua disposição sangue de boi citratado, proveniente de abatedouro, para sua alimentação diária.

3.3 Extração de DNA

Para o procedimento de extração foi utilizado o protocolo de “salting out” descrito por Ayres 2002. Antes do procedimento de extração, as amostras que estavam armazenadas em RNAlater® a -20°C foram descongeladas, lavadas com 500 µL de PBS estéril e centrifugadas a 14.500 rpm por 3 minutos. Este procedimento foi repetido por três vezes.

3.3.1 Salting Out

Em cada amostra foram adicionados 500µL de Solução de lise (400mM NaCl; 20mM Tris-HCL pH8; 10mM EDTA e 1% de SDS) e 20µL de Proteinase K (150mg/µL). Os órgãos foram macerados com bastão de vidro o máximo possível. As amostras foram incubadas a 60°C em estufa por 18 horas.

Após o período de incubação foram adicionados 420µL de NaCL a 5M em cada amostra. Os microtubos foram homogeneizados em vortex por 30 segundos e logo em seguida centrifugados a 14.500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos (~550µL).

Um volume igual de isopropanol 100% foi adicionado em cada amostra. Os microtubos foram incubados durante uma hora a -20°C.

Passado o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 14.500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 300µL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas, porém desta vez por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados para secar por inversão.

Após a extração do DNA total, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), e todas as alíquotas foram diluídas e padronizadas a 30ng/µL para sua posterior utilização nas técnicas moleculares que foram avaliadas neste estudo.

3.4 Diagnóstico Molecular

3.4.1 PCR convencional para detecção de *Trypanosoma vivax*

As amostras foram analisadas para detecção de *Trypanosoma vivax* no aparelho Veriti™96-Well Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, MA, USA) utilizando os oligoiniciadores *TvPRAC-F* (5'CGCAAGTGGACCGTTCGCT3') e *TvPRAC-R* (5'ACGCGGGCGAACAGAAGTG3') que amplificam produtos de 239 pb somente para *T. vivax* (FIKRU et. al, 2014). O volume final da reação foi de 25µL, contendo: 1x PCR buffer (10mM Tris-Cl; pH=8,3; 50mM KCl) (Invitrogen®), 2,5mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂ 50 mM, Invitrogen®), 0,2mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100mM Invitrogen®), 0,8mM dos oligonucleotídeos iniciadores, 0,5U de Platinum *Taq* DNA

Polimerase (Invitrogen®) e 3 μ L de DNA total a 30ng/ μ L. Moscas de colônia (F1), mantida em nosso laboratório, foram utilizadas como controle negativo. Para controle positivo foi utilizado amostra cedida pelo Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) da UFRRJ. As condições de termociclagem foram as seguintes: 94°C por 15 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos; 68°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos e a extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. A corrida eletroforética foi de 35 minutos a 75 volts (5V/cm). Em seguida, os géis foram corados em brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP).

3.4.2 Semi Nested PCR para detecção de *Anaplasma marginale*

As mesmas amostras testadas pelo ensaio de PCR convencional também foram submetidas ao *nested*PCR. Na primeira reação da *n*PCR foram utilizados os oligoiniciadores msp5EF (5'GCATAGCCTCCCGTCTTC3') e msp5ER (5'TCCTCGCCTGCCCTCAGA3') e na segunda reação msp5intEF (5'TACACGTGCCCTACCGACTTA) e msp5ER (5'TCCTCGCCTGCCCTCAGA3') (DE ECHAIDE et al.,1998). Ambas as reações foram realizadas com volume final de 25 μ L, contendo: 1x PCR buffer, 3mM de MgCl₂, 0,4mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 0,4mM de cada oligoiniciador, 1U *Taq* Platinum. Moscas de colônia (F1), mantida em nosso laboratório, foram utilizadas como controle negativo. Para controle positivo foi utilizado DNA extraído de cultura de células de carrapato (IDE8) infectada por *Anaplasma marginale* (cepa AmRio1), gentilmente cedidas pela professora Claudia, do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ. As condições de termociclagem foram de 95°C por 3 minutos para temperatura inicial de desnaturação, 95°C por 30 segundos, 65°C por 58 segundos e 72°C por 30 segundos por 35 ciclos para ambas as reações e a extensão final a 72°C por 10 minutos. O volume de DNA utilizado na primeira reação foi de 3 μ L e o da segunda reação 1 μ L. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. A corrida eletroforética foi de 35 minutos a 75 volts (5V/cm). Em seguida, os géis foram corados em brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia).

3.4.3 Purificação dos produtos de PCR

Dois produtos da semi *nested*PCR observados em gel de eletroforese foram purificados a partir do Kit CleanSweep™ PCR Purification através da adição de 3 μ L de reagente CleanSweep™ a 15 μ L do produto obtido a partir da reação de PCR. A reação ocorreu em termociclador Eppendorf™ Mastercycler™ pro PCR System, inicialmente a temperatura de 37°C por 15 minutos (para hidrolisar iniciadores e desfosforilar dNTPS) e a 80°C por 15 minutos para inativar o reagente CleanSweep™.

3.4.4 Sequenciamento e alinhamento das sequências

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP) com a utilização do equipamento ABI 3730 DNA Analyser – Applied Biosystems/Perkin Elmer, CA, USA.

As qualidades das sequências foram analisadas no software CLC Main Workbench Version 7.2 (Qiagen: CLC bio) através da avaliação do eletroesferograma. Os “contigs” foram montados no mesmo programa e a similaridade de cada sequência foi obtida através de uma

busca inicial por meio da ferramenta BLAST disponível no endereço eletrônico <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

4. RESULTADOS

4.1 Detecção de *Trypanosoma vivax*

Foram utilizadas neste experimento 55 moscas coletadas no campo, sendo cada mosca dissecada e divida em intestino, peça bucal e carcaça do abdome com corpo gorduroso, obtendo assim um total de 165 amostras.

No ensaio molecular realizado, todas as amostras foram negativas para *Trypanosoma vivax*, exceto os controles positivos (Figura 7 e 8).

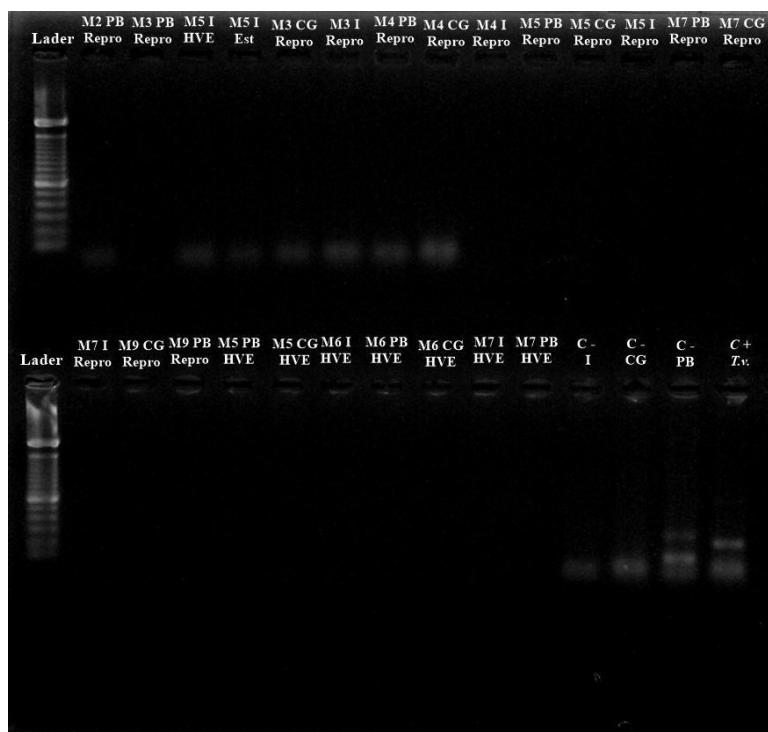


Figura 7. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de *Trypanosoma vivax* por PCR convencional de 13/12/2018. Poços 1 e 16 Ladder (marcador de peso molecular Invitrogen®); poços 2, 3, 8, 11, 14, 19, 20 e 23 peça bucal (PB) de *S. calcitrans* do HVE, Estação e Reprodução negativas para *T. vivax*; poços 4, 5, 7, 10, 13, 17, 22 e 25 intestino (I) de *S. calcitrans* do HVE, Estação e Reprodução negativos para *T. vivax*; poços 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) de *S. calcitrans* do HVE, Estação e Reprodução negativos para *T. vivax*; poços 27, 28 e 29 controle negativo (intestino, carcaça contendo corpo gorduroso e peça bucal de mosca F1 de colônia); poço 30 controle positivo de *T. vivax*.

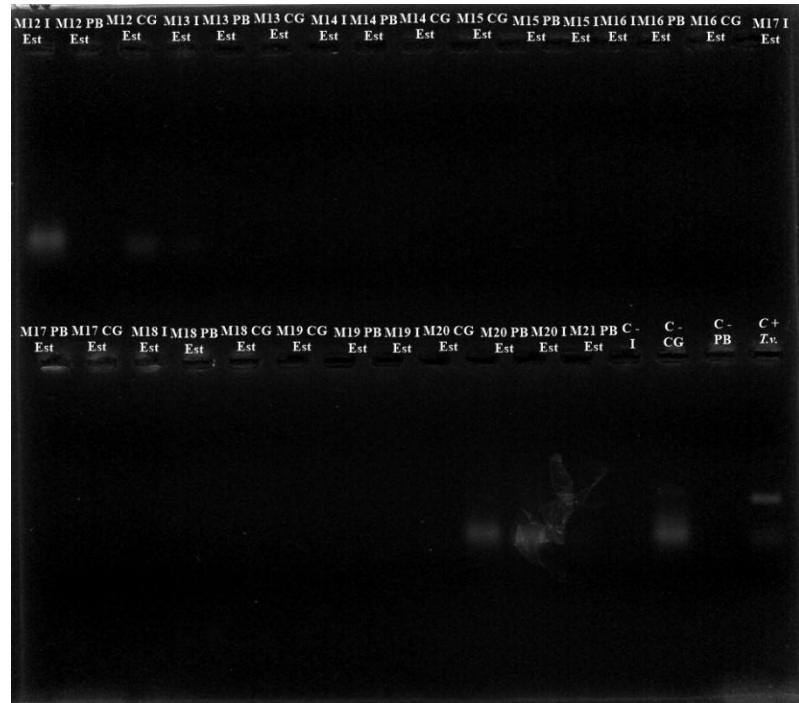


Figura 8. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação para *Trypanosoma vivax* por PCR convencional de 22/01/2019. Poços 1, 4, 7, 12, 13, 16, 19, 24 e 27 intestino (I) de *S. calcitrans* da Estação negativos para *T. vivax*; poços 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 e 28 peça bucal (PB) de *S. calcitrans* da Estação negativas para *T. vivax*; poços 3, 6, 9, 10, 15, 18, 21, 22 e 25 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) de *S. calcitrans* da Estação negativos para *T. vivax*; poços 29, 30 e 31 controle negativo (intestino, carcaça contendo corpo gorduroso e peça bucal de mosca F1 de colônia); poço 32 controle positivo de *T. vivax*.

4.2 Detecção de *Anaplasma marginale*

Para este experimento foram testadas 152 amostras. Do total de amostras avaliadas, 19 foram positivas para *Anaplasma marginale*, sendo 8 amostras de intestino, 6 de peça bucal e 5 de carcaça contendo corpo gorduroso, conforme indicado na tabela (Tabela 4) e nas figuras abaixo (Figuras 10, 11, 12 e 13).

. **Tabela 4.** Amostras positivas para *Anaplasma marginale*

Local de Coleta	Mosca	Órgão		
		Intestino (I)	Peça bucal (PB)	Carcaça com corpo gorduroso (CG)
Reprodução	M1	Positivo	Negativo	Negativo
Reprodução	M6	Positivo	Negativo	Negativo
Reprodução	M8	Positivo	Negativo	Negativo
Reprodução	M2	Positivo	Negativo	Negativo
Reprodução	M7	Negativo	Positivo	Negativo
Reprodução	M9	Negativo	Positivo	Negativo
Reprodução	M12	Negativo	Positivo	Negativo
HVE	M6	Positivo	Negativo	Positivo

HVE	M7	Positivo	Positivo	Negativo
HVE	M8	Positivo	Negativo	Negativo
HVE	M10	Negativo	Negativo	Positivo
Estação	M14	Negativo	Positivo	Negativo
Estação	M19	Negativo	Positivo	Positivo
Estação	M20	Positivo	Negativo	Positivo
Estação	M8	Negativo	Negativo	Positivo

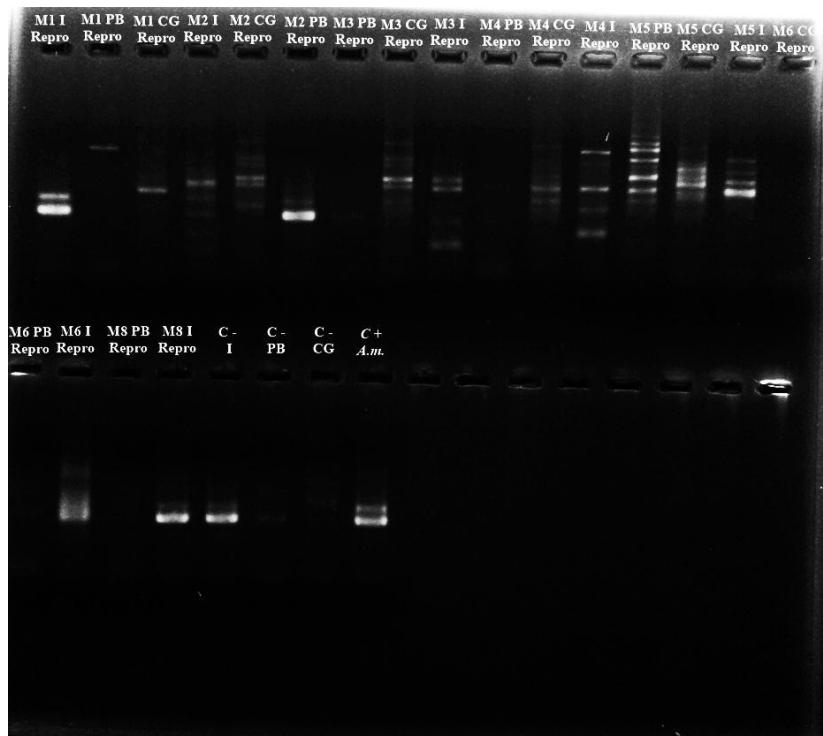


Figura 9. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de *Anaplasma marginale* por semi nested PCR de 31/01/2019. Poço 1 intestino (I) positivo para *A. marginale*; poço 6 peça bucal (PB) positiva para *A. marginale*; poço 18 intestino (I) positivo para *A. marginale*; poço 20 intestino (I) positivo para *A. marginale*; poços 2, 7, 10, 13, 17 e 19 peça bucal (PB) negativos para *A. marginale*; poços 3, 5, 8, 11, 14 e 16 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) negativos para *A. marginale*; poços 4, 9, 12 e 15 intestino (I) negativos para *A. marginale*; poços 21, 22 e 23 controle negativo (intestino, peça bucal e carcaça contendo corpo gorduroso de mosca F1 de colônia); poço 24 controle positivo de *A. marginale*. Todas as amostras de *S. calcitrans* testadas neste gel foram coletas na Reprodução.

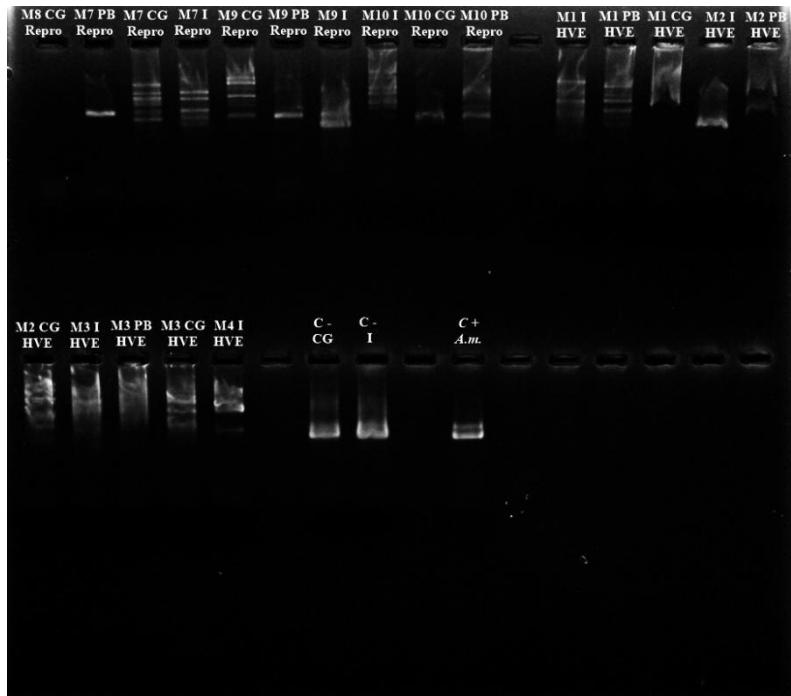


Figura 10. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de *Anaplasma marginale* por semi nested PCR de 06/02/2019. Das moscas coletadas na Reprodução: poço 2 peça bucal (PB) positiva para *A. marginale*; poço 5 corpo gorduroso (CG) positivo para *A. marginale*; poço 6 peça bucal (PB) positiva para *A. marginale*; poço 10 peça bucal (PB) positiva para *A. marginale*; poços 1, 3 e 9 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) negativos para *A. marginale*; 4, 7 e 8 intestino (I) negativos para *A. marginale*. Das moscas coletadas no HVE: poço 15 intestino (I) positivo para *A. marginale*; poço 21 intestino (I) positivo para *A. marginale*; poços 12, 15 e 18 intestino (I) negativos para *A. marginale*; poços 13, 16 e 19 peça bucal (PB) negativas para *A. marginale*; poços 14, 17 e 20 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) negativas para *A. marginale*; poços 11, 22 e 25 vazios; poços 23 e 24 controle negativo (carcaça contendo corpo gorduroso e intestino, de mosca F1 de colônia); poço 26 controle positivo de *A. marginale*.

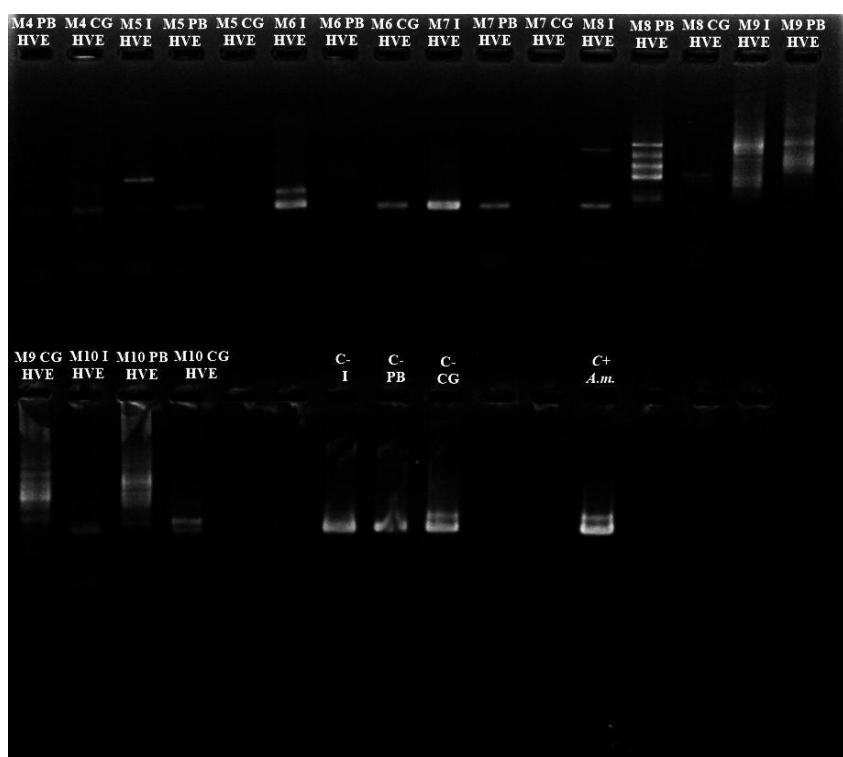


Figura 11. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Eídio com produtos da amplificação de msp5 de *Anaplasma marginale* por semi nested PCR de 07/02/2019. Poço 3 intestino (I) positivo para *A. marginale*; poço 13 peça bucal (PB) positiva para *A. marginale*; poço 20 carcaça com corpo gorduroso (CG) positivo para *A. marginale*; poços 1, 4, 7, 10, 16 e 19 peça bucal (PB) negativos para *A. marginale*; poços 2, 5, 8, 11, 14 e 17 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) negativos para *A. marginale*; poços 6, 9, 12, 15 e 18 intestino (I) negativos para *A. marginale*; poços 21, 22, 26 e 27 vazios; poços 23, 24 e 25 controle negativo (intestino, peça bucal e carcaça contendo corpo gorduroso de mosca F1 de colônia); poço 28 controle positivo de *A. marginale*. Todas as amostras de *S. calcitrans* testadas neste gel foram coletas no HVE.

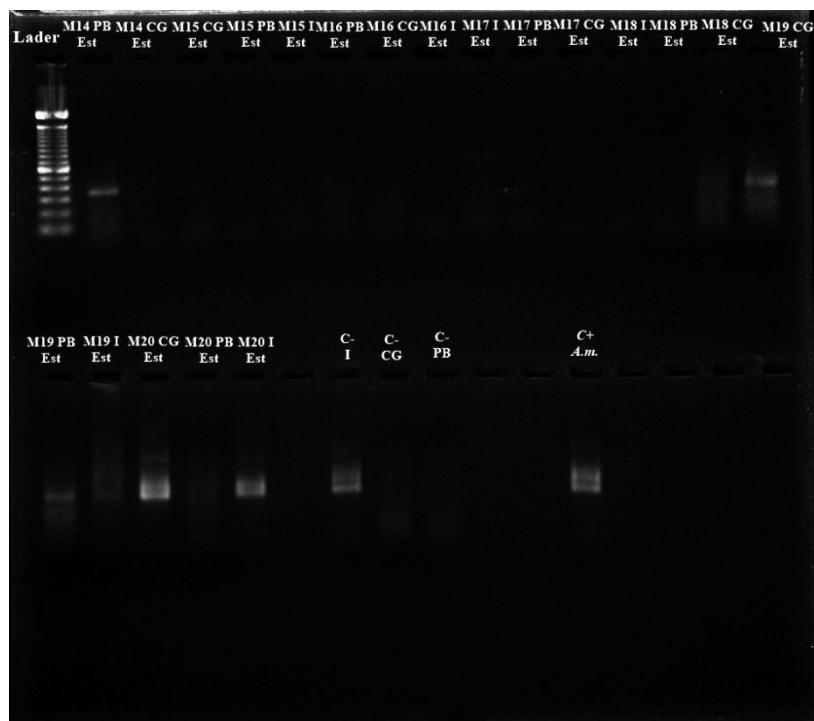


Figura 12. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Eídio com produtos da amplificação de msp5 de *Anaplasma marginale* por semi nested PCR de 20/02/2019. Poço 1 Ladder (marcador de peso molecular Invitrogen®); poço 2 peça bucal (PB) positiva para *A. marginale*; poço 16 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) positivo para *A. marginale*; poço 17 peça bucal (PB) positivo para *A. marginale*; poço 19 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) positivo para *A. marginale*; poço 20 intestino (I) positivo para *A. marginale*; poços 3, 4, 8, 12 e 15 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) negativos para *A. marginale*; poços 5, 7, 11, 14 e 20 peça bucal (PB) negativas para *A. marginale*; poços 6, 9, 10 e 18 intestino (I) negativos para *A. marginale*; poços 22, 26, 27, 29 ao 32 vazios; poços 23, 24 e 25 controle negativo (intestino, carcaça contendo corpo gorduroso e peça bucal de mosca F1 de colônia); poço 28 controle positivo de *A. marginale*. Todas as amostras de *S. calcitrans* testadas neste gel foram coletas na Estação.

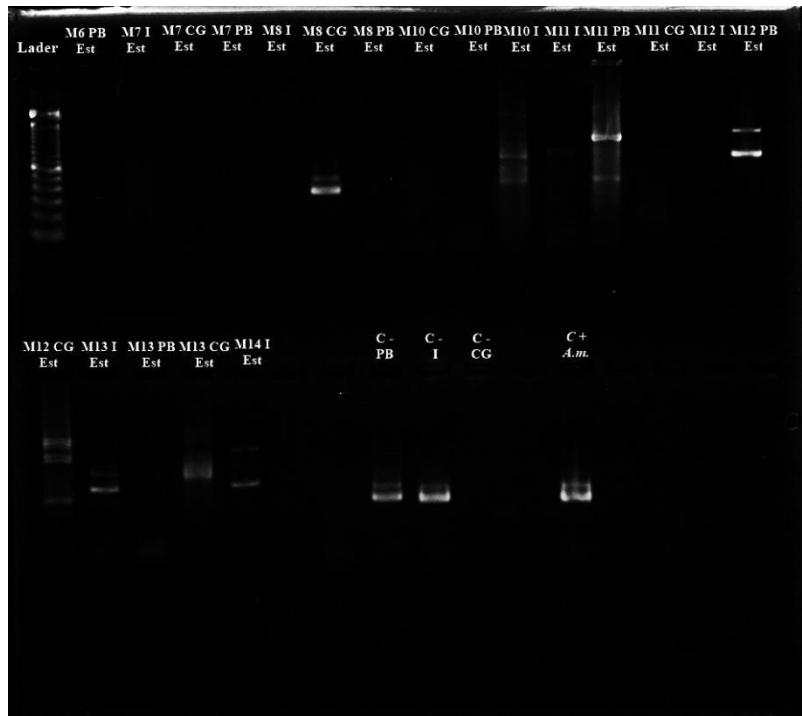


Figura 13. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de *Anaplasma marginale* por semi nested PCR de 18/02/2019. Poço 1 Ladder (marcador de peso molecular Invitrogen®); poço 7 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) positivo para *A. marginale*; poços 4, 9, 14, 17 e 20 carcaça contendo corpo gorduroso (CG) negativos para *A. marginale*; poços 2, 5, 8, 10, 13, 16 e 19 peça bucal (PB) negativas para *A. marginale*; poços 3, 6, 11, 15, 18 e 21 intestino (I) negativos para *A. marginale*; poços 22, 23 e 27 vazios; poços 24, 25 e 26 controle negativo (peça bucal, intestino e carcaça contendo corpo gorduroso de mosca F1 de colônia); poço 28 controle positivo de *A. marginale*. Todas as amostras de *S. calcitrans* testadas neste gel foram coletas na Estação

Para melhor visualização das amostras que amplificaram positivas, um novo gel foi feito, contendo apenas as amostras que haviam amplificado anteriormente. O tamanho esperado do fragmento era de 345 pb (Figura 14). A única amostra que se mostrou negativa para *Anaplasma marginale* nesta repetição foi a do poço 27, uma mosca F1, utilizada como “controle negativo”. Todas as demais puderam ser confirmadas positivas para *Anaplasma marginale*.

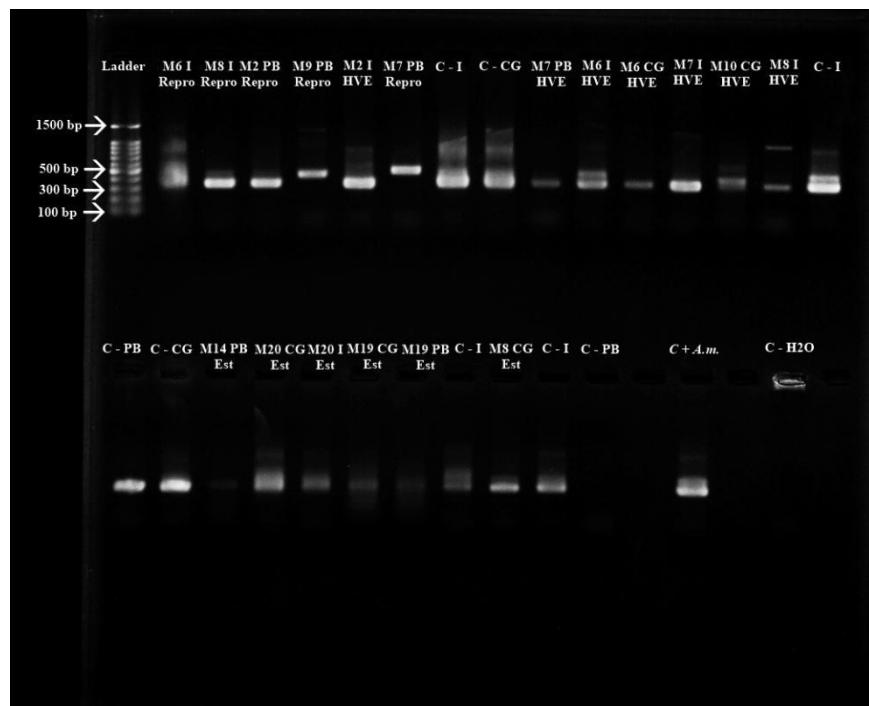


Figura 14. Gel de agarose 2% corado em Brometo de Etídio com produtos da amplificação de msp5 de *Anaplasma marginale* por semi nested PCR. Poço 1 Ladder (marcador de peso molecular Sinapse Biotecnologia); poço 2 M6 I, poço 3 M8 I, poço 4 M12 PB, poço 5 M9 PB de moscas coletadas na Reprodução; poço 6 M2 I de mosca coletada na Reprodução; poço 7 M7 PB de mosca coletada na Reprodução; poços 8 e 9 C - I e C - CG da PCR de 06/02; poço 10 M7 PB, poço 11 M6 I, poço 12 M6 CG, poço 13 M7 I, poço 14 M10 CG, poço 15 M8 I de moscas coletadas no HVE; poços 16 e 17 C - I e C - PB de PCR de 07/02; poço 19 M14 PB, poço 20 M20, poço 21 M20 I, poço 22 M19 CG, poço 23 M19 PB de moscas coletadas na Estação; poço 24 C - I de PCR de 20/02; poço 25 M8 CG de mosca coletada na estação; poços 26 e 27 C - I e C - PB da PCR de 18/02; poços 28, 30 e 32 vazios; poço 29 controle positivo *Anaplasma marginale*; poço 31 controle negativo H2O.

Conforme os experimentos foram realizados, observou-se que as moscas utilizadas para controle negativo, que foram moscas F1 com origem da nossa colônia, também apresentavam órgãos positivos para *Anaplasma marginale*, conforme demonstrado na tabela 4. Vale ressaltar que as moscas utilizadas como controle na reação para detecção de *A. marginale* foram as mesmas utilizadas também como controle na reação para detecção de *Trypanosoma vivax*.

Tabela 5. Controles F1 que amplificaram positivos para *Anaplasma marginale*.

Data do NestedPCR	Órgão			Presença ou ausência de sangue no intestino
	Intestino (I)	Peça bucal (PB)	Carcaça com corpo gorduroso (CG)	
31/01/2019	Positivo	Negativo	Negativo	Ausência
20/02/2019	Positivo	Negativo	Negativo	Ausência
13/02/2019	Positivo	Positivo	Positivo	Presença
06/02/2019	Positivo	Negativo	Positivo	Ausência
07/02/2019	Positivo	Positivo	Positivo	Ausência

18/02/2010

Positivo

Negativo

Negativo

Presença

Contudo, com base nos resultados, duas amostras foram enviadas para sequenciamento (Figuras 14 e 15) para que pudesse ser confirmado se o que estávamos detectando na análise molecular era de fato *Anaplasma marginale*. Foram selecionadas as amostras M1 I, mosca selvagem coletada na Reprodução e C – I controle negativo F1 utilizado na reação do dia 31/01/2019.

Sequences producing significant alignments:									
Select: All None Selected									
Alignments Download GenBank Graphics Distance from results									
Description									
				Max Score	Total Score	Query Cover			
				E value	Per. Ident	Accession			
■	Anaplasma marginale Msp5 gene, complete cds			833	833	97%	0.0	99.56%	AY527217.1
■	Anaplasma marginale isolate 183 major surface protein 5 (msp5) gene, partial cds			822	822	97%	0.0	99.12%	KX685372.1
■	Anaplasma marginale isolate 145 major surface protein 5 (msp5) gene, partial cds			806	806	97%	0.0	98.47%	KX685371.1
■	Anaplasma marginale isolate 109 major surface protein 5 (msp5) gene, partial cds			795	795	97%	0.0	98.03%	KX685370.1
■	Anaplasma marginale str. Florida, complete genome			789	789	97%	0.0	97.81%	CP001079.1
■	Anaplasma marginale clone IE89 major surface protein 5 (msp5) gene, partial cds			789	789	97%	0.0	97.81%	DO379973.1
■	Anaplasma marginale major surface protein 5 (MSP 5) gene, complete cds			789	789	97%	0.0	97.81%	M63392_1
■	Anaplasma marginale str. St. Maries, complete genome			784	784	97%	0.0	97.59%	CP000030.1
■	Anaplasma marginale strain Virginia major surface protein 5 gene, partial cds			758	758	96%	0.0	96.90%	KM624520.1
■	Anaplasma marginale strain Jaboticabal chromosome			739	739	97%	0.0	95.84%	CP023731.1
■	Anaplasma marginale strain Palmeira chromosome			739	739	97%	0.0	95.84%	CP023730.1
■	Anaplasma marginale isolate Dawn MSP5 gene, partial cds			739	739	97%	0.0	95.84%	MF480758.1
■	Anaplasma marginale isolate 12 major surface protein 5 (msp5) gene, partial cds			739	739	97%	0.0	95.84%	KX685369.1
■	Anaplasma marginale isolate E96 major surface protein 5 (Msp5) gene, partial cds			739	739	97%	0.0	95.84%	KU042081.1
■	Anaplasma marginale str. Dawn genome			739	739	97%	0.0	95.84%	CP006847.1

Figura 14. Relação de identidade obtida através do contig do sequenciamento da amostra M1 I. Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Download GenBank Graphics						
Anaplasma marginale Msp5 gene, complete cds						
Sequence ID: AY527217.1 Length: 633 Number of Matches: 1						
Range 1: 137 to 593 GenBank Graphics						
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Next Match	
833 bits(451)	0.0	455/457(99%)	0/457(0%)	Plus/Plus	Previous Match	
Query 1	GCATAGCCTCCCGTCTTCACAACAA	TTGGTTAATCACGAGGGGT	CACCGTCAGTAGCG	60		
Sbjct 137	GCATAGCCTCCCGTCTTCACAACAA	TTGGTTAATCACGAGGGGT	CACCGTCAGTAGCG	196		
Query 61	GCGATT	TCGCCGCAAGCACATGTTGGT	AAATTCCGGCTTCTCAGCCTGTAATTACACGT	120		
Sbjct 197	GCGATT	TCGCCGCAAGCACATGTTGGT	AAATTCCGGCTTCTCAGCCTGTAATTACACGT	256		
Query 121	GCCCTACCGAGTTAGCGATGGCT	CTCAGCCTTAAGTAA	ACTAGGCCGACATGCCGATA	180		
Sbjct 257	GCCCTACCGAGTTAGCGATGGCT	CTCAGCCTTAAGTAA	ACTAGGCCGACATGCCGATA	316		
Query 181	AGTTGCAAGTTGTTGATGTTG	CTATACTGTTGATCGA	AAAAATGACACCGTAGCCAAGCTTAAAG	240		
Sbjct 317	AGTTGCAAGTTGTTGATGTTG	CTATACTGTTGATCGA	AAAAATGACACCGTAGCCAAGCTTAAAG	376		
Query 241	AGTACACAAAGTCTTTGATGCG	GAGAATTCTAGATGCTCACAGCGAGGA	AGCAGACATAA	300		
Sbjct 377	AGTACACAAAGTCTTTGATGCG	GAGAATTCTAGATGCTCACAGCGAGGA	AGCAGACATAA	436		
Query 301	AGAGCGTGGTTGAAA	ACTACAAGGTGATGTTGGCG	ACAAAGCCAAGTGATGGTGATA	360		
Sbjct 437	AGAGCGTGGTTGAAA	ACTACAAGGTGATGTTGGCG	ACAAAGGAAGCCAAGTGATGGTGATA	496		
Query 361	TCGACCACTCGACTTTGATG	TCTCATCAATGAAA	AGGGCAGGTACGTTGGCATTTTG	420		
Sbjct 497	TCGACCACTCGACTTTGATG	TCTCATCAATGAAA	AGGGCAGGTACGTTGGCATTTTG	556		
Query 421	CGCCAGATTTAACGCGTCTG	GAGGGCCAAGGCGAGGA	457			
Sbjct 557	CGCCAGATTTAACGCGTCTG	GAGGGCCAAGGCGAGGA	593			

Figura 15. Identidade de 99,56% da amostra com *Anaplasma marginale* obtida através do contig do sequenciamento da amostra M1 I. Fonte: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

De acordo com os resultados obtidos no sequenciamento, a amostra M1 I, obteve 99,56% de identidade para *Anaplasma marginale*, tendo identidade similar para mais de 70 amostras de acordo com o Blast/NCBI.

5. DISCUSSÃO

As moscas do gênero *Stomoxys* são vetores mecânicos de patógenos presentes no sangue e na pele de seus hospedeiros, especialmente animais domésticos e ocasionalmente humanos. Na pecuária são vistos efeitos desta transmissão, através de lesão na pele, redução da ingestão de alimentos, estresse, perda de sangue, entre outros. Por conta das interrupções durante sua alimentação no hospedeiro, *Stomoxys* pode reiniciar sua alimentação em outro animal, facilitando assim a dinâmica de transmissão. Por ser uma mosca cosmopolita, *Stomoxys calcitrans* pode ter um impacto mundial e maior do que anteriormente se pensava na dinâmica da transmissão de patógenos em animais e humanos (BALDACCHINO et al., 2013).

Estudos relatam que em localidades onde se houve o registro epidemiológico da tripanossomíase bovina, havia a presença de moscas como *S.calcitrans* e *Tabanus* sp. e sugerem que estas podem estar proporcionando a disseminação das doenças nas propriedades com animais positivos (CUGLOVICI, D. A. et al.; CADOLI et al., 2012).

Serra Freire e Rezende em 1988 demonstraram experimentalmente que *Stomoxys calcitrans* tem a capacidade de se apresentar como vetor mecânico de *Trypanosoma vivax*. Para a realização deste trabalho eles utilizaram moscas de colônia e hospedeiros ovinos infectados com *T. vivax*, onde eles colocaram as moscas para se alimentar. Após a alimentação, eles dissecaram as moscas, procurando pelo parasita nas probóscides, glândulas salivares, intestino e cavidade celomática. Moscas que não tiveram a alimentação interrompida e moscas que tiveram interrupção da alimentação foram dissecadas, desde 1 minuto até 8 horas depois de completado o hematofagismo. O material removido dos órgãos e celoma era depositado em uma lâmina para leitura em microscópio. Considerando as seis repetições do experimento, observou-se que até 15 minutos pós-alimentação todas as moscas dissecadas continham formas tripomastigotas, e até 25 minutos praticamente 100% das moscas continham formas típicas de tripanossoma. Desse período em diante houve redução do somatório de moscas infectadas, chegando a apenas duas em seis nos últimos períodos do experimento.

Costa (2018) realizou um estudo onde diagnosticou que no estado do Rio de Janeiro há pelo menos 16 focos de tripanossomíase, sendo estes dados alarmantes para uma possível disseminação da doença no estado. No seu estudo foi observado que nos locais de registro da doença havia manejo de animais vindo de estados onde casos de tripanossomíase já tinham sido registrados, como Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso. Observou-se também o uso compartilhado de seringas e agulhas de ocitocina pode ser um fator de disseminação da doença. A presença de moscas hematófagas dos gêneros *Stomoxys* e *Tabanus* foi amplamente relatada em todas as propriedades do estudo.

Com base nestes estudos realizados anteriormente fomos analisar a capacidade vetorial de *Stomoxys calcitrans* para *Trypanosoma vivax*.

Nas análises realizadas através de PCR convencional não foi obtido moscas positivas para o parasito pesquisado. Uma hipótese levantada é que não há registros epidemiológicos da doença na área onde foram realizadas as coletas deste trabalho.

Baseado nos relatos de que *S. calcitrans* é vetor mecânico de uma enorme diversidade de patógenos, investigou-se também a presença de *Anaplasma marginale* em moscas do campo e detectamos amostras positivas em diferentes órgãos das moscas coletadas.

Os achados positivos para *A. marginale* em órgãos de *S. calcitrans* podem ser uma explicação para os casos reincidentes da doença nos animais. Nos EUA, América Central e do Sul e na África, algumas áreas são ausentes da presença do carapato, que é o vetor biológico, mas tem a presença da bactéria, sendo então a forma de transmissão mecânica por insetos hematófagos uma possível rota de disseminação (EWING, 1981; FOIL, 1989). Um fator que

também é importante se destacar, é que o carapato que é considerado vetor biológico da bactéria aqui no Brasil, o *Rhipicephalus (B)microplus* é um carapato monoxeno, que permanece em apenas um único hospedeiro, sendo apenas o macho capaz de migrar de um hospedeiro para outro, o que poderia favorecer a transmissão do patógeno de um bovino infectado para outro (KOCAN E DE LA FUENTE, 2003; KOCAN et al., 2010).

Bautista et al. (2018) realizaram um trabalho no México a fim de detectar por análise molecular a presença de *A. marginale* em *S. calcitrans*. As moscas foram coletadas em animais que estavam sem contato com carapatos há mais de 40 anos. Foram utilizados pools de moscas inteiras para a detecção da bactéria e eles obtiveram amostras positivas para *A. marginale*. Eles apenas demonstraram os resultados por amostras positivas em gel, após realização da reação de nested PCR. No nosso estudo, analisamos órgãos da mosca, ou seja, cada mosca teve 3 órgãos diferentes sendo analisados de forma individual, com o objetivo de entender onde de fato a bactéria poderia estar presente no inseto. Dos nossos resultados, obtivemos 19 amostras positivas, sendo 6 moscas com intestino positivo, 5 moscas com peça bucal positiva, 2 moscas com carcaça contendo corpo gorduroso positivo, 2 moscas com peça bucal e carcaça contendo corpo gorduroso positivo e 1 mosca com intestino e carcaça contendo corpo gorduroso positivo. No sequenciamento realizado, a partir do produto de PCR amplificado do intestino de uma das moscas positivas, obtivemos 99,56% de identidade para *Anaplasma marginale*. As análises foram realizadas dessa forma como um ponto de partida para entender a dinâmica que pode estar ocorrendo entre a bactéria e o inseto, despertando a curiosidades sobre se a presença da bactéria em diferentes órgãos é um reflexo da alimentação sanguínea apenas ou se a bactéria está colonizando a mosca. Vale ressaltar que moscas do campo, que foram as utilizadas neste estudo são de idades diferentes, tempos de alimentação e potencialmente tempos de infecção diferentes, fatores que não temos como precisar.

Sabe-se que a transmissão da bactéria por carapatos pode se dar de um estágio para outro, ou dentro de um mesmo estágio, enquanto que a transmissão transovariana de uma geração de carapatos para outra não foi descrita (KOCAN et al., 2010). Tanto bovinos quanto carapatos machos desenvolvem infecções persistentes por *A. marginale*, servindo assim como reservatórios para transmissão mecânica ou biológica do patógeno. Nos bovinos, o único local de infecção conhecido são os eritrócitos, porém nos carapatos a bactéria passa por um complexo ciclo de desenvolvimento, que começa com a infecção das células do intestino, onde irá ocorrer sua multiplicação. A transmissão para os bovinos ocorre a partir das glândulas salivares durante a alimentação e as proteínas de superfície (MSPs) de *Anaplasma marginale* desempenham um papel crucial na interação com as células do hospedeiro vertebrado (KOCAN et al., 2010).

Com bases nestes resultados obtidos, e alinhado com o fato de o laboratório ter uma colônia de *S. calcitrans* estabelecida, há perspectivas de trabalhos futuros para entender essa dinâmica da infecção por *A. marginale*, realizando alimentação artificial com sangue infectado com a bactéria, em moscas com a mesma idade, controlando os tempos de alimentação, para observar se ao longo do tempo a bactéria coloniza a mosca.

Com estes resultados, apresentando órgãos de *S. calcitrans* positivo para *A. marginale* em moscas coletadas a campo, levantou-se o questionamento e a curiosidade de se saber se as moscas seriam capazes carrear os patógenos de um ponto de coleta ao outro.

Lempereur et al. em 2018 realizaram um estudo sobre a capacidade de dispersão de *S. calcitrans* com técnicas de marcação-soltura-recaptura, mostrando que a mosca tem uma capacidade de voo que fica entre 150m a 300m. Os pontos de coleta deste trabalho ficam a distâncias maiores do que a relatada no estudo, sendo a menor distância, medida em linha reta a do HVE para a Estação, dando um total de 1.051,51m, o que então descartaria em um

primeiro momento a possibilidade das moscas estarem carreando o patógeno de um local para o outro.

Diversos trabalhos apontam como uma fonte de entrada de doenças em propriedades o manejo dos animais, como compra e venda. No caso dos pontos de estudo deste trabalho não há esta situação, mas acontecem alguns casos de entrada de animais de outras localidades, como por exemplo, no HVE que recebe animais para realização de procedimentos e tratamentos e na Reprodução, que pode receber animais da Bovino de Leite ou gado Sindi.

Duas possibilidades nos surgiram mediante os achados positivos em moscas de colônia, a primeira era de que poderia estar correndo uma transmissão transovariana, uma vez que as moscas F1 são descendentes de moscas que foram coletadas em campo, moscas selvagens. E a segunda é de que o sangue proveniente de abatedouro utilizado para a alimentação destas moscas na colônia poderia estar contaminado.

Na literatura há relatos de transmissão transovariana de patógenos em outras espécies de artrópodes, como por exemplo, o *Aedes aegypti*. Já foi comprovado que uma fêmea infectada com o vírus da dengue é capaz de realizar a transmissão para sua prole, favorecendo assim a expansão da doença (DIAS et al., 2010). Outro exemplo que tem sido amplamente estudado no que se trata de transmissão transovariana é o gênero *Wolbachia*. Fêmeas de diversos artrópodes transmitem a bactéria aos ovos, por meio da embriogênese (GUO, et al., 2018).

Não foi visto na literatura nenhum relato de transmissão transovariana em *Stomoxys* e como dito anteriormente, levantou-se a possibilidade de ter ocorrido a transmissão, mas também pode ser descartada a possibilidade de que o sangue oferecido para alimentar as moscas da colônia pudesse estar contaminado com a bactéria. Por não ter precisão do resultado, não se pode afirmar aqui se este é um caso de transmissão transovariana, mas desperta a curiosidade e o interesse em se estudar mais sobre este achado.

Estudos que busquem identificar a presença de patógenos em possíveis vetores mecânicos são de extrema importância, pois diversos trabalhos apontam as moscas como possíveis causadores de determinadas doenças, mas muito pouco se vê além de especulações por conta dos achados epidemiológicos para determinada área. Entender melhor a participação da mosca em uma possível dinâmica de transmissão pode ser crucial para se entender a epidemiologia das doenças e também para ajudar no combate a surtos.

6. CONCLUSÃO

- 1- A presença de *Trypanosoma vivax* não foi observada em órgãos de *Stomoxys calcitrans* coletadas no *campus* de Seropédica da UFRRJ;
- 2- A presença de *Anaplasma marginale* foi detectada em diferentes órgãos/ tecidos (partes bucais, intestinos e carcaça) de *S. calcitrans* coletadas em três pontos do *campus* de Seropédica da UFRRJ: Estação Experimental W. C. Neitz, Hospital Veterinário de Grandes Animais e Setor de Reprodução. A positividade de 34,5% dos indivíduos coletados foi demonstrada por amplificação gênica de sequência específica de gene da bactéria;
- 3- Esse é o primeiro relato de detecção de *A marginale* em *S. calcitrans* no Brasil;
- 4- A capacidade vetorial de *S. calcitrans* para como importante fator para a dinâmica epidemiológica de diferentes patógenos precisa melhor investigada em nosso país.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR-VALGODE, M.; WILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. Determinação das exigências térmicas de *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae), em condições de laboratório. *Determination of thermal requirements of Stomoxys calcitrans (L.) (Diptera, Muscidae), under laboratory conditions.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 87, n. unknown, p. 11-20, 1992.
- AGUIRRE, D. H. et al. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 405-407, 1994.
- BALDACCHINO, Frédéric et al. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. **Parasite**, v. 20, p. 26, 2013.
- BARROS, Antonio Thadeu M. et al. Surtos por *Stomoxys calcitrans* em gado de corte no Mato Grosso do Sul. **Pesq Vet Bras**, v. 30, n. 11, p. 945-52, 2010.
- BATISTA, Jael S. et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesq Vet Bras**, v. 28, n. 1, p. 63-9, 2008.
- BAUTISTA, Carlos R. et al. Molecular detection of *Anaplasma marginale* in stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) feeding on a tick-free bovine herd. **Veterinaria México**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2018.
- BITTENCOURT AJ. Avaliação de surtos e medidas de controle ambiental de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) na Região Sudeste do Brasil. **Rev Bras Med Vet** 2012; 34(S1): 73-82.
- BOWMAN, Dwight. **Parasitologia veterinária de Georgis**. Elsevier Health Sciences, 2010.
- BRITO, L. G. et al. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteras de interesse veterinário em laboratório. **Embrapa Rondônia. Documentos**, 2008.
- BUTLER, J. F. et al. Recontamination of food after feeding a 32P food source to biting Muscidae. **Journal of medical entomology**, v. 13, n. 4-5, p. 567-571, 1977.
- CADIOLI, Fabiano Antonio et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 118-124, 2012.
- CADIOLI, Fabiano Antonio et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 118-124, 2012.
- CAMPBELL, J. B. et al. Effects of stable flies (Diptera: Muscidae) on weight gain and feed efficiency of feedlot cattle. **Journal of Economic Entomology**, v. 80, n. 1, p. 117-119, 1987.
- CAVALCANTI, Milena Paiva Cavalcanti et al. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças nfecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL - Agropecuária brasileira sustenta o PIB do País, mas ainda enfrenta desafios – 2015. Disponível em:

<http://www.cnabrasil.org.br/noticias/agropecuaria-brasileira-sustenta-o-pib-do-pais-mas-ainda-enfrenta-desafios> Acesso em 31 de maio de 2017.

CORRÊA, Elaine C. et al. Abundância de *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) em diferentes subprodutos canavieiros. **Pesqui. vet. bras.**, v. 33, n. 11, p. 1303-1308, 2013.

COSTA, Renata Vitória Campos. Tese Trypanosoma vivax em bovinos no estado do Rio de Janeiro, 2018. 68f.: il.

CUGLOVICI, D. A. et al. Epidemiologic aspects of an outbreak of Trypanosomavivax in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 169, n. 3, p. 320-326, 2010.

CUGLOVICI, D. A. et al. Epidemiologic aspects of an outbreak of Trypanosomavivax in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 169, n. 3-4, p. 320-326, 2010.

DANTAS-TORRES, Filipe; CHOMEL, Bruno B.; OTRANTO, Domenico. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DE ECHAIDE, Susana Torioni et al. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

DE LA FUENTE, José et al. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal health research reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005.

DIAS, Larissa BA et al. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 143-152, 2010.

ERIKS, INGE S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2091-2096, 1993.

EWING, Sidney A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: **Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University, Mississippi State, Miss.** 1981. p. 395-423.

FERENC, S. A. et al. Mechanical transmission of South American Trypanosoma vivax by the tabanid *Cryptotylus unicolor*. In: **Proceedings of the 18th international congress of entomology, University of Florida: Gainesville**. 1988. p. 295.

FOIL, L. D. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitology today**, v. 5, n. 3, p. 88-96, 1989.

FOIL, Lane D.; GORHAM, J. Richard. Mechanical transmission of disease agents by arthropods. In: **Medical entomology**. Springer, Dordrecht, 2000. p. 461-514.

FREIRE, N. M. S.; REZENDE, AML de. ***Stomoxys calcitrans*, um vetor mecânico do Trypanosoma vivax no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor**. Tít. Serie: Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (**Brazil**).

GE, Nie-Lin et al. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults by using nonradioactive in situ hybridization and microscopy. **Journal of medical entomology**, v. 33, n. 6, p. 911-920, 1996.

GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. **Veterinary parasitology**, v. 110, n. 3, p. 171-180, 2003.

GILLES J, DAVID JF, LECOMTE P, TILLARD E. Relationships between chemical properties of larval media and development of two *Stomoxys* species (Diptera: Muscidae) from Reunion Island. *Environ Entomol* 2008; 37(1): 45-50.

GOMES, Sebastião Teixeira. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. **Restrições técnicas, econômicas e institucionais ao desenvolvimento da cadeia produtiva do leite no Brasil**. Brasília: MCT/CNPQ/PADCT, p. 19-35, 1999.

GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GRISI, Laerte et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

GUGLIELMONE, A.A., 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57, 109-119.

GUO, Yan et al. Vertical transmission of Wolbachia is associated with host vitellogenin in *Laodelphax striatellus*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

HERRERO MV, MONTES L, SANABRIA C, SÁNCHEZ A, HERNÁNDEZ R. Estudio inicial sobre la mosca de los establos *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), en la región del pacífico sur de Costa Rica. *Cienc Vet* 1989; 11(2-3): 11-14.

KAWAMURA, Takao. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica: eficiência de um teste. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 437-441, 2002.

KESSLER, Raul Henrique. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

King WV, Lenert LG. Outbreaks of *Stomoxys calcitrans* L. ("Dog flies") along Florida's Northwest coast. *Fla Entomol* 1936; 19(3): 33-41. <http://dx.doi.org/10.2307/3492310>.

KOCAN, K. M. et al. Demonstration of *Anaplasma marginale* Theiler in *Dermacentor variabilis* (Say) by ferritin-conjugated antibody technique. **American journal of veterinary research**, v. 41, n. 12, p. 1977-1981, 1980.

KOCAN, Katherine M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

KOCAN, Katherine M.; DE LA FUENTE, José. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. **Veterinary parasitology**, v. 112, n. 4, p. 295-305, 2003.

KOLLER, W. W. et al. Surtos da mosca-dos-estábulos, *Stomoxys calcitrans*, em Mato Grosso do Sul: novo problema para as cadeias produtivas da carne e sucroalcooleira?. **Embrapa Gado de Corte. Documentos**, 2009.

KUNZ, S. E. et al. CRC Handbook of Pest Management in Agriculture. 1991.

LEMPEREUR, Laetitia et al. Dispersal capacity of *Haematopota* spp. and *Stomoxys calcitrans* using a mark–release–recapture approach in Belgium. **Medical and veterinary entomology**, v. 32, n. 3, p. 298-303, 2018.

LOPES, Welber Daniel Zanetti et al. Aspectos da infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos experimentalmente infectados. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 2, p. 272-284, 2016.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Situação de doenças animais no Brasil 2016 – 2017. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/SituacaodedoencasanimaisnoBrasil2016_1.pdf Acesso em 02 de junho de 2017.

MARCONDES, Carlos Brisola. Entomologia médica e veterinária. In: **Entomologia médica e veterinária**. 2011.

MARTINS, Paulo do Carmo; GUILHOTO, Joaquim José Martins. Leite e derivados e a geração de emprego, renda e ICMS no contexto da economia brasileira. 2001.

MENDONÇA, Mitzi G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.

MONTEIRO, Silvia Gonzalez. Parasitologia na medicina veterinária. **São Paulo: Roca**, p. 301-305, 2011.

MORTARINO M, FRANCESCHI A, MANCIANTI F, BAZZOCCHI C, GENCHI C, BANDI C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parasitol** 46: 163-167, 2004

MULLENS, B. A. et al. Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. **Medical and veterinary entomology**, v. 20, n. 1, p. 122-137, 2006.

MÜLLER, G. C. et al. Attraction of *Stomoxys* sp. to various fruits and flowers in Mali. **Medical and veterinary entomology**, v. 26, n. 2, p. 178-187, 2012.

MUNDERLOH, Ulrike G. et al. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. **Veterinary microbiology**, v. 101, n. 1, p. 53-64, 2004.

ODENIRAN, P. O. et al. Molecular identification of bloodmeal sources and trypanosomes in *Glossina* spp., *Tabanus* spp. and *Stomoxys* spp. trapped on cattle farm settlements in southwest Nigeria. **Medical and veterinary entomology**, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) – One Health. Setembro, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>. Acesso em 26 de junho de 2019.

PAIVA, F. et al. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I-Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomo-patológico de rebanhos infectados. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2000.

PERUSKI, Anne Harwood; PERUSKI, Leonard F. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 2003.

PORTAL BRASIL – PIB agropecuário deve crescer 3,61% em 2017 – 2017. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/02/pib-agropecuario-deve-crescer-3-61-em-2017> Acesso em 31 de maio de 2017.

PORTELA-LINDOSO, Ana Angélica Bulcão. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 606-606, 2004.

PÖSCHL, Birgit et al. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 1, p. 56-60, 2010.

RAMABU, Solomon S. et al. Expression of Anaplasma marginale ankyrin repeat-containing proteins during infection of the mammalian host and tick vector. **Infection and immunity**, v. 79, n. 7, p. 2847-2855, 2011.

REVISTA BALDE BRANCO. Abril 2017. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/edicao-de-abril2017/>

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. Morphology and development of Anaplasma marginale in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 61, n. 1-2, p. 31-39, 1996.

RIBEIRO, M. F. et al. Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 47, n. 3, p. 297-304, 1995.

RICHEY, E.J., 1981. Bovine anaplasmosis. In: Howard, R.J. (Ed.), Current Veterinary Therapy Food Animal Practice. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 767-772.

RISTIC, Miodrag. Bovine anaplasmosis. **Parasitic protozoa**, v. 4, p. 235-249, 1977.

ROURA, X.; SANCHEZ, A.; FERRER, L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. **Veterinary Record**, v. 144, p. 262-263, 1999.

SAMISH M., PIPANO E. & HADANI A. 1993. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus* ticks in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 54(3): 411-414

SCHOFIELD, S.; TORR, S. J. A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. **Medical and veterinary entomology**, v. 16, n. 2, p. 177-185, 2002

SCOLES, Glen A. et al. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 4, p. 668-675, 2005.

SILVA, R. A. M. S. **Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax: biologia, diagnóstico e controle**. Embrapa Pantanal, 2002.

SIMMONS SW. Observations on the biology of stable fly in Florida. *J Econ Entomol* 1944; 37(5): 680-686.

STILLER D. & COAN M.E. 1995. Recent developments in elucidating tick vector relationship for anaplasmosis and equine piroplasmosis. *Vet. Parasitol.* 57(1-3):97-108.

SUNDSFJORD A, SIMONSEN GS, HALDORSEN BC, HAAHEIM H, HJELMEVOLL S, LITTAUER P, DAHL K H. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 112: 815-837, 2004.

TRAGANOS F. Flow cytometry: Principles and applications. *Cancer Invest* 2: 239-258, 1994.

VILELA, Duarte. A importância econômica, social e nutricional do leite. **Revista Batavo**, v. 111, 2001.

WENG, Li; RUBIN, Edward M.; BRISTOW, James. Application of sequence-based methods in human microbial ecology. **Genome research**, v. 16, n. 3, p. 316-322, 2006.

YANG, Samuel; ROTHMAN, Richard E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet infectious diseases**, v. 4, n. 6, p. 337-348, 2004.

ZINSSTAG, Jakob et al. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive veterinary medicine**, v. 101, n. 3-4, p. 148-156, 2011.

ZUMPT, Fritz et al. The Stomoxine biting flies of the world. Diptera: Muscidae. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. 1973.

8. ANEXOS

8.1 Tabela com valores da quantificação do DNA após extração.

Local de coleta:	Reprodução
Data Extração:	Quantificação (ng)
06/08/2018	
M1 - corpo gorduroso	56
M1 - intestino	118,4
M1 - peça bucal	56
M6 - peça bucal	32,2
M6 - intestino	33,8
M6 - corpo gorduroso	111,1
M8 - peça bucal	28
M8 - intestino	28
M8 - corpo gorduroso	5,7
Extração: 14/08/2018	
M2 - peça bucal	0,6
M2 - corpo gorduroso	1,1
M2 - intestino	1,4
M3 - peça bucal	9,4
M3 - corpo gorduroso	2,1
M3 - intestino	1,9
M4 - peça bucal	1,6
M4 - corpo gorduroso	2
M4 - intestino	1,4
M5 - peça bucal	1,4
M5 - corpo gorduroso	1,4
M5 - intestino	1,6
M7 - peça bucal	1,5
M7 - corpo gorduroso	2,6
M7 - intestino	2
M9 - peça bucal	1,8
M9 - corpo gorduroso	5,6
M9 - intestino	2,1
M10 - peça bucal	1,5
M10 - corpo gorduroso	12
M10 - intestino	1,3
Total mucas: 10	
Total amostras: 30	
Local de coleta:	HVE
Data Extração:	Quantificação (ng)
19/09/2018	
M1 - intestino	2,1
M1 - corpo gorduroso	2,2
M1 - peça bucal	0,9

M2 - intestino	7,2
M2 - corpo gorduroso	2,2
M2 - peça bucal	1,3
M3 - intestino	7,6
M3 - corpo gorduroso	1,3
M3 - peça bucal	2,1
M4 - intestino	1,1
M4 - corpo gorduroso	2,1
M4 - peça bucal	1
Extração: 27/11/2018	
M1 - intestino	1,5
M1 - peça bucal	1,1
M1 - corpo gorduroso	5,3
M2 - intestino	0,4
M2 - peça bucal	2,3/1,0
M2 - corpo gorduroso	3,8
M3 - intestino	1,4
M3 - peça bucal	1,4
M3 - corpo gorduroso	1,5
M4 - intestino	0,6
M4 - peça bucal	0,6/1,1
M4 - corpo gorduroso	2,3
M5 - intestino	1
M5 - peça bucal	0,3/1
M5 - corpo gorduroso	15
M6 - intestino	1,7
M6 - peça bucal	1,7
M6 - corpo gorduroso	3,8
M7 - intestino	6,4
M7 - peça bucal	0,3/1
M7 - corpo gorduroso	0,9/08
M8 - intestino	0,5
M8 - peça bucal	0,8
M8 - corpo gorduroso	1,1
M9 - intestino	0,7
M9 - peça bucal	1,2
M9 - corpo gorduroso	3,8
M10 - intestino	1
M10 - peça bucal	1,3
M10 - corpo gorduroso	3,3
M12 - intestino	1,1
M12 - peça bucal	0,9
M12 - corpo gorduroso	2
M13 - intestino	1

M13 - peça bucal	1,1
M13 - corpo gorduroso	2,8
Total moscas: 17	
Total amostras: 51	
Local de coleta:	Estação
Data Extração:	Quantificação (ng)
09/10/2018	
M1 - intestino	4,6
M1 - peça bucal	0,7
M1 - corpo gorduroso	7,6
M2 - intestino	1,9
M2 - peça bucal	1,5
M2 - corpo gorduroso	7,5
M3 - intestino	4
M3 - peça bucal	1,2
M3 - corpo gorduroso	2,9
M4 - intestino	0,8
M4 - peça bucal	2,9
M4 - corpo gorduroso	15,2
M5 - intestino	1,6
M5 - peça bucal	2,2
M5 - corpo gorduroso	2,8
Extração: 16/10/2018	
M6 - intestino	1,5
M6 - corpo gorduroso	2,3
M6 - peça bucal	0,4
M7 - intestino	20,9
M7 - corpo gorduroso	0,3
M7 - peça bucal	0,9
M8 - intestino	1,1
M8 - corpo gorduroso	76,4
M8 - peça bucal	0,6
M9 - intestino	232
M9 - corpo gorduroso	0,2
M9 - peça bucal	1,4
M10 - intestino	0,9
M10 - corpo gorduroso	0,1
M10 - peça bucal	0,3
Extração: 17/10/2018	
M11 - intestino	0,5
M11 - corpo gorduroso	1,1
M11 - peça bucal	0,4
M12 - intestino	0,9/2,9
M12 - corpo gorduroso	0,1/0,8
M12 - peça bucal	0,7

M13 - intestino	0,9
M13 - corpo gorduroso	16,1
M13 - peça bucal	0,1
M14 - intestino	0/0,1
M14 - corpo gorduroso	0/3,5
M14 - peça bucal	1,1
M15 - intestino	0,4
M15 - corpo gorduroso	1,7
M15 - peça bucal	1,1
M16 - intestino	0,7
M16 - corpo gorduroso	2,5
M16 - peça bucal	8,7
M17 - intestino	1,5
M17 - corpo gorduroso	1,2
M17 - peça bucal	0,5
M18 - intestino	3
M18 - corpo gorduroso	1,8
M18 - peça bucal	2,9
M19 - intestino	2,4
M19 - corpo gorduroso	2,2
M19 - peça bucal	1,2
M20 - intestino	3,1
M20 - corpo gorduroso	2,9
M20 - peça bucal	2,4
M21 - intestino	0,5
M21 - corpo gorduroso	1,2
M21 - peça bucal	1,4
Extração: 27/11/2018	
M1 - intestino	2,2
M1 - peça bucal	1,9
M1 - corpo gorduroso	2
M2 - intestino	1,3
M2 - peça bucal	4
M2 - corpo gorduroso	8
M3 - intestino	4,4
M3 - peça bucal	11,1
M3 - corpo gorduroso	4,8
M4 - intestino	1,1
M4 - peça bucal	1,1
M4 - corpo gorduroso	1,9
M5 - intestino	2
M5 - peça bucal	2,6
M5 - corpo gorduroso	1,9
M6 - intestino	1,1

M6 - peça bucal	0,9
M6 - corpo gorduroso	6,9
M7 - intestino	42,3
M7 - peça bucal	2,3
M7 - corpo gorduroso	1,7
Total moscas: 28	
Total amostras: 84	