

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

DISSERTAÇÃO

***Anaplasma marginale* em *Rhipicephalus microplus*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*: Detecção molecular e análise epidemiológica no carrapato**

**Laís Feliciano de Souza
2023**



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

Anaplasma marginale em Rhipicephalus microplus, Stomoxys calcitrans e Haematobia irritans: Detecção molecular e análise epidemiológica no carapato

LAÍS FELICIANO DE SOUZA

*Sob a orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos*

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Novembro de 2023

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

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

S719a Souza, Lais Feliciano de , 1998-
Anaplasma marginale em Rhipicephalus microplus,
Stomoxys calcitrans e Haematobia irritans: Detecção
molecular e análise epidemiológica no carapato / Lais
Feliciano de Souza. - Seropédica, 2023.
66 f.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias , 2023.

1. Anaplasmataceae. 2. Insetos hematófagos. 3.
Prevenção de Doenças . I. Santos, Huarrisson Azevedo,
1980-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 5383/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.076389/2023-91

Seropédica-RJ, 21 de novembro de 2023.

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

LAÍS FELICIANO DE SOUZA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/11/2023

(Assinado digitalmente em 27/11/2023 16:54)

CLAUDIA BEZERRA DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ####035#8

(Assinado digitalmente em 23/11/2023 08:42)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ####014#2

(Assinado digitalmente em 27/11/2023 13:18)

DANIEL DA SILVA GUEDES JUNIOR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.757-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **5383**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **21/11/2023** e o código de verificação: **7c831008d6**

*À minha Mãe e pai, que estão sempre comigo,
Ao meu avô, que me ensinou a contar com Deus,
E à minha família, amigos e ao meu namorado, que
são com quem eu conto.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar ao meu lado, me iluminando e me guiando em todos os momentos que precisei me fortalecer, por todo amor que recebi ao longo de toda vida.

Agradeço a melhor mãe, Bia, que sempre esteve ao meu lado, me mostrando força, coragem e muita garra para conquistar os objetivos com humildade e verdade, mulher sensacional, meu maior e mais lindo exemplo!

Ao meu querido avô Geraldo, obrigada por todos os ensinamentos, por cuidar de mim a tantos anos, sempre me incentivou a estudar, ser uma boa pessoa e acreditar nos planos de Deus.

Ao meu pai, Kiko, obrigada por me ensinar a sempre levantar a cabeça e recomeçar, independente dos obstáculos e por me dar apoio e incentivo.

Ao meu amor, Gustavo, que esteve ao meu lado, me incentivando a ter coragem, não fraquejar e seguir em frente sempre, sonha comigo o sonho de ser professora e muitos outros sonhos da vida!

Aos meus amores Laura e Benício, por serem combustível de amor e alegria, a toda a minha família, pelo apoio, pelo carinho e por vibrarem em cada conquista NOSSA, sem vocês eu nada seria!

Ao meu orientador Huarrisson Azevedo, pela orientação, por ter acreditado no meu potencial e por tudo que me ensinou dentro e fora do laboratório.

A todos os professores da UFRRJ, pelo carinho, pelos ensinamentos e por sempre compartilharem o melhor com os alunos.

A todos os meus AMIGOS da UFRRJ, espero conseguir retribuir com gratidão todo o carinho e bondade que tiveram comigo ao longo desses dois anos, agradeço a Deus por cada pessoa que tive o privilégio de conhecer, vocês me ensinaram muito, me apoiaram e estiveram comigo sempre que precisei, nossa amizade é sinônimo de doação, de amor e de sempre compartilhar o bem.

A todos os meus amigos e pessoas que me incentivaram e estiveram na torcida por mim!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo aprendizado recebido no curso.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

RESUMO

SOUZA, Laís Feliciano. *Anaplasma marginale* em *Rhipicephalus microplus*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*: Detecção molecular e análise epidemiológica no carrapato 2023. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Anaplasmosse bovina é uma enfermidade causada pela bactéria intracelular *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) que é amplamente distribuída e pode causar grandes prejuízos econômicos para os países onde a pecuária bovina é desenvolvida. Bovinos de todas as idades podem ser acometidos por esta enfermidade, podendo haver casos assintomáticos ou sintomáticos, levando a diminuição da produção de leite, abortos e até a morte. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos vetores de *A. marginale* no Brasil, mas outras formas de transmissão também são relatadas, incluindo a transmissão mecânica por moscas hematófagas e a transmissão iatrogênica. Dos fatores que contribuem para a dificuldade do controle da anaplasmosse bovina pode-se destacar as dúvidas em relação aos possíveis vetores, meios e mecanismos de transmissão. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença do DNA de *Anaplasma marginale* no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e em moscas *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* em propriedades de aptidão leiteira dos municípios de Seropédica e Paracambi do Estado do Rio de Janeiro. No laboratório os espécimes foram dissecados e os órgãos internos usados para extração de ácido desoxirribonucleico (DNA), avaliados por PCR em tempo real (qPCR) e nested PCR para análise molecular de *A. marginale* e sequenciadas para validação dos resultados. Com isso 73% (n=29/40) de *S. calcitrans*, 90% (n=26/29) de *H. irritans* e 45% (n=43/96) de *R. microplus* apresentaram resultados positivos. O presente trabalho relata a presença do DNA de *A. marginale* em glândula salivar de fêmeas de *R. microplus* como também em peças bucais de moscas das espécies *S. calcitrans* e *H. irritans*. Os resultados apresentados nesta pesquisa revelam uma alta frequência do DNA de *A. marginale* nas espécies de artrópodes investigados, ressaltando a importância de novos estudos de investigação experimental para comprovar a participação desses artrópodes no ciclo de transmissão. Dessa forma, será possível implementar medidas de estratégias para a prevenção da anaplasmosse bovina, levando em consideração as espécies de artrópodes vetores que participam da cadeia epidemiológica da doença em bovinos no Brasil e no mundo.

Palavras-chave: Anaplasmataceae, insetos hematófagos e prevenção de doenças.

ABSTRACT

SOUZA, Laís Feliciano. *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus microplus*, *Stomoxys calcitrans* and *Haematobia irritans*: Molecular detection and epidemiological analysis in ticks 2023. 65p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Bovine anaplasmosis is a disease caused by the intracellular bacterium *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) which is widely distributed and can cause major economic damage to countries where cattle farming is carried out. Cattle of all ages can be affected by this disease, and there may be asymptomatic or symptomatic cases, leading to reduced milk production, abortions and even death. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is one of the vectors of *A. marginale* in Brazil, but other forms of transmission have also been reported, including mechanical transmission by hematophagous flies and iatrogenic transmission. One of the factors contributing to the difficulty in controlling bovine anaplasmosis is the doubts regarding the possible vectors, means and mechanisms of transmission. The aim of this study was to investigate the presence of *Anaplasma marginale* DNA in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and in flies *Stomoxys calcitrans* and *Haematobia irritans* on dairy farms in the municipalities of Seropédica and Paracambi in the state of Rio de Janeiro. In the laboratory, the specimens were dissected and the internal organs used for deoxyribonucleic acid (DNA) extraction, evaluated by real-time PCR (qPCR) and nested PCR for molecular analysis of *A. marginale* and sequenced to validate the results. As a result, 73% (n=29/40) of *S. calcitrans*, 90% (n=26/29) of *H. irritans* and 45% (n=43/96) of *R. microplus* were positive. This study reports the presence of *A. marginale* DNA in the salivary glands of *R. microplus* females as well as in the mouthparts of *S. calcitrans* and *H. irritans* flies. The results presented in this study reveal a high frequency of *A. marginale* DNA in the arthropod species investigated, highlighting the importance of new experimental research studies to prove the participation of these arthropods in the transmission cycle. In this way, it will be possible to implement strategic measures for the prevention of bovine anaplasmosis, taking into account the species of arthropod vectors that participate in the epidemiological chain of the disease in cattle in Brazil and around the world.

Keywords: Anaplasmataceae, hematophagous insects and disease prevention.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem dorsal e imagem de aparelho bucal de *Stomoxys calcitrans*.

Figura 2. Ciclo biológico de *Stomoxys calcitrans*. As larvas eclodem em 24 horas e se desenvolvem, mudam para pupas e após 6 dias emergem os adultos, estes saem do hospedeiro para fazer postura em matéria orgânica.

Figura 3. Imagem dorsal e imagem de aparelho bucal de *Haematobia irritans*

Figura 4. Ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. As Fêmeas grávidas põem ovos no meio ambiente (1). Os ovos eclodem em larvas de três pares de patas (2). As larvas se fixam ao hospedeiro e depois de duas mudas (larva-ninfa e ninfa-adulto), se desenvolvem em adultos. As fêmeas caem do hospedeiro para realização da postura (4). Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2023).

Figura 5. Imagem da adaptação atual do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de acordo com o modelo de nicho ecológico, sob condições ambientais.

Figura 6. Ciclo do desenvolvimento de *Anaplasma marginale* em bovinos e carapatos. Adaptado de Kocan et al., (2003).

Figura 7. Mapa do Estado do Rio de Janeiro e os Municípios de Seropédica e Paracambi onde foram realizadas a captura de *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans* e *Rhipicephalus microplus*.

Figura 8. Imagem de *Stomoxys calcitrans* em ato de repasto (alimentação), perfurando a pele de hospedeiro bovino em momento de coleta realizada a campo. Fonte: acervo pessoal.

Figura 09. Imagem de órgãos de *Haematobia irritans* após dissecção. A: Carcaça contendo corpo gorduroso. B: Probóscida. C: Intestino. Fonte: Acervo pessoal.

Figura 10. Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e distância evolutiva (diagonal superior) de fragmentos de aproximadamente 345 pb do gene msp5 entre as sequências de *Haematobia irritans*, *Stomoys calcitrans* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers e sonda da reação de qPCR para *Anaplasma marginale* (Carelli et al., 2007).

Tabela 2. Amostras positivas para *Anaplasma marginale* detectadas por nPCR em *Rhipicephalus microplus*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* capturados em propriedade de gado de leite nos municípios de Seropédica e Paracambi-RJ.

Tabela 3. Análise bivariada das variáveis epidemiológicas ambientais na presença de DNA de *Anaplasma marginale* em glândulas salivares de *Rhipicephalus microplus* coletados em fazendas de gado de leite no estado do Rio de Janeiro.

Tabela 4. Modelo epidemiológico de predição da infecção por *Anaplasma marginale* em *Rhipicephalus microplus* coletado em fazendas de gado de leite, obtido através da análise de regressão logística múltipla.

LISTA DE ABREVIASÕES E SIGLAS

cPCR Reação da Cadeia de Polimerase convencional

DNA Ácido desoxirribonucleico

ELISA Teste indireto de imunoabsorção enzimática

EUA Estados Unidos

g Força da gravidade

gltA Gene de re *gltA*

groEL Proteína Chaperonina

IFI Imunofluorescência indireta

MSPs Principais proteínas de superfície

PCR Reação da Cadeia de Polimerase

rpm Rotações por minuto

rRNA 16S RNA ribossômico 16S

UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Dípteros hematófagos | 3 |
| 2.1.1 <i>Stomoxys calcitrans</i> como vetor de patógenos e importância médica veterinária | 6 |
| 2.1.2 <i>Haematobia irritans</i> (Linnaeus, 1758) | 7 |
| 2.1.3 <i>Haematobia irritans</i> como vetor de patógenos e importância médica veterinária | 9 |
| 2.1.4 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1887) | 9 |
| 2.1.5 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> como Vetor de Agentes Patogênicos | 11 |
| 2.2 <i>Anaplasma marginale</i> (Theiler, 1910) | 12 |
| 2.3 Diagnóstico molecular | 16 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| 3.1. Locais de coleta | 18 |
| 3.2. Questionários | 19 |
| 3.3. Coleta, identificação de dissecção de moscas | 20 |
| 3.5.1. Protocolo modificado para extração de DNA a partir da glândula salivar de <i>Rhipicephalus microplus</i> | 22 |
| 3.5.2. Protocolo modificado para extração de DNA de <i>Stomoxys calcitrans</i> e <i>Haematobia irritans</i> | 23 |
| 3.6. PCR em tempo real para detecção de <i>Anaplasma marginale</i> em extratos de DNA de <i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> e <i>Haematobia irritans</i> | 24 |
| 3.7. Nested PCR para detecção de <i>Anaplasma marginale</i> em extratos de DNA de <i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>Stomoxys calcitrans</i> e <i>Haematobia irritans</i> | 25 |
| 3.8. Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento e alinhamento das sequências | 25 |
| 3.9. Análise estatística | 26 |
| 4. RESULTADOS | 27 |
| 5. DISCUSSÃO | 35 |
| 6. CONCLUSÃO | 39 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 40 |

1. INTRODUÇÃO

Anaplasmosse bovina é uma enfermidade causada pela bactéria intracelular *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), e possui ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos econômicos para pecuária (KOCAN et al., 2004; 2010; TURRUELA et al., 2020).

Bovinos de todas as idades podem ser infectados e permanecem portadores permanentes com sinais clínicos variando de assintomáticos para casos mais graves e sintomas como a febre, anemia, abortos, perdas de peso, diminuição na produção de leite ou morte (RIBEIRO PASSOS, 2002; AUBRY E GEALE, 2011; CANGUSSU et al., 2018). O carapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um dos vetores de *A. marginale* no Brasil, ocorrendo a transmissão de forma transtestadial e intraestadialmente, a morbidade da anaplasmosse está relacionada principalmente a flutuação da população do vetor (UILLENBERG 1970; SAMISH et al. 1993; AGUIRRE et al. 1994).

No entanto, outras formas também são relatadas, incluindo a transmissão mecânica por meio de moscas hematófagas principalmente através dos gêneros *Stomoxys* e tabanídeos. Partículas infectantes são transferidas através das partes bucais dos dípteros, levando de um animal para outro, com diferentes graus de sucesso (FOIL et al., 1989; SCOLES et al., 2005; KIKUGAWA et al., 2009; SANTOS et al., 2013). Stiling et al. (1993) mencionou em seu estudo a preocupação com *Haematobia irritans* em relação a transmissão de vários patógenos, como Carbúnculo Hemático, Leucose, o helminto *Stephanofilaria sp* e anaplasmosse. Em Araújo et al. (2021), relatou a presença de *Anaplasma marginale* em órgãos de *Stomoxys calcitrans* coletadas no Município de Seropédica- RJ.

Há também a transmissão iatrogênica da bactéria, através do uso de instrumentação cirúrgica ou agulhas contaminadas com o patógeno durante uso coletivo destes materiais, em procedimentos como descorna, castração e vacinação, auxiliando assim na disseminação do agente patogênico nas propriedades rurais (SANTOS et al., 2017; BRITO et al., 2019; FERREIRA et al., 2019; HERRERA et al., 2019; BAHIA et al., 2020).

Trabalhos apontam a imunização dos rebanhos, com vacinas recombinantes baseadas em proteínas de superfície de *A. marginale*, para preservar os bovinos das infecções pela bactéria (CROSBY et al., 2015; DERINGER et al., 2018). Um dos

obstáculos para a elaboração de uma vacina eficaz contra a enfermidade é a existência de muitas variantes de bactéria (DERINGER et al., 2017; CANGUSSU et al., 2018). Outro empecilho para o controle de *A. marginale* é o envolvimento de muitos componentes como a genética do rebanho, clima, manejo sanitário dos animais e disponibilidade de vetores. Estes fatores podem ser determinantes para caracterizar a situação enzoótica e para avaliar os riscos aos rebanhos. De acordo com Uilenberg (1992) a suscetibilidade dos bovinos em contrair doenças é um fator tão importante quanto à presença de vetores.

Portanto, a realização de estudos para que se possa entender melhor o papel das moscas como possíveis vetores é de grande importância. Estes estudos podem então esclarecer os questionamentos sobre a importância epidemiologia desses artrópodes na transmissão de *A. marginale*, principalmente em locais onde a população desses dípteros é abundante em rebanhos de gado de leite. No estado do Rio de Janeiro não há muitos estudos sobre a epidemiologia e importância de *Anaplasma marginale* na dinâmica de transmissão por *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans*. Com isto, este trabalho teve o objetivo de detectar a presença do DNA *Anaplasma marginale* em peças bucais e intestinos de *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* e em glândulas salivares de fêmeas de carapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando as técnicas de qPCR, nPCR e sequenciamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dípteros hematófagos

2.1.1 *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758)

O gênero *Stomoxys* possui 18 espécies, sendo *Stomoxys calcitrans* (Figura A e B), popularmente denominada como “mosca – dos – estábulos” a espécie mais comum, apresentando distribuição mundial e com mais relatos em regiões de clima temperado. Se trata de um ectoparasita, vetor mecânico com aparelho bucal picador-sugador (Figura 1) (MUENWORN et al., 2010; BALDACCHINO et al., 2013; SCULLY et al., 2017) e são responsáveis por problemas de bem-estar animal e econômicos ao redor de todo o mundo (BALDACCHINO et al., 2013).

Reino: Animalia LINNAEUS, 1758.

Sub Reino: Bilateria HATSCHEK, 1888.

Filo: Arthropoda SIEBOLD, 1848.

Classe: Insecta LINNAEUS, 1758.

Ordem: Diptera LINNAEUS, 1758.

Família: Muscidae LATREILLE, 1802.

Gênero: *Stomoxys* GEOFFROY, 1762.

Espécie: *Stomoxys calcitrans* LINNAEUS, 1758.



Figura 1 (A e B): Imagem dorsal e imagem de aparelho bucal de *Stomoxys calcitrans*.

Disponível em: DISCOVERLIFE 2023.

A fêmea e o macho são hematófagos e constantemente ingerem uma quantidade pequena de sangue ao longo do dia (CORTINAS E JONES, 2006; BOWMAN, 2010; TAYLOR et al., 2017).

O ciclo holometábolo (Figura 3) apresenta as fases de ovo, larva de primeiro estágio (L1), larva de segundo estágio (L2), larva de terceiro estágio (L3), pupa e adultos sendo a temperatura ideal para o andamento e crescimento da mosca de aproximadamente 25-27°C. Mediante esta temperatura, após a postura, em torno de dois a três dias ocorre a eclosão da larva L1. Esta irá sofrer duas ecdises até se tornar L3, um processo que pode levar de dez a treze dias para seu completo desenvolvimento. A larva L3 originará a pupa e após seis dias dará origem a uma mosca adulta. O ciclo se torna completo em um período de duas a quatro semanas em locais com a temperatura favorável (AGUIARVALGODE; MILWARD-DE-AZEVEDO, 1992; TAYLOR et al., 2017).

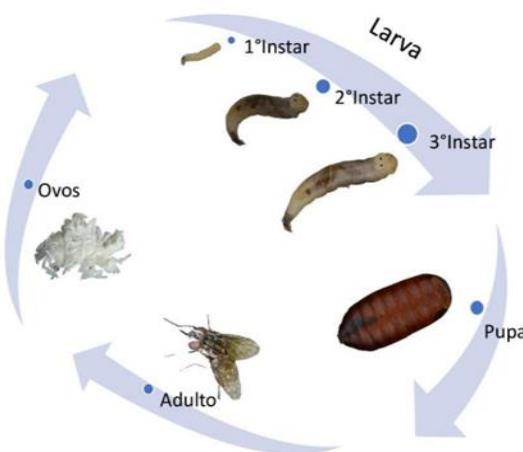


Figura 2. Ciclo biológico de *Stomoxys calcitrans*. As larvas eclodem em 24 horas e se desenvolvem, mudam para pupas e após 6 dias emergem os adultos, estes saem do hospedeiro para fazer postura em matéria orgânica. **Fonte:** Rodrigues (2023).

A reprodução de *Stomoxys* está ligada à decomposição da matéria vegetal, suas larvas podem crescer em diversos substratos (CORRÊA et al., 2013; COOK et al., 2018). Fezes frescas misturadas aos resíduos de ração, urina e outros tipos de materiais orgânicos podem fornecer condições adequadas para o crescimento de moscas (HOGSETTE et al., 1987; BROCE et al., 2005; COOK et al., 2018; GILLES et al., 2008; BITTENCOURT, 2012). Essas situações permitem a manutenção da comunidade local de moscas, ocasionando maiores infestações nas propriedades. Estudos foram

realizados envolvendo surtos referentes à mosca dos estábulos (BARROS et al., 2010; ODA; ARANTES 2010; KASSAB et al., 2012). Estes autores reforçaram que os problemas ligados a *S. calcitrans* ocorrem por conta do fornecimento de ambientes propícios ao desenvolvimento de suas fases imaturas.

A expansão da indústria sucroalcooleira em áreas de pecuária tem sido recentemente relacionadas ao aumento da população de *S. calcitrans* nas propriedades BARROS et al., 2010). A capacidade de voo da mosca associado à palhada da cana-de-açúcar que fica ao solo após a colheita, bem como o vinhoto da cana-de-açúcar, podem criar condições favoráveis para o aumento da população destes dípteros (BAILEY et al., 1973; HOGSETTE; RUFF, 1985), principalmente se mal manejados no uso agrícola (VITTI; LUZ 2008).

Stomoxys calcitrans dispõe muitos hospedeiros, especialmente os mamíferos e está relacionada no mundo todo a animais selvagens e ao gado (KHALIFA et al., 2022). Os bovinos são os animais mais acometidos pela picada da mosca dos estábulos, e desta forma, atuam em um papel direto na epidemiologia de enfermidades que podem ser transmitidas por elas (SHOWLER et al., 2015; RODRIGUES 2023).

A picada da mosca é dolorosa, causa prurido, incomodo por efeitos tóxicos da saliva e perda de sangue. Infestações acarretam perdas significativas na produção, resultando em importantes perdas econômicas para indústria, em torno de US\$ 335 milhões por ano (BALDACCHINO et al., 2013; GRISI et al., 2014).

É importante evidenciar que os prejuízos econômicos são pertinentes quando há surto, devido a inquietação do gado, diminuição na alimentação, o que choca diretamente a produção de leite e carne (TAYLOR et al., 2017; RODRIGUES 2023).

No Brasil, a sazonalidade de *Stomoxys calcitrans* apresenta picos populacionais. Durante a estação de chuvas ocorre um aumento do número de moscas no país, de forma mais precisa, no início da estação (RODRÍGUEZ-BATISTA et al., 2005; DOMINGHETTI et al., 2015). Sendo assim, em condições naturais há situações de menor ou maior ocorrência da mosca em função ao clima local, época do ano, fatores climáticos e região (BITTENCOURT, MOYA-BORJA, 2000; RODRÍGUEZ-BATISTA et al., 2005). Entretanto, propriedades que utilizam o manejo agropecuário, manejo de resíduos e de subprodutos, são beneficiadas, dado que essas práticas são fatores importantes para o controle da mosca (DOMINGHETTI, 2017).

2.1.2 *Stomoxys calcitrans* como vetor de patógenos e importância médica veterinária

A presença desses organismos no ambiente pode acarretar prejuízos diretos e indiretos aos animais e estes são mais difíceis de se calcular. Um exemplo de prejuízo direto, seria a picada que causa um processo doloroso e pruriginoso, e indireto quando ocasiona a inoculação de algum patógeno ao hospedeiro por meio da picada do ectoparasita. *Stomoxys calcitrans* atua como vetor mecânico de diversos agentes patogênicos, como por exemplo vírus, protozoários, helmintos e bactérias (BALDACCHINO, et al., 2013).

Este ectoparasita pode carregar relevantes patógenos, dentre eles, o vírus da febre do Nilo Ocidental (DOYLE et al., 2011), vírus da peste suína africana (MELLOR et al., 1987), vírus da anemia infecciosa equina (HAWKINS et al., 1973; FOIL et al., 1983; GREEN et al., 1996) *Anaplasma marginale* (SCOLES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011), *Trypanosoma vivax* (MIHOK et al., 1995; CUGLOVICI et al., 2010), *Habronema microstoma* (TRAVERSA et al., 2008) entre outros (BALDACCHINO, et al., 2013).

Segundo Araújo et al. (2021) em um trabalho realizado no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro constatou, pela primeira vez no estado do Rio de Janeiro, exemplares de *S. calcitrans* que possuíam material genético de *Anaplasma marginale*, contribuindo com estudos sobre a dinâmica da transmissão do patógeno.

A transmissão mecânica é o modo mais simples de transmissão e é considerado um dos mais importantes feitos indiretos dos insetos, pois esta forma de transmissão pode ocorrer por meio da contaminação da peça bucal ou da regurgitação do conteúdo do sistema digestivo (MORDOMO et al., 1977; BALDACCHINO, et al., 2013).

2.1.3 *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758)

A mosca dos chifres (Figura 4), *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758), em 1830 foi reconhecida como um problema na França, após a Guerra Civil norte-americana foram importados muitos bovinos da Europa e com isso a mosca-dos-chifres foi conquistando novos territórios, por volta de 1884 e 1886 nos EUA.

Em aproximadamente 12 anos a mosca já havia ocupado a maior parte dos Estados Unidos e Havaí. Exportações no mesmo período fizeram com que chegassem ao Canadá e nas ilhas do Caribe. Chegou à América do Sul, sendo reconhecida na Venezuela e Colômbia em 1937, de acordo com a Delegacia Federal de Agricultura de Roraima, *Haematobia irritans*, apareceu no território entre 1976 e 1977, provavelmente vinda da Guiana, mas somente em 1980, foi definitivamente identificada (VALÉRIO e GUIMARÃES 1983). O deslocamento de bovinos por meio do rio Amazonas e a passagem de veículos sujos com fezes ao longo do Brasil fez com que a mosca alcançasse todo o território nacional. Após algumas tentativas de controle como a importação do besouro africano e a criação de um grupo de peritos nacionais para estudar o controle e a expansão da mosca, em março de 1990 foi lançado o programa nacional de controle da mosca-dos-chifres e passados dez anos depois do primeiro alerta sobre o perigo, a mosca já havia invadido boa parte do Brasil.

É conhecida comumente como mosca-dos-chifres e tem como hospedeiro preferencial os bovinos (CASTIGLIONI; BICUDO, 2005). Porém, em época de grande infestação no campo ou na ausência deste animal, a mosca ataca outras espécies, como os ovinos e os equinos (ALMEIDA et al., 2010).

Reino: Animalia LINNAEUS, 1758.

Sub Reino: Bilateria HATSCHEK, 1888.

Filo: Arthropoda SIEBOLD, 1848.

Classe: Insecta LINNAEUS, 1758.

Ordem: Diptera LINNAEUS, 1758.

Família: Muscidae LATREILLE, 1802.

Gênero: *Haematobia* LEPELETIER, E SERVILE, 1828.

Espécie: *Haematobia irritans* LINNAEUS, 1758.



Figura 3. Imagem dorsal e imagem de aparelho bucal de *Haematobia irritans*

Disponível em: Departamento de entomologia da Universidade do Nebraska. Acesso em 11/10/2023.

A duração do ciclo biológico pode ser de até 16 dias dependendo da temperatura e das condições ambientais de cada oviposição. Uma fêmea pode produzir de 100 a 200 ovos. As moscas saem do hospedeiro vertebrado para fazer postura em fezes frescas de bovino e, uma vez no esterco, os ovos podem eclodir em um período de 20 a 24 horas em uma temperatura entre 24 °C a 27 °C. Ocorrem três estágios larvais (L1, L2 e L3) que se desenvolvem quase que exclusivamente nas fezes, com duração de 4 a 8 dias para o estágio de pupa. O processo de pupa acontece dentro ou próximo ao bolo fecal. A sobrevivência dentro do bolo fecal depende das larvas e pupas resistirem a inúmeros fatores como: variação do conteúdo nutricional, variação de temperatura e umidade, competição com outros insetos, efeito de predadores e parasitóides (TAYLOR et al., 2017).

2.1.4 *Haematobia irritans* como vetor de patógenos e importância médica veterinária

No Brasil, a presença desta mosca foi registrada pela primeira vez em Roraima entre os anos de 1977 e 1978. Atualmente encontra-se dispersa em todos os estados do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. O impacto de *H. irritans* no rebanho bovino varia em relação ao clima e técnicas de manejo (OYARZÚN, 2008).

No Brasil, a estimativa do prejuízo econômico causados à pecuária já chegou em cerca de U\$ 865 milhões por ano (BIANCHINI et al., 2006). Por possuir uma picada dolorosa, os animais apresentam maior estresse, ocorre queda na produção de leite e diminuição no ganho de peso (OLIVEIRA, 2019; KELLDRIN, 2021). É responsável por transmitir *Stenofilaria stilesi*, nematódeo parasita de pele de boi, pode causar dermatite ulcerativa periobital ou ventral em cavalos, esta lesão pode ser infestada pelo nematódeo *Habronema spp.* além de veicular de ovos de *D. hominis*.

2.1.5 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887)

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um carapato de ciclo biológico em um único hospedeiro, os bovinos, e se destaca como o vetor mais importante de *Anaplasma marginale*. Estão distribuídos em áreas tropicais e subtropicais de alta produção bovina (DE LA FOURNIÈRE et al., 2023). É o carapato com maior importância mundial no quesito transmissão de doenças parasitárias bovinas, mas já foi relatada relação com búfalos, cavalos, burros, cães, veados, cabras e ovelhas (DA SILVA et al., 2018).

Reino: Animalia LINNAEUS, 1758.

Subreino: Bilateria HATSCHECK, 1888.

Filo: Artrópodes SIELBOLD, 1848.

Classe: Aracnídeos LAMARCK, 1801.

Ordem: Ixodida LEACH, 1817.

Família: Ixodidae DUGÈS, 1834.

Gênero: *Rhipicephalus* KOCH, 1844.

Espécie: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* CANESTRINI, 1888.

Em seu ciclo biológico (Figura 5) as larvas infestam o bovino e se alimentam por 6 a 8 dias até passarem muda para ninfas, as quais chegam ao estágio adulto em 7 a 9 dias com período total de parasitismo variando de 18 a 22 dias, podendo se ampliar até

30 dias (BARROS-BATTESTI et al., 2006). A fase não parasitária do ciclo é marcada pela postura dos ovos das fêmeas no ambiente, seguida da eclosão das larvas e do acesso aos seus hospedeiros (WHARTON, 1974). Apesar de parasitarem preferencialmente bovinos, outros animais podem ser hospedeiros e quando a infestação é alta, são capazes eventualmente de parasitar humanos durante manipulação do animal (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

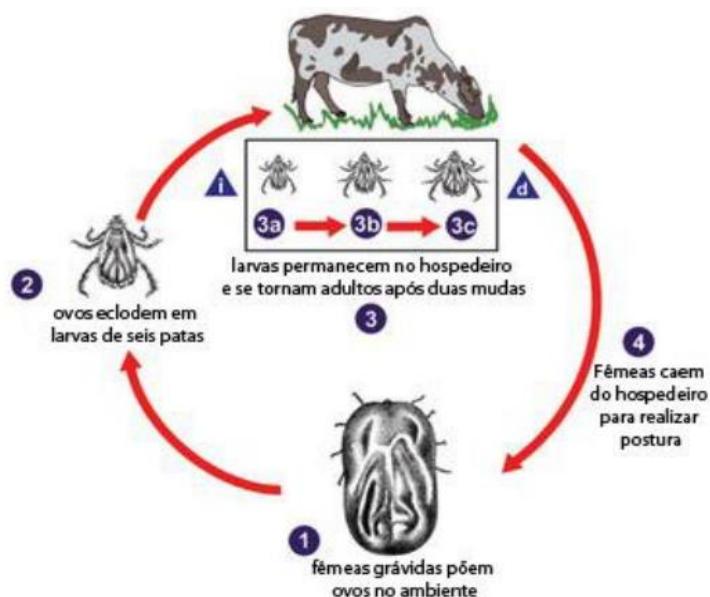


Figura 4. Ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. As Fêmeas grávidas põem ovos no meio ambiente (1). Os ovos eclodem em larvas de três pares de patas (2). As larvas se fixam ao hospedeiro e depois de duas mudas (larva-ninfa e ninfa-adulto), se desenvolvem em adultos. As fêmeas caem do hospedeiro para realização da postura (4). Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC (2023). **Disponível em:** CDC. Acesso em 20/10/2023.

Denominado carapato-do-boi, *R. microplus*, está presente em todo o Brasil. A disseminação e adaptação desse ectoparasito é favorecida devido aos fatores ambientais e climáticos do país (Figura 6) e pela disponibilidade de animais de raças mais sensíveis (GRISI et al., 2014; MARQUES et al., 2020).

Esta espécie de carapato ainda demanda grande atenção no cenário da produção bovina no Brasil (GARCIA et al., 2019). São descritas perdas na produção de leite, carne e couro em todo mundo e países em desenvolvimento são os que mais sofrem as consequências da presença deste carapato em seus rebanhos, necessitando de mecanismos mais eficazes para o controle do carapato (MARQUES et al., 2020). O Brasil é responsável pela exportação de aproximadamente 43 bilhões de toneladas de

leite e carne, desta maneira o comprometimento do rebanho nacional interfere muito na economia (RODRIGUES et al., 2013; GRISI et al., 2014).

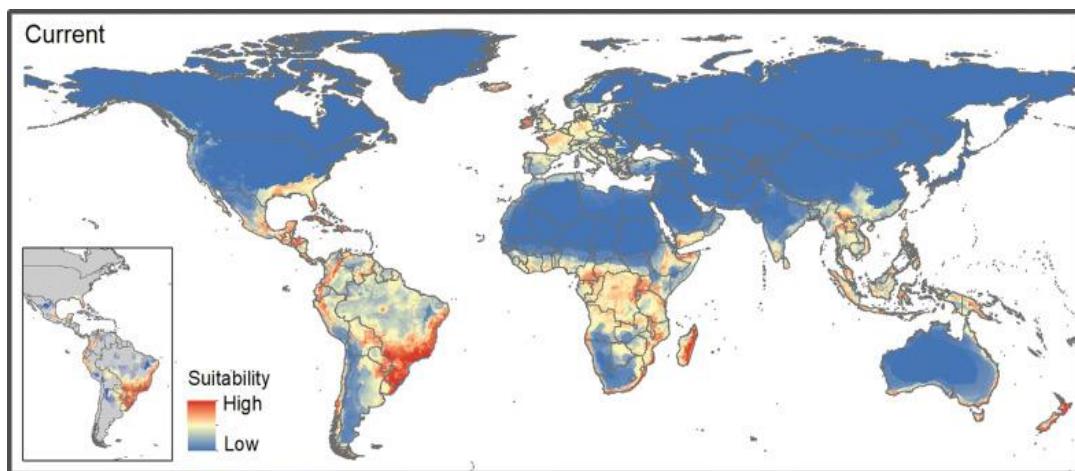


Figura 5. Imagem da adaptação atual do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de acordo com o modelo de nicho ecológico, sob condições ambientais. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7298856/#CR4>>. Acesso em 20/10/2023.

2.1.6 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como Vetor de Agentes Patogênicos

Muitos patógenos estão relacionados a transmissão por carrapatos, incluindo vírus, protozoários, bactérias e rickétsias (CHOMEL, 2011). Devido ao seu hábito hematófago, estão no primeiro grupo como fonte de patógenos transmitidos para animais e em segundo para os humanos, ficando atrás somente dos mosquitos (SHAW et al., 2001; CHOMEL, 2011).

No Brasil, *R. microplus* transmite microrganismos de importância médica aos bovinos. Patógenos como *Babesia bovis* (BABES, 1888), *Babesia bigemina* (SMITH; KILBORNE, 1893) e *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), são os agentes responsáveis por doenças de grande impacto econômico, epidemiológico e social. Historicamente esses patógenos estão ligados a Tristeza Parasitária Bovina e compartilham características importantes: infectam exclusivamente eritrócitos nos hospedeiros vertebrados, geralmente coocorrem em áreas endêmicas e são transmitidas pelo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SUAREZ; NOH, 2011; SILVA, 2012).

2.2 *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910)

Anaplasma marginale é uma alfa-proteobacéria gram-negativa da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae. É uma bactéria intracelular obrigatória, se replica dentro de vacúolos citoplasmáticos da célula hospedeira como os eritrócitos (THEILER, 1910; DUMLER et al., 2001) e afeta principalmente ruminantes como os bovinos, bisões, veados e búfalos (AUBRY; GEALE, 2011; SILVEIRA et al., 2012; SHRAF et al., 2013; SUDAN Et al., 2014; EYGELAAR et al., 2015). Além disso foi relatado infectando espécies não ruminantes, como o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) (GUILLEMI et al., 2016), equinos (ASIF et al., 2020) e cães (HORNOK et al., 2018).

A anaplasmosse é endêmica em áreas tropicais e é responsável por inúmeras perdas econômicas para a indústria de carne e de leite em todo o mundo devido a problemas como a perda de peso, queda na produção de leite, abortos, tratamentos com o custo elevado e possuir uma alta mortalidade dos animais infectados (KOCAN et al., 2003; De LA FOURNIÈRE et al., 2023).

Os sintomas clínicos incluem, febre, anorexia, perda de peso, letargia, letargia, supressão da ruminação, anemia grave, mucosas pálidas, icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria, aborto e muitas vezes óbito (RISTIC, 1977; KOCAN et al., 2004, 2015). Os bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecções persistentes, caracterizadas por riquetsemia cíclica de baixo nível (KOCAN et al., 2003; KOCAN et al., 2012). Os animais persistentemente infectados, denominados "portadores", adquirem imunidade vitalícia e, após a exposição ao patógeno, mostram-se resistentes à doença clínica. As perdas associadas à anaplasmosse são quantificadas por diversos parâmetros, incluindo a redução no ganho de peso, diminuição na produção de leite, incidência de abortos, custos associados ao tratamento da anaplasmosse e taxas de mortalidade (KOCAN et al., 2015).

Reino: Bacteria CAVALIER-SMITH, 2002

Sub Reino: Negibacteria CAVALIER-SMITH, 2002

Filo: Proteobacteria GARRITY et al., 2005

Classe: Alphaproteobacteria GARRITY et al., 2006

Ordem: Rickettsiales GIESZCZYKIEWICZ, 1939

Família: Anaplasmataceae PHILIP, 1957

Gênero: *Anaplasma* THEILER, 1910.

Espécie: *Anaplasma marginale* THEILER, 1910.

Sua transmissão para bovinos no Brasil ocorre biologicamente por carapatos, mecanicamente por transfusão de sangue infectado em fômites ou aparelho bucal de insetos sugadores, como também pelo contágio por via transplacentária aos bezerros (PASSOS; LIMA, 1984; KOCAN et al., 2010; AUBRY; GEALE, 2011; LOPES et al., 2016).

Existem cerca de 20 espécies de carapatos incriminados como vetores no mundo, incluindo *Rhipicephalus spp.*, *Dermacentor spp.* e *Ixodes ricinus* (KOCAN et al., 2004). O carapato macho exerce um papel muito importante na transmissão intraestadial por se tornarem permanentemente infectados, transmitindo *A. marginale* quando se alimentam em um novo hospedeiro (Kocan et al., 1992). Entretanto, foi detectado a presença de DNA de *A. marginale* em glândulas salivares de duas fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, propondo o envolvimento deste carapato na transmissão de *A. marginale* (ALAMZÁN et al., 2008). Ribeiro e Lima (1996) verificaram a presença de colônias de *A. marginale* em células epiteliais do intestino de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* utilizando a microscopia óptica e eletrônica.

Pelo menos doze espécies de artrópodes já se mostraram capazes de transmitir mecanicamente *A. marginale*, incluindo *S. calcitrans*, oito espécies de Tabanidae e três espécies de Culicidae (SCOLES et al., 2005). BAUTISTA Et al., (2018) realizou um estudo onde foi sugerido que *S. calcitrans* transmitia mecanicamente *A. marginale* (KIKUGAWA et al., 2009; SANTOS et al., 2013).

O ciclo biológico de *Anaplasma marginale* (Figura 7) é conduzido pelo ciclo de alimentação do carapato (KOCAN et al., 1992). No decorrer do repasto sanguíneo sobre os bovinos, eritrócitos infectados são ingeridos e promovem a infecção das células intestinais do carapato. Em seguida, com o desenvolvimento de *A. marginale* nas células do intestino médio do carapato, outros tecidos são contaminados, incluindo a glândula salivar, onde as riquetsias podem ser transmitidas para os vertebrados durante a alimentação (KOCAN et al., 1992; GE et al., 1996). Em cada local de infecção do carapato, *A. marginale* se desenvolve dentro de vacúolos ou colônias delimitadas por

membrana. Dentro das colônias a primeira forma é a vegetativa ou reticulada, a qual se multiplica por fissão binária, formando grandes colônias e podem conter muitos organismos. Em seguida, mudam para forma infectante denominado corpúsculo denso, podendo sobreviver fora do hospedeiro e o que permitiria a ocorrência de transmissão mecânica (KOCAN et al., 2010). Os bovinos se tornam infectados quando a forma densa é transmitida durante a alimentação do carapato via glândula salivar (KOCAN et al., 2003).

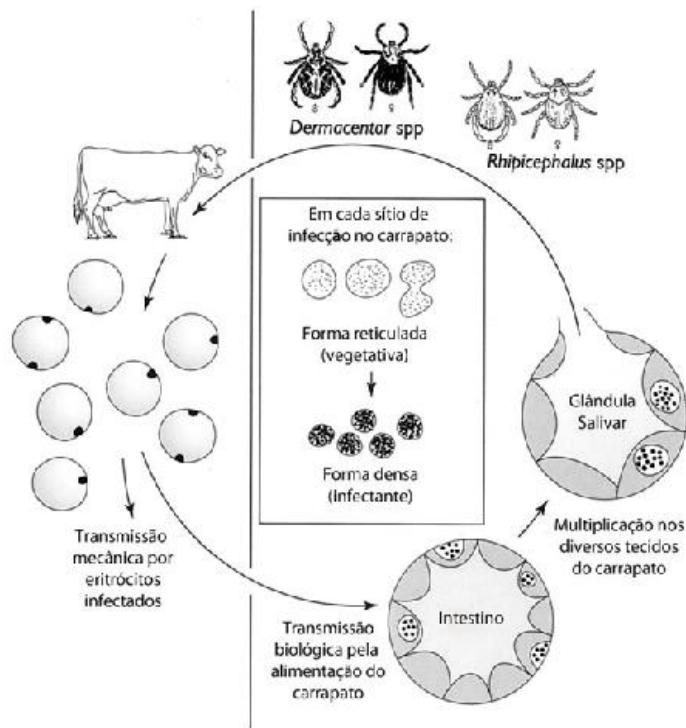


Figura 6. Ciclo do desenvolvimento de *Anaplasma marginale* em bovinos e carrapatos. Adaptado de Kocan et al., (2003). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207124/>>. Acesso em 15/09/23.

Anaplasma marginale é uma das bactérias transmitidas por carrapatos mais prevalente em todo mundo, tornando-se responsável por morbidade e por mortalidade de bovinos em regiões subtropicais, tropicais e temperadas, incluindo América do Sul, Central e Norte, Austrália, Ásia e Europa (KOCAN et al., 2010; AUBRY; GEALE, 2011). Porém, devido ao aquecimento global, a distribuição da anaplasmosse pode ser modificada, e desta maneira influenciar o movimento dos vetores ao longo dos anos (JONSSON; REID, 2000).

Nos EUA, a anaplasmosse tem sido relatada em muitos estados podendo estar relacionada ao transporte de gado, transmissão mecânica ou biológica ao gado (KOCAN et al., 2010). Na Europa, os ruminantes silvestres, como veados e alces, podem influenciar na epidemiologia da doença (ZAUGG et al., 1969; DE LA FUENTE et al., 2004). Em regiões que os animais silvestres e bovinos compartilham da mesma pastagem a preocupação cresce, em função do aumento da transmissão de agentes infeciosos entre estes animais (CHOMEL et al., 1994). Nos países como Itália (CECI; CARELLI, 1999; CRINGOLI, 2002) e Espanha (DE LA FUENTE et al., 2004) bovinos infectados já foram identificados. Na argentina essa doença ainda não se destaca como a babesiose, porém vem ganhando bastante visibilidade devido ao número de contaminações e diversidade genética (DE LA FUENTE et al., 2004; VIDOTTO et al., 2006; POHL et al., 2013; MACHADO et al., 2015).

No Brasil, a *A. marginale* possui grande impacto em áreas de instabilidade endêmica, ocorrendo elevadas taxas de mortalidade, quanto que nas áreas mais estáveis, por mais que não ocorra surtos, pode apresentar risco aos animais introduzidos sem um período de quarentena, ou provenientes de áreas com controle intensivo de carapatos (ARAUJO et al., 2003).

2.3 Diagnóstico molecular

Para o diagnóstico laboratorial da anaplasmoses são utilizadas técnicas diretas e indiretas (VIDOTTO & MARANA, 2001). Dentre os métodos de diagnóstico mais utilizadas estão o esfregaço sanguíneo, imunofluorescência indireta (IFI), teste indireto de imunoabsorção enzimática (ELISA indireto) e teste de aglutinação rápida (SILVA et al., 2022).

A análise de sangue periférico por meio de esfregaço sanguíneo é a técnica mais antiga para o diagnóstico de hemoparasitos, e é uma das principais ferramentas para a confirmação do diagnóstico (SILVA et al., 2022). Permite a visualização direta dos agentes nos eritrócitos infectados, principalmente na fase aguda da anaplasmosose, onde a parasitemia é mais alta. Em contrapartida, quando a infecção diminui a análise molecular é o método que entrega mais sensibilidade e especificidade para o diagnóstico (AMORIM et al., 2014).

Com o uso da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é possível ter um diagnóstico sensível e específico (RAMOS et al., 2010), carecendo de mínimas quantidades de DNA para obter cópias suficientes para a detecção de uma matriz inerte (GARINAYAN; AVASHA, 2013). A PCR em tempo real possui vantagens em relação a PCR convencional, como a quantificação do material amplificado simultâneo a amplificação do material genético testado e isso diminui o tempo de realização. A *nested* PCR é oriundo da PCR, sendo mais sensível e específica, devido a amplificação do DNA alvo mesmo em baixa concentração (FERREIRA, 2019). A sensibilidade e especificidade da PCR tem permitido o avanço nos estudos da anaplasmosose em todo o mundo, principalmente por meio da técnica de *qPCR* e *nested* PCR (HIGUCHI et al., 1992; Brito et al., 2013).

Este meio de diagnóstico vem sendo utilizado para detecção de doenças como as arboviroses (LICÍNIO; AYRES, 2021), SARS-COV-2 (MAGATON et al., 2022), leishmaniose (SOUZA, 2023) entre outras. Segundo Aubry e Geale (2010) com a reação de *nested*PCR é possível se chegar ao diagnóstico mesmo em amostras com baixa parasitemia, sendo uma técnica muito utilizada para o diagnóstico de hemoparasitose. É amplamente empregada nas pesquisas em animais e em artrópodes vetores (VIDOTTO & MARANA, 2001).

Devido a diversidade genética *Anaplasma marginale* a detecção deste microrganismo pode ser realizada utilizando diferentes genes. Essa heterogeneidade é relatada em regiões ao redor de todo o mundo. Os genes podem se diferenciar em aspectos como morfologia, sequência de proteína e características antigênicas (DE LA FUENTE et al., 2004; DE LA FUENTE et al., 2005a; DE LA FUENTE et al., 2005b; DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013; POHL et al., 2013).

As Proteínas de Superfície Principais (MSPs) possuem um importante papel na interação de *A. marginale* em células do hospedeiro e, com isso, tem relação com a capacidade para causar uma infecção. São descritas seis MSPs infectando eritrócitos de bovinos com *Anaplasma marginale* (Palmer et al., 1999; Aubry; Geale, 2010). Dentre estas, três MSPs, nomeadas *MSP1 α* , *MSP4* e *MSP5*, são codificadas por genes individuais e não se alteram antigenicamente em cada cepa. Em contrapartida as outras três, *MSP1 β* , *MSP2* e *MSP3*, são codificadas por famílias multigênicas e estas podem variar antigenicamente, especialmente em bovinos persistentemente infectados (Kocan; De La Fuente, 2003; Aubry; Geale, 2010).

Em 2013, Ybañez et al. realizaram o primeiro estudo de detecção e caracterização molecular de *A. marginale* em bovinos e em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em Cebu, Filipinas e utilizaram cinco marcadores para a análise filogenética (*gltA*, *groEL*, *rRNA 16S*, *msp5* e *msp1 α*). Métodos moleculares utilizando *groEL*, são frequentemente usados na detecção de bactérias do gênero *Anaplasma*. A *groEl* é uma chaperonina e pode ser encontrada em diferentes bactérias (ZEILSTRA-RYALLS; FAYET; GEORGOPoulos, 1991), e com isso apresenta vantagem de possuir mais variações entre espécies em relação aos genes de *16S sRNA* (INOKUMA et al., 2002; YBAÑEZ, et al., 2013). Em Garrity (2001) a reconstrução de genealogias entre bactérias procariôntes se baseia na análise comparativa das sequências de *16S sRNA*, e a identificação e taxonomia microbiana tem se beneficiado destes desenvolvimentos.

Genes como *gltA*, *16S RNAr*, *groEL*, *msp5*, entre outros, são muito conservados entre as cepas e podem ser utilizados para a identificação molecular de *Anaplasma marginale*, porém não fornecem informações filogenéticas. Para estudos filogenéticos a *msp1* e *msp4* apresentam-se úteis (DE LA FUENTE et al., 2002). O gene *msp5* tem sido muito empregado em vários estudos de detecção, devido ao seu alto valor de conservação na espécie de *A. marginale* (ECHAIDE et al., 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Locais de coleta

As coletas foram realizadas em propriedades de gado de leite do Estado do Rio de Janeiro nos municípios de Seropédica e Paracambi, em animais clinicamente saudáveis. Em todos os locais, as coletas foram autorizadas por meio de um Termo de Consentimento Livre Esclarecido, assinado pelos responsáveis. A coleta foi realizada em animais adultos e bezerros de ambos os sexos. As amostras foram levadas para o Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE/DESP/IV) no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, localizado no Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no campus Seropédica.

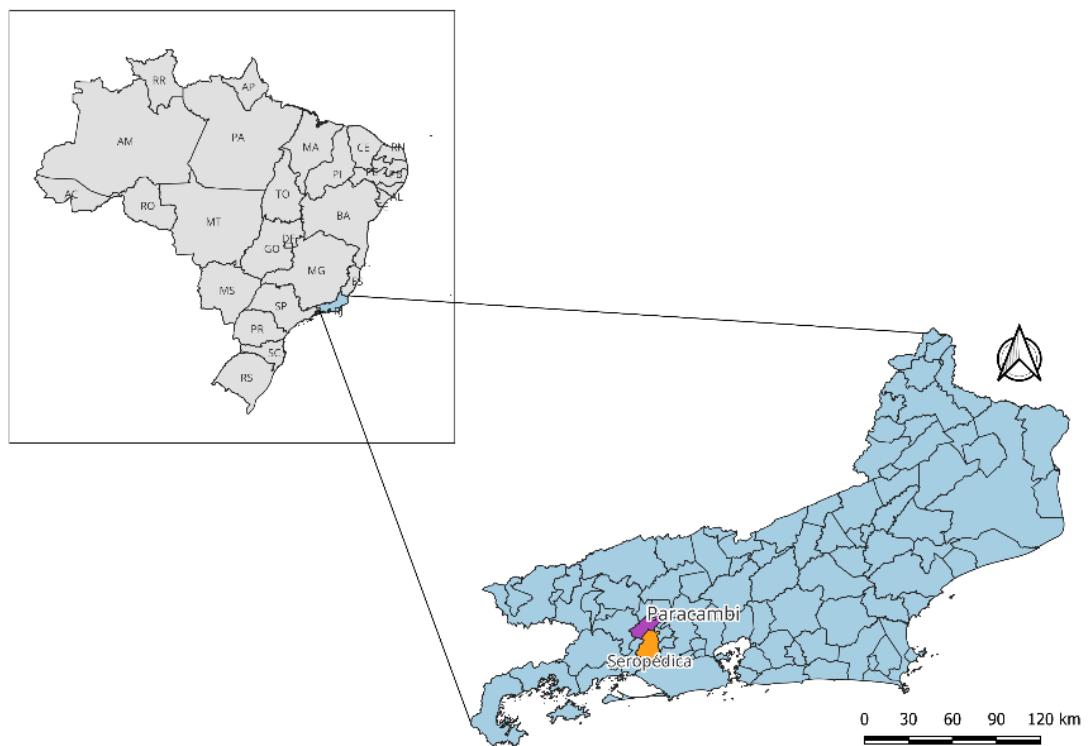


Figura 7. Mapa do Estado do Rio de Janeiro e os Municípios de Seropédica e Paracambi onde foram realizadas a captura de *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans* e *Rhipicephalus microplus*. **Fonte:** IBGE (2020), Datum: SIRGAS 2000, Elaboração: Software QGIS. Data: 20/10/2023.

3.2. Questionários

Em cada propriedade, foram aplicados dois questionários (Anexo 1) desenvolvidos com o intuito de coletar informações sobre as variáveis ambientais para se entender o sistema de criação dos animais, o manejo da propriedade, dados como: Município (Paracambi e Seropédica), área total da propriedade (1600m² a 273000m² e 100 mil m² a 653mil m²), relevo (montanhoso e planície), se os animais possuíam ou não acesso a mata fechada dentro da propriedade, presença ou ausência de animais como cães (ausência ou presença), gatos (ausência ou presença), equinos (ausência ou presença), silvestres (ausência ou presença), quantidade de bovinos na propriedade (12 a 30 ou 40 a 120), número de ordenhas (uma ou mais de uma), tipo de ordenhas (mecânica e manual), local de ordenha mecânica (sala ou no pasto), local de manejo (pasto ou curral), se os animais saem da propriedade (acesso ou não a áreas externas da propriedade), se compartilham ou não pastagem com outros animais, destinação de fezes (capineira ou permanência no local), condições de higiene (satisfatórias ou insatisfatórias), tipo de reprodução (monta ou inseminação), tipo de piso do local permanência dos bezerros (concreto e cimento ou areia e terra), período de maior incidência de carrapatos (Janeiro a Março / Setembro a Dezembro ou Abril a Agosto), quais critérios utilizados para escolha do carrapaticida (Indicação Médico Veterinário ou Indicação loja agropecuária), forma de aplicação do carrapaticida (pour on ou pulverização), intervalo de aplicação do carrapaticida (frequente ou sem frequência), presença de moscas na propriedade (presença ou ausência), assistência médico veterinário (com assistência ou sem assistência), quarentena na aquisição de novos animais (sim ou não) e acesso de cães nas áreas de pastagem (sim ou não).

Um segundo questionário foi aplicado para coletar informações sobre os indivíduos com variáveis como: identificação do animal, sexo (macho ou fêmea), idade (12 a 24 meses e >36 meses), escore corporal (3 a 3,5 ou 4 a 5), a procedência do animal (comprado ou nascido na propriedade), histórico de doença (sim ou não), nível de infestação de carrapatos (infestação baixa ou infestação média).

3.3. Coleta, identificação de dissecção de moscas

Adultos de *Stomoxys calcitrans* e de *Haematobia irritans* foram capturadas com o auxílio de um puçá e transferidas para uma gaiola para o transporte até o laboratório, onde foram identificadas morfológicamente utilizando chave taxonômica descrita por Carvalho, Moura e Ribeiro (2002). Após identificação, no laboratório as moscas foram anestesiadas a - 20°C em freezers e posteriormente foram dissecadas segundo Araújo et al., (2021). Foram anestesiados em freezer a -20°C por cerca de 5 minutos, identificadas e separadas por espécie e por meio do auxílio de Estereomicroscópio Binocular, com o auxílio de pinças oftalmológicas e estiletes, os espécimes foram dissecados. Separou-se intestino, peças bucais e carcaça contendo corpo gorduroso armazenados separadamente em microtubos de polipropileno de 1,5 mL, contendo: 50µL de RNAlater® (Invitrogen, CA, USA). Após estes procedimentos, os órgãos foram mantidos em freezer a -20°C até o momento da extração de ácidos nucléicos (DNA).



Figura 8. Imagem de *Stomoxys calcitrans* em ato de repasto (alimentação), perfurando a pele de hospedeiro bovino em momento de coleta realizada a campo. Fonte: acervo pessoal.



Figura 9. Imagem de órgãos de *Haematobia irritans* após dissecção. A: Carcaça contendo corpo gorduroso. B: Probóscida. C: Intestino. Fonte: Acervo pessoal.

3.4. Coleta, identificação e dissecção de carrapatos

Os carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foram coletados e armazenados em recipientes fechados com a identificação do animal e transportados ao laboratório, onde passaram por identificação morfológica utilizando a chave taxonômica descritas por Aragão e Fonseca et al., (1961), Barros-Battesti et al., (2006) e Barros Battesti et al., (2009). Os carrapatos foram anestesiados em freezer a -20°C por cerca de 5 minutos, utilizando Estereomicroscópio Binocular, os espécimes foram identificados e separados por sexo e então seguiram para o procedimento de dissecção descrita por Edwards et al., (2009) adaptada. O procedimento é realizado com o espécime submerso em PBS 1x, previamente limpo com solução de hipoclorito à 0,2% e depois em solução de PBS 1x, com o uso de tesoura Castroviejo oftalmológica e pinças oftalmológicas. Durante a dissecção separou-se intestino, ovário e glândulas salivares, que foram posteriormente armazenados separadamente em microtubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 50 µL de RNAlater® (Invitrogen, CA, USA). Após estes procedimentos, foram mantidos em freezer a -20°C até o momento da extração de ácidos nucléicos (DNA).

3.5. Extração de DNA carrapatos e moscas

O DNA foi extraído utilizando o protocolo adaptado de Fenolclorofórmio descrito por Sambrook (1989). Antes de iniciar as extrações, as amostras que permaneciam mantidas em RNAlater® a -20° foram descongeladas e lavadas com 200 µL de PBS (pH 7,2) estéril, centrifugadas por 5 minutos a (10000 x rpm), esse procedimento foi repetido três vezes, a fim de retirar todo o excesso de RNAlater®. Após a extração do DNA total, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA).

3.5.1. Protocolo modificado para extração de DNA a partir da glândula salivar de *Rhipicephalus microplus*

As amostras foram lavadas com 200µL de PBS (pH 7,2) estéril, centrifugadas por 5 minutos a (10000 x rpm), esse procedimento foi repetido três vezes, a fim de retirar todo o excesso de RNAlater®. Em cada amostra foi adicionado 500 µL do tampão de extração (20mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 400mM NaCl, 1% Dodecil Sulfato de Sódio) e com isso os espécimes foram macerados com ponteira (ponta queimada) e acrescentado 20 µL de proteinase K no tubo de 2 mL junto ao espécime macerado. O conteúdo nos tubos foram homogeneizados em vortex e incubados a 56° C por uma hora sob agitação a 650 rpm. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume (600 µL) de fenol pH 8.0, misturados em vortex levemente e centrifugados por 10 minutos a 16.000 x g em microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 500 µL de clorofórmio, novamente misturado em vortex e centrifugado por 10 min na velocidade de 16.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 50 µL de acetato de sódio a 3M e pH 5.2, adicionado 500 µL de etanol 100%, vortexar e levados ao freezer -20 °C durante 1 hora e 30minutos. Para recuperar o DNA, retornou para centrífuga por 10 min na velocidade de 16.000 x g e descartando o sobrenadante. Na etapa seguinte, foi acrescentado 500 µL de etanol 70% e o microtubo foi centrifugado por 10 minutos na velocidade de 16.000 x g. Para secar por completo os tubos foram dispostos invertidos em papel absorvente por aproximadamente 30 minutos para a secagem do pellet de DNA. O DNA foi eluido em 30 µL de Tris EDTA.

3.5.2. Protocolo modificado para extração de DNA de *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*

As amostras foram lavadas com 200 μ L de PBS (pH 7,2) estéril, centrifugadas por 5 minutos a (10000 x rpm), esse procedimento foi repetido três vezes, a fim de retirar todo o excesso de RNAlater®. Em cada amostra foi acrescentado 200 uL de PBS (pH 7,2) estéril, 21 uL de cloreto de cálcio (50mM) e 50mg de beads de metal, em tubos com tampa de rosca de 0,5mL e agitadas por 60s no disruptor de células e tecidos (L-Beader 6, Loccus Biotecnologies). Após isso, adicionado 200 μ L do tampão de lise (20mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 400mM NaCl, 1% Dodecil Sulfato de Sódio) e 20 μ L proteinase K a 100 mg/uL. Posteriormente, as amostras passaram por incubação de 12 horas a 56°C em bloco seco. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados por 1 minuto (16000 x g), retirado 350ul de cada lisado e colocados em novos tubos com tampa de rosca de 1,5 ML, contendo: 250 uL de PBS (pH 7,2) estéril. Em seguida foi adicionado 600 uL de fenol tamponado (pH7.4 – 7.8), e os tubos foram homogeneizados manualmente por três vezes formando uma emulsão e centrifugados por 10 minutos (16000 x g). O sobrenadante foi retirado e colocado em novos tubos de 1,5 mL, acrescentado 550 μ L de Fenolclorofórmio, que foram previamente misturados de forma manual com o intuito de formar uma emulsão e centrifugados por 10 minutos (16000 x g). O sobrenadante foi retirado e transferido para novos tubos e proporcionalmente a quantidade retirada de sobrenadante, foi adicionado o mesmo volume de isopropanol 100%. Os tubos foram incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente 24°C, e centrifugados por 10 minutos (16000 x g). Os tubos foram invertidos a fim de descartar o excesso de líquido, deixando o *pellet* de DNA no fundo do tubo e com isso as amostras foram lavadas com 1000 μ L de etanol 70% a fim de remover o excesso de sal. Os tubos foram novamente centrifugados por 1 minuto (16000 x g), essa lavagem foi repetida duas vezes. Para remover o álcool, os tubos foram colocados de forma invertida em papel absorvente durante 30 minutos e incubados por 5 minutos a 56°C para o álcool evaporar por completo. Na etapa seguinte o DNA foi ressuspendido em 230 μ L do tampão de eluição AE (DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen), através de incubação a 4°C durante 12 horas e em seguida aquecido à 56°C por dez minutos.

3.6. PCR em tempo real para detecção de *Anaplasma marginale* em extratos de DNA de *Rhipicephalus microplus*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*

As amostras de DNA s provenientes dos artrópodes foram analisados em PCR em tempo real (qPCR), para a confirmação da presença de *a. marginale*. Nas amostras de glândula salivar dos caracatos e peças bucais e intestino das moscas. Foi realizado qPCR para o gene da proteína de superfície 1β (*msp1β*) de *Anaplasma marginale* que amplifica um produto de 95 pb (Tabela 1) (CARELLI et al.,2007).

Tabela 1. Primers e sonda da reação de qPCR para *Anaplasma marginale* (CARELLI et al.,2007)

| PCR | Primers | Sequência de oligonucleotídeo |
|---|---------------------------|---|
| qPCR para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>) | AM-For AM-Ver AM-Pb | 5' TTGGCAAGGCAGCAGCTT 3' 5' TTCCGCGAGCATGTGCAT 3' 6FAM – TCGGTCTAACATCTCCAGGCTTCAT – QSY |

As reações de qPCR foram realizadas no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), utilizando um volume final 12μl, contendo os seguintes reagentes: 6 μL de TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems), 0,5 μM de cada primer, 0,25 μM da sonda e 3 μl de DNA total à 30ng/ μl. Água livre de nuclease foi utilizada como controle negativo. Para controle positivo foi utilizado amostra de DNA extraído a partir de sangue total de bovino naturalmente infectado com *Anaplasma marginale*. A infecção foi confirmada através da análise de esfregaço sanguíneo, onde foi visualizado inclusões intraeritrocitária sugestiva de *A. marginale* e também por nPCR e sequenciamento do gene *msp5* (ECHAIDE et al., 1998). As condições de termociclagem foram as seguintes: 50 °C por 2 minutos; 40 ciclos de 95°C por 10 minutos; 95° por 30 segundos; 56°C por 30 segundos e a extensão final a 72°C por 30 segundos. As amostras foram consideradas positivas quando o valor do ciclo de quantificação (Cq) foi inferior a 40 ciclos. As amostras testadas pela qPCR foram submetidas a um novo PCR com base no gene *msp5* com o intuito de confirmar a presença de *A. marginale* (ECHAIDE et al., 1998).

3.7. Nested PCR para detecção de *Anaplasma marginale* em extratos de DNA de *Rhipicephalus microplus*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*

As mesmas amostras testadas pelo ensaio de PCR em tempo real também foram submetidas ao *nestedPCR* com alvo no gene da proteína de superfície 5 (*msp5*). A primeira reação amplifica um produto de 458 pb e na segunda reação 345pb. Na primeira reação da *nPCR* foram utilizados os oligoiniciadores *msp5EF* (5'GCATAGCCTCCGCGTCTTC3') e *msp5ER* (5'TCCTCGCCTGCCCTCAGA3') e na segunda reação *msp5intEF* (5'TACACGTGCCCTACCGACTTA) e *msp5ER* (5'TCCTCGCCTGCCCTCAGA3') (DE ECHAIDE et al.,1998). As reações foram realizadas com volume final de 25 μ L, contendo: 1x PCR buffer, 3mM de MgCl₂, 0,4mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 0,4 μ M de cada oligoiniciador, 1U Taq Platinum e 3 μ L de DNA a 30ng/ μ L. Água livre de nuclease utilizada como controle negativo. Para controle positivo foi utilizado a mesma amostra de DNA descrita no item anterior. As condições de termociclagem foram de 95°C por 3 minutos para temperatura inicial de desnaturação, 95°C por 30 segundos, 35 ciclos a 65°C por 58 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Essas condições de termociclagem foram utilizadas para as duas reações da *nPCR*. O volume de DNA utilizado na segunda reação foi de 1 μ L. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. A corrida da eletroforese foi realizada a 75 volts (5V/cm) por 35 minutos. Em seguida, os géis foram corados em brometo de etídio (50mg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia).

3.8. Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento e alinhamento das sequências

Vinte e três produtos da segunda reação da *nested PCR* foram purificadas com o ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. A purificação foi realizada aplicando 2 μ L do ExoSAP-IT™ junto a 5 μ L do produto obtido pela reação de PCR. Os tubos foram incubados em termociclador PROFlex PCR (Applied Biosystems) a 37°C por 15 minutos para degradação de *primers* e nucleotídeos remanescentes seguidos de mais 15 minutos de

incubação a 80°C para inativação do reagente ExoSAP- IT™. Após o processo de purificação, os produtos foram enviados para sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger (Sanger et al. 1970) utilizando os primers da segunda reação da nPCR. Os produtos de PCR purificados foram enviados para o serviço de sequenciamento da Plataforma Tecnológica do Instituto Oswaldo Cruz –RJ. O sequenciado foi realizado no equipamento ABI 3730xL – Applied Biosystems/Perkin Elmer, CA, USA. A similaridade das sequencias obtidas foram pesquisadas pela análise de alinhamento local BLAST disponível no endereço eletrônico [BLAST: Basic Local Alignment Search Tool \(nih.gov\)](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3.9. Análise estatística

Os dados obtidos através do questionário foram organizados em planilha do Microsoft Excel e posteriormente importados para o software R versão 3.6.1. A análise estatística tem por objetivo investigar a possível relação entre os fatores preditores e a positividade para *Anaplasma marginale* na análise de nestedPCR.

No primeiro momento as variáveis foram submetidas a análise bivariada realizada por meio do teste Qui-quadrado (χ^2), onde cada variável foi analisada em função da positividade de *Anaplasma marginale* admitindo um nível de significância de 95% (p-valor > 0,05).

Posteriormente as variáveis foram examinadas para verificar os níveis de correlação aplicando o teste de coeficiente Phi (ϕ). Os critérios seletivos para a entrada na análise multivariada foram variáveis que apresentaram valores de $\phi < 0,6$ e valor de $p < 0,12$ no teste χ^2 . Uma análise combinatória entre as variáveis selecionadas foi realizada para encontrar o melhor modelo preditivo. Os modelos foram submetidos à regressão logística empregando o pacote “rms” (HARRELL, 2020). O fator de inflação de variância foi aplicado para confirmar a ausência de multicolinearidade em cada modelo preditivo. Os modelos foram validados aplicando o método de reamostragem bootstrapping realizado com 1000 pseudoréplicas.

O teste de Hosmer e Lemeshow também foi realizado para avaliar o ajuste geral, considerando o modelo ajustado quando os valores são próximos de 1.

4. RESULTADOS

Foram analisadas neste trabalho 29 moscas da espécie *Haematobia irritans*, 40 moscas *Stomoxys calcitrans* e 96 carapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo utilizada as probóscidas das moscas e glândula salivar dos carapatos para detecção molecular por PCR em tempo real (qPCR) e posteriormente em *nested* PCR (Tabela 2).

A qPCR apresentou positividade de 28% (n=11/40) em probóscidas de *S. calcitrans*, 24% (n=7/29) em probóscidas de *H. irritans* e 56% (n=54/96) nas glândulas salivares de *R. microplus* (Tabela 2).

A *nested* PCR apresentou positividade de 73% (n=29/40) em probóscidas de *S. calcitrans*, 90% (n=26/29) em probóscidas de *H. irritans* e 45% (n=43/96) nas glândulas salivares de *R. microplus* (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras positivas para *Anaplasma marginale* detectadas por nPCR em glândulas salivares de *Rhipicephalus microplus*, probóscidas de *Stomoxys calcitrans* e probóscidas de *Haematobia irritans* capturados em propriedade de gado de leite nos municípios de Seropédica e Paracambi-RJ.

| MUNICÍPIOS | FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE DOS ARTRÓPODES | | |
|----------------|--|----------------------------|----------------------------|
| Artrópodes | <i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus)</i> <i>microplus</i> | <i>Stomoxys calcitrans</i> | <i>Haematobia irritans</i> |
| Seropédica- RJ | 31% (n=30/96) | 73% (n=29/40) | 45% (n=13/29) |
| Paracambi- RJ | 14% (n=13/96) | 0 | 45% (n=13/29) |

*No município de Paracambi – RJ não foi coletado nenhuma amostra de *Stomoxys calcitrans*.

Os amplicons obtidos na *nested* PCR, 10 amostras de *H. irritans*, 6 de *S. calcitrans* e 7 de *R. microplus* foram purificadas e enviadas para o sequenciamento tipo sanger para confirmação da detecção molecular de *A. marginale*.

De acordo com os resultados do sequenciamento, as amostras obtiveram 99% (98,11% a 100%) de similaridade com sequencias previamente depositadas no GenBank identificadas como *A. marginale*.

Uma média entre os valores foi realizada entre a comparação par-a-par do percentual de identidade e apresentou 0,84% de divergência entre todas as sequencias. O cálculo da distância evolutiva média foi realizado a partir das sequências obtidas

dentro de cada espécie de artrópodes. Para *H. irritans* a distância evolutiva média foi de $0,00966 \pm 0,00271$, em *R. microplus* foi de $0,0784 \pm 0,00323$ e para *S. calcitrans* foi de $0,00695 \pm 0,0028$. A distância evolutiva média foi também comparada entre as espécies de artrópodes estudados. Uma distância evolutiva de $0,009144 \pm 0,002985$ foi observada entre *R. microplus* e *H. irritans*, $0,0079114 \pm 0,002241$ entre *H. irritans* e *S. calcitrans* e $0,007458 \pm 0,002852$ entre *R. microplus* e *S. calcitrans*. Neste estudo foi possível observar que o percentual de identidade e distância evolutiva de fragmentos de aproximadamente 345 pb do gene *msp5* entre as sequencias estudadas não apresentou divergência significativa dentro dos grupos e entre os grupos observados na figura 12.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|-----------------|----|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|------|
| H74 | 1 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| H94 | 2 | 99,37 | | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| H75 | 3 | 99,37 | 99,37 | | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| H89 | 4 | 99,06 | 99,06 | 99,06 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| H84 | 5 | 99,69 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| H76 | 6 | 99,69 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | 100,00 | | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| RHIPI124 | 7 | 99,06 | 99,06 | 99,06 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| S32 | 8 | 99,37 | 99,37 | 99,37 | 99,06 | 99,69 | 99,69 | 99,06 | | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| S39 | 9 | 98,75 | 98,75 | 98,75 | 98,43 | 99,06 | 99,06 | 98,43 | 98,75 | | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| RHIPI242 | 10 | 98,75 | 98,75 | 98,75 | 98,43 | 99,06 | 99,06 | 98,43 | 98,75 | 100,00 | | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 |
| H5 | 11 | 98,12 | 98,12 | 98,12 | 97,81 | 98,43 | 98,43 | 97,81 | 98,12 | 99,37 | 99,37 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| H29 | 12 | 98,12 | 98,12 | 98,12 | 97,81 | 98,43 | 98,43 | 97,81 | 98,12 | 99,37 | 99,37 | 98,75 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| RHIPI151 | 13 | 98,43 | 98,43 | 98,43 | 98,12 | 98,75 | 98,75 | 98,12 | 98,43 | 99,69 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| RHIPI32 | 14 | 99,06 | 99,06 | 99,06 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 98,75 | 99,06 | 99,69 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | 99,37 | | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| RHIPI214 | 15 | 99,06 | 99,06 | 99,06 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 98,75 | 99,06 | 99,69 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | 99,37 | 100,00 | | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| S41 | 16 | 99,37 | 99,37 | 99,37 | 99,06 | 99,69 | 99,69 | 99,06 | 99,37 | 99,37 | 99,37 | 98,75 | 98,75 | 99,06 | 99,69 | 99,69 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| RHIPI263 | 17 | 99,69 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | 100,00 | 100,00 | 99,37 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | 98,43 | 98,43 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 99,69 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 |
| RHIPI4 | 18 | 99,69 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | 100,00 | 100,00 | 99,37 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | 98,43 | 98,43 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 99,69 | 100,00 | | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| S30 | 19 | 99,69 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | 100,00 | 100,00 | 99,37 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | 98,43 | 98,43 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 99,69 | 100,00 | 100,00 | | 0,00 | 0,00 | 0,01 |
| H95 | 20 | 99,37 | 99,37 | 99,37 | 99,06 | 99,69 | 99,69 | 99,06 | 99,37 | 98,75 | 98,75 | 98,43 | 98,43 | 98,12 | 98,43 | 98,43 | 98,75 | 98,75 | 99,06 | 99,37 | 99,37 | 99,69 | 0,01 |
| RHIPI51 | 21 | 99,69 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | 100,00 | 100,00 | 99,37 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | 98,43 | 98,43 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 99,69 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 99,69 | | 0,01 |
| S49 | 22 | 99,06 | 99,06 | 99,06 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 98,75 | 99,06 | 98,43 | 98,43 | 97,81 | 97,81 | 98,12 | 98,75 | 98,75 | 99,06 | 99,37 | 99,37 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | |
| - S15 | 23 | 99,69 | 99,69 | 99,69 | 99,37 | 100,00 | 100,00 | 99,37 | 99,69 | 99,06 | 99,06 | 98,43 | 98,43 | 98,75 | 99,37 | 99,37 | 99,69 | 100,00 | 100,00 | 99,69 | 100,00 | 99,37 | |

Figura 10: Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e distância evolutiva (diagonal superior) de fragmentos de aproximadamente 345 pb do gene *msp5* entre as sequencias de *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. As análises foram realizadas no software CLC Main Workbench v.7.9. A sequência H74 foi utilizada como referência.

Devido ao número amostral de moscas ser muito baixo, não foi possível realizar a análise estatística com este artrópode, sendo assim efetuou-se a análise bivariada e multivariada da infecção por *A. marginale* em carrapatos.

As variáveis presença de animais silvestres, acesso a áreas externas da propriedade, compartilhamento de pastagem com outros animais, intervalo de aplicação do carrapaticida, presença de moscas e assistência médico veterinária, apresentaram respostas significativas na análise bivariada (Tabela 3). As demais variáveis não apresentaram associação significativa conforme observado na tabela 3.

Tabela 3. Análise bivariada das variáveis epidemiológicas ambientais na presença de DNA de *Anaplasma marginale* em glândulas salivares de *Rhipicephalus microplus* coletados em fazendas de gado de leite no estado do Rio de Janeiro.

| VARIÁVEIS ESTUDADAS | n | % | p-valor | X ² | Razão de chance | IC 95% |
|---|----------|------------|---------|----------------|-----------------|-----------|
| Cidade Paracambi Seropédica | 39 57 | 33% 53% | 0,06 | 3,48 | 2,20 | 0,88-5,68 |
| Sexo Fêmea Macho | 74 22 | 43% 50% | 0,57 | 0,31 | 0,76 | 0,26-2,71 |
| Idade 12 a 24 meses Mais 36 meses | 36 60 | 67% 32% | 0,22 | 1,49 | 0,59 | 0,23-1,49 |
| ECC 3 e 3,5 4 a 5 | 22 74 | 36% 47% | 0,36 | 0,89 | 1,56 | 0,53-4,85 |
| Procedência Nascido na propriedade Comprado | 54 42 | 39% 52% | 0,18 | 1,73 | 1,71 | 0,70-4,23 |
| Histórico de doenças Sim Não | 43 53 | 49% 42% | 0,47 | 0,51 | 1,34 | 0,55-3,26 |
| Infestação de carrapatos Infestação baixa Infestação média | 83 12 | 46% 38% | 0,45 | 0,54 | 1,54 | 0,42-6,40 |
| Tamanho da propriedade 1600m ² a 273000m ² 100 mil m ² a 653 mil m ² | 46 50 | 48% 42% | 0,68 | 0,32 | 0,79 | 0,32-1,90 |
| Relevo Montanhoso Planície | 40 56 | 35% 52% | 0,10 | 2,65 | 0,50 | 0,19-1,24 |

| | | | | | | | |
|--|----|----|------------|--------|-------|------|------------|
| Quantidade de bovinos | 40 | 56 | 45% 45% | 0,14 | 2,65 | 0,50 | 0,19-1,24 |
| Quantidade de ordenhas | | | | 0,003 | 8,40 | 0,22 | 0,58-0,69 |
| Uma | | | | | | | |
| Mais de uma | 71 | 25 | 54% 20% | | | | |
| Presença de Cães | | | | 0,82 | 0,04 | 1,22 | 0,13-15,34 |
| Ausência | 5 | 91 | 40% 45% | | | | |
| Presença de Gatos | | | | 0,69 | 0,15 | 1,18 | 0,40-3,10 |
| Ausência | 31 | 65 | 42% 46% | | | | |
| Presença de Equinos | | | | 0,74 | 0,12 | 0,79 | 0,16-3,72 |
| Ausência | 10 | 86 | 50% 44% | | | | |
| Presença de Silvestres | | | | 0,007 | 7,20 | 3,27 | 1,24-9,02 |
| Ausência | 65 | 31 | 35% 65% | | | | |
| Sistema de Criação | | | | 0,83 | 0,04 | 1,11 | 0,33-3,64 |
| Extensivo | 20 | 76 | 45% 45% | | | | |
| Acesso a Mata dentro da propriedade | | | | 0,04 | 3,96 | 2,29 | 0,93-5,85 |
| Sem acesso | 42 | 54 | 33% 54% | | | | |
| Local de Manejo | | | | 0,92 | 0,008 | 1,05 | 0,31-3,67 |
| Pasto | 40 | 56 | 58% 36% | | | | |
| Acesso a áreas externas da propriedade | | | | 0,001 | 5,61 | 2,67 | 1,08-6,74 |
| Sim | 43 | 53 | 58% 34% | | | | |
| Compartilhamento de pastagem com outros animais | | | | 0,0002 | 14,58 | 0,16 | 0,050-0,47 |
| Sim | 28 | 68 | 75% 32% | | | | |
| Compra de Animais | | | | 0,63 | 0,22 | 1,22 | 0,49-3,08 |
| Sim | 36 | 60 | 42% 47% | | | | |
| Destinação das Fezes | | | | 0,57 | 0,31 | 0,74 | 0,22-2,34 |
| Capineira | 78 | 18 | 46% 39% | | | | |
| Condições de higiene | | | | 0,87 | 0,26 | 0,92 | 0,34-2,54 |
| Satisfatórias | 70 | 26 | 46% 44% | | | | |
| Tipo de reprodução | | | | 0,40 | 4,20 | 0,38 | 0,12-1,05 |
| Monta | 68 | 28 | 51% 29% | | | | |
| Tipo de piso- local de permanência dos bezerros | | | | 0,07 | 3,09 | 2,07 | 0,84-5,21 |
| Concreto e cimento | 43 | | 35% | | | | |
| Areia e terra | | | | | | | |

| | | | | | | |
|--|----------|------------|-------|------|------|------------|
| | 53 | 40% | | | | |
| Condições de higiene dos bezerros | | | 0,79 | 0,06 | 1,14 | 0,37-3,67 |
| Satisfatórias Insatisfatórias | 77 19 | 45% 42% | | | | |
| Período de maior incidência de carrapatos | | | 0,67 | 0,17 | 0,81 | 0,27-2,36 |
| Janeiro a março - setembro a dezembro Abril a agosto | 22 74 | 41% 48% | | | | |
| Critério de escolha para o carrapaticida | | | 0,83 | 0,04 | 0,89 | 0,27-2,97 |
| Indicação Médico Veterinário Indicação loja agropecuária | 21 75 | 43% 45% | | | | |
| Aplicação do carrapaticida | | | 0,84 | 0,04 | 0,90 | 0,29-2,66 |
| Pour on Pulverização | 88 8 | 44% 50% | | | | |
| Intervalo de aplicação | | | 0,007 | 7,44 | 0,31 | 0,12-0,79 |
| Frequente Sem frequência | 39 57 | 62% 33% | | | | |
| Presença de moscas | | | 0,003 | 9,13 | 4,19 | 1,48-13,22 |
| Ausência Presença | 31 65 | 23% 55% | | | | |
| Responsável conhece a TPB e anaplasmosse | | | 0,57 | 0,31 | 1,29 | 0,47-3,70 |
| Já ouviu falar Conhece | 71 21 | 46% 40% | | | | |
| Assistência Veterinária | | | 0,001 | 9,75 | 0,25 | 0,95-0,66 |
| Com assistência Sem assistência | 35 61 | 66% 33% | | | | |
| Realização de quarentena com a chegada de novos animais | | | 0,90 | 0,01 | 1,05 | 0,43-2,54 |
| Sim Não | 44 52 | 44% 45% | | | | |
| Acesso de cães nas áreas de pastagem | | | 0,09 | 2,83 | 2,23 | 0,79-6,75 |
| Sim Não | 70 26 | 50% 31% | | | | |

As variáveis Cidade, Procedência, Quantidade de bovinos, Silvestres, Acesso a áreas externas, escore corporal, raça, histórico de doenças, relevo, compartilhamento de pastagem, intervalo de aplicação dos ectoparasiticidas, assistência veterinária, acesso a

mata, presença de moscas foram selecionadas para análise multivariada por terem p-valor menor que 0,2 no teste de Qui-quadrado.

Após a aplicação do teste Phi (ϕ) as variáveis: Cidade, Procedência, Quantidade de bovinos, Silvestres, Acesso a áreas externas e presença de moscas não apresentaram colinearidade e foram submetidas a análise multivariada.

O modelo mais parcimonioso (apresenta menor valor de AIC) contém as variáveis cidade ($p\text{-valor}= 0,12$; OR: 2,00; IC:0,82-4,87), acesso a áreas externas ($p\text{-valor}= 1,96$; OR: 1,96; IC:0,79-4,83) e presença de moscas ($p\text{-valor}= 3,26$; OR:3,26; IC:1,17-9,08) (Tabela 4). O modelo apresenta performance de 0,71 e de ajuste 0,82. O teste de calibração por bootstrap revelou que o erro médio é de 0,08.

As variáveis Cidade, Áreas externas, e Presença de moscas, foram variáveis que apresentaram respostas significativas quando associados à presença de DNA de *A. marginale* em glândula salivar de *R. microplus* como mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Modelo epidemiológico de predição da infecção por *Anaplasma marginale* em *Rhipicephalus microplus* coletado em fazendas de gado de leite, obtido através da análise de regressão logística múltipla.

| | C β | E.P. | Wald Z | p-valor | OR | IC |
|-----------------------|-----------|------|--------|---------|------|-----------|
| CIDADE | 0,69 | 0,45 | 1,53 | 0,12 | 2,00 | 0,82-4,87 |
| ÁREAS EXTERNAS | 0,67 | 0,46 | 1,46 | 0,14 | 1,96 | 0,79-4,83 |
| MOSCAS | 1,18 | 0,52 | 2,27 | 0,02 | 3,26 | 1,17-9,08 |

Coe β ; E.P.: Erro Padrão; Wald Z: Teste Wald; **OR:** Razão de chance; **IC:** Intervalo de confiança.

Em relação à análise multivariada, foi observado uma correlação significativa entre a cidade de Seropédica e a positividade de amostras avaliadas no estudo ($p\text{-valor}= 0,12$; OR: 2,00; IC:0,82-4,87) demonstrando que as propriedades do município de seropédica, apresentam mais chances de terem artrópodes infectados.

O acesso a áreas externas apresentou correlação significativa neste estudo ($p\text{-valor}= 1,96$; OR: 1,96; IC:0,79-4,83), demonstrando que, os carapatos coletados de animais que tinham acesso a áreas externas apresentaram mais chances de se infectarem.

A variável presença de moscas ($p\text{-valor}= 3,26$; OR:3,26; IC:1,17-9,08) também apresentou uma correlação significativa junto a frequência de amostras positivas para

Anaplasma marginale, o que demonstra que as propriedades com a presença destes ectoparasitos apresentam 3 vezes mais chances de se infectarem.

5. DISCUSSÃO

A disseminação de *Anaplasma marginale* está associada com o carapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e também pode estar relacionada com *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans*, segundo os resultados de detecção deste estudo.

Anteriores estudos de investigação molecular em carapatos, relataram frequências semelhantes às detecções realizadas no presente trabalho. Da Silva et al. (2015) apresentaram um estudo de campo nos estados do Pará e no estado do Rio de Janeiro, para determinar a presença de *A. marginale* com alvo nos genes *msp5* e *msp1a* em carapatos que parasitavam búfalos, carapatos como *R. microplus*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma maculatum* e *Dermacentor nitens*, encontrando positividade de 22,2% *R. microplus*, 16% em *A. maculatum*, 13,8% em *A. sculptum* e de 10% em *D. nitens*. Neste estudo foi realizado a detecção somente em *R. microplus* devido aos bovinos serem os seus hospedeiros principais (TAYLOR et al., 2017).

Ao contrário de Kumar et al. (2019), que conduziram sua detecção em tecidos diferentes, a presente pesquisa, assim como o estudo de De la Fourniere et al. (2023), focou na detecção de *A. marginale* em glândulas salivares de carapatos. O estudo de De la Fourniere et al. realizou uma investigação experimental para avaliar a competência vetorial de larvas e a presença de *A. marginale* em fêmeas ingurgitadas que parasitavam bovinos. Neste contexto, a detecção foi conduzida utilizando os genes alvo *msp5* e *msp1b*. Os resultados do presente estudo mostraram amostras positivas para ambos os genes, corroborando a eficácia desses marcadores genéticos para a detecção de *A. marginale*, de maneira consistente com os achados de De la Fourniere et al. (2023).

Em comparação com as frequências de detecção em moscas hematófagas, estudos anteriores apresentaram metodologias e frequências semelhantes ao do presente estudo. Em 2018, Bautista et al. realizaram um teste no México utilizando nPCR com alvo no gene *msp5* para detectar a presença de *A. marginale* em *S. calcitrans* por meio de análise molecular. As moscas coletadas apresentavam evidências visuais de terem se alimentado de animais livres de carapatos por alguns anos e não houve a presença de outro díptero no estudo. Utilizaram pools de moscas inteiras para análise e obtiveram uma taxa de positividade de 29,16% para *A. marginale*.

No presente estudo, as coletas foram realizadas em propriedades com a presença de carapatos. Além disso, houve a visualização, coleta e detecção em *H. irritans*,

optando-se pela detecção individual em probóscidas. Estes resultados estão em concordância com os relatados por Foil et al. (1989), Scoles et al. (2005), Kikugawa et al. (2009), Santos et al. (2013) e Baldacchino et al. (2013), que indicaram que dípteros podem transportar partículas infecciosas com diferentes graus de sucesso através de suas partes bucais.

Em 2021, Araújo et al. relataram a presença de *A. marginale* em 19 (19/55) amostras de *S. calcitrans* em um estudo realizado no campus da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Destas, 6 amostras foram de intestino positivo, 5 de probóscida positiva, 2 com carcaça contendo corpo gorduroso positivo, 2 com peça bucal e carcaça contendo corpo gorduroso positivo e 1 com intestino e carcaça contendo corpo gorduroso positivo. Em um trabalho de diagnóstico molecular de *A. marginale* e *Babesia bovis* em bovídeos e artrópodes na Amazônia (FERREIRA et al., 2019), foi encontrada uma taxa de infecção em carapatos de 44,4% (200/450), em *Haematobia irritans* de 11,4% (27/236) e em *Stomoxys calcitrans* coletados em bubalinos de 1,5% (1/65), todos para *A. marginale*. Além de estudos em dípteros da família Muscidae, há um relato recente de detecção em tabanídeos utilizando PCR para o gene *msp5*, que indicou a presença de *A. marginale* em 26 (26,8%) dos 98 espécimes de tabanídeos estudados (RODRIGUES et al., 2022).

Além dos estudos realizados com biologia molecular, Saturnino (2023) observou, por meio de esfregaço sanguíneo, a positividade de *A. marginale* correlacionada à alta frequência de *H. irritans* e ao uso inadequado de medicamentos, assim como no presente estudo. A dinâmica de transmissão de *A. marginale* é complexa devido à possibilidade de transmissão mecânica através de diversos meios de transferência de eritrócitos infectados. Isso inclui peças bucais contaminadas com sangue de moscas picadoras, bem como instrumentos comumente utilizados na prática veterinária, como agulhas, aplicadores de brincos e equipamentos para castração e descorna (KOCAN et al., 2003; KOCAN et al., 2010).

Em áreas geográficas onde os vetores de carapatos estão ausentes ou são incapazes de transmitir cepas locais de *A. marginale*, como observado na Flórida, onde os isolados de *A. marginale* até o momento se mostraram não infecciosos para carapatos, a transmissão mecânica pode representar a principal via de disseminação deste patógeno. De modo geral, a importância da transmissão mecânica tem sido

subestimada como meio de propagação da anaplasmosse bovina. Bovinos persistentemente infectados são os principais hospedeiros reservatórios desse patógeno, desempenhando um papel crucial como fonte de infecção tanto para a transmissão mecânica quanto para a transmissão biológica por carapatos (KOCAN et al., 2015).

O intuito do presente estudo não foi de realizar uma comparação entre as técnicas de detecção, até mesmo porque foi utilizado genes diferentes e técnicas diferentes e ambos entregam sensibilidade. Todas as amostras do estudo foram testadas para as duas técnicas e embora seja uma técnica que possui riscos de contaminação, mais demorada e trabalhosa em comparação a qPCR, surpreendentemente a nested PCR foi mais sensível. Além disso a proteína MSP1b utilizada para qPCR, é codificada por pelo menos dois genes, *msp1b1* e *msp1b2*(BOWIE et al.,2002 apud BAETA 2015; KOCAN et al., 2003) já a proteína MSP5 é codificada por um único gene (DE LA FUENTE et al., 2005). Apesar da diferença no número de cópias dos genes utilizados para cada técnica, a nested PCR, que utiliza um gene com apenas uma cópia, mostrou-se mais sensível.

A frequência observada neste estudo foi significativa e as cidades onde realizamos coletas possuem algumas características que favorecem a disseminação da doença. Essas cidades fazem divisa com vários municípios do estado do Rio de Janeiro, além de terem por perto rodovias importantes onde são realizados o transporte de animais com frequência, são cidades com extensas áreas rurais, florestas e regiões periurbanas, como também possuem altas temperaturas climáticas. Além disso, vários moradores das cidades permitem que seus animais circulem livremente pelos arredores das propriedades. Todos esses fatores facilitam a disseminação dos ectoparasitas e com eles os hemoparasitos.

Neste estudo, a presença de moscas ao redor dos animais e nos locais de manejo também demonstrou ser significativa, uma vez que nas propriedades onde esses ectoparasitas estavam presentes, a frequência de amostras positivas foi maior (Tabela 3). Esses achados corroboram com o estudo epidemiológico realizado por Tavares (2023), que avaliou a presença de *H. irritans* e *S. calcitrans* como fatores de risco para a transmissão de patógenos bovinos. No estudo de Tavares, *H. irritans* foi encontrada em 53% (16/30) dos animais e *S. calcitrans* estava presente em 83% (5/6) das fazendas analisadas.

Nos últimos anos, a presença de *A. marginale* foi detectada em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em São Paulo (MACHADO et al., 2006; SACCHI et al., 2012), em veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*) em Minas Gerais (SILVEIRA et al., 2012) e em um tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) na Argentina (GUILLEMI et al., 2016). No presente estudo, em algumas propriedades foi relatada a presença de animais silvestres, e a análise dos resultados estatísticos demonstrou que estas propriedades apresentaram uma frequência maior de amostras positivas em comparação a locais sem a presença desses animais (Tabela 3).

Esse fator tem sido motivo de preocupação há muitos anos. De Chomel et al. (1994) relataram o aumento da transmissão de agentes patogênicos entre grupos de animais domésticos e silvestres. Nos municípios onde foram realizadas as coletas, além de possuírem extensas áreas rurais, existem áreas de conservação de fauna e flora nas proximidades, como o Parque Municipal Natural do Curió em Paracambi e a Floresta Nacional Mário Xavier em Seropédica. Essas áreas de conservação podem facilitar a passagem de animais silvestres próximos às propriedades, contribuindo para a disseminação de patógenos.

Pesquisas que busquem identificar a presença de patógenos em potenciais vetores mecânicos são de grande importância e este trabalho ressalta a necessidade de novos estudos de investigação experimental. Muitos trabalhos apontam as moscas como possíveis causadoras de certas doenças, mas na maioria das vezes, não passam de especulações e ou reflexões devido aos achados epidemiológicos em determinados locais. É preciso conhecer melhor a capacidade vetorial das moscas e a participação delas na possível dinâmica de transmissão e isto pode ser imprescindível para se entender a epidemiologia das doenças, como também contribuir em prevenção de surtos.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o DNA de *Anaplasma marginale* pode ser detectado com alta frequência nas probóscides de *Haematobia irritans* e nas glândulas salivares de *Rhipicephalus microplus* em Seropédica-RJ e Paracambi-RJ, e nas probóscides de *Stomoxys calcitrans* em Seropédica-RJ. Por meio do modelo epidemiológico conclui-se que fatores como a presença de moscas, fauna silvestre e acesso dos bovinos a áreas de mata promovem a infecção de *R. microplus* por *A. marginale*. Esses achados são cruciais para desenvolver estratégias de prevenção da anaplasmose bovina, considerando os vetores artrópodes na epidemiologia da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, DH et al. Transmissão de *Anaplasma marginale* com carapatos *Boophilus microplus* adultos alimentados como ninfas em bezerros com diferentes níveis de riquetsemia. **Parasita**, v. 4, pág. 405-407, 1994.
- ALAMZÁN, Consuelo et al. Diversidade genética de cepas de *Anaplasma marginale* de um surto de anaplasmose bovina em área endêmica. **Parasitologia Veterinária**, v. 158, n. 1-2, pág. 103-109, 2008.
- ALMEIDA, F. A. De. et al. Dinâmica populacional da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) em bovinos da raça Guzerá e mestiço em Selvíria, MS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 157-162, 30 abr. 2010.
- AMORIM, Lucimar Souza et al. Complexo babesiose e anaplasmose bovina: diagnóstico e avaliação dos fatores de risco na Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 328-336, 2014.
- ARAGÃO, Henrique; FONSECA, Flávio da. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixodologia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.
- ARAÚJO, F. R. et al. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 139-148, dez. 2003.
- ARAÚJO, Thamires Rezende et al. First report of the presence of *Anaplasma marginale* in different tissues of the stable-fly *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) in Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 23, p. 100515, 2021.
- ASHRAF, Qurat UA et al. A report on the high prevalence of *Anaplasma sp.* in buffaloes from two provinces in Pakistan. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 5, p. 395-398, 2013.
- ASIF M., et al. Primeiro relatório sobre a detecção molecular simultânea de *Anaplasma marginale* e *Theileria annulata* em amostras de sangue equino coletadas do sul de Punjab, no Paquistão. **Acta Parasitol.** 65, 259–263. 2020.
- ATIF, F. A. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: *Rickettsiales* pathogens of veterinary and public health significance. **Parasitology Research**, v. 114, n. 11, p. 3941-3957, 7 set. 2015.
- AUBRY P., Geale DW Uma revisão da anaplasmose bovina. **Transfronteiriço. Emergir. Dis.** 2011; 58 :1-30.
- AUBRY, P.; GEALE, D.W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and emerging diseases**, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.
- AYRES, C. F. J. et al. Genetic diversity in Brazilian populations of *Aedes albopictus*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 871-875, 2002.
- BAÊTA, B.A. et al. Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 141-145, 2015.

BAÊTA, Bruna A. et al. Caracterização de duas cepas de *Anaplasma marginale* isoladas de bovinos no Rio de Janeiro, Brasil, após propagação em cultura de células de carapatos. **Carrapatos e doenças transmitidas por carapatos**, v. 6, n. 2, pág. 141-145, 2015.

BAHIA, Michele, et al. Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 29, 2020.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 945-52, 2010.

BARROS-BATTESTI, Darci M. et al. Redescription of Amblyomma fuscum Neumann, 1907 (Acari: Ixodidae), a rare South America tick confirmed in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 61, n. 2, p. 85-92, 2005.

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 OA**, Ciudad de México, v. 5, n. 1, p. 1-7, março 2018.

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.

BRITO, Danilo RB; SANTOS, Ana Clara G.; GUERRA, Rita MSNC. Ectoparasitos em rebanhos de caprinos e ovinos na microrregião do Alto Mearim e Grajaú, Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 14, n. 2, p. 59-63, 2005.

BRITO, Luciana Gatto. et al. Transmissão congênita de *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* na epidemiologia da tristeza parasitária bovina. **Embrapa Amazônia Oriental, Circular Técnica** 48. Belém: Embrapa, 2019.

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.

CABEZAS-CRUZ, Alejandro; DE LA FUENTE, José. *Anaplasma marginale* major surface protein 1a: a marker of strain diversity with implications for control of bovine anaplasmosis. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 6, n. 3, p. 205-210, 2015.

CABRINI, Isaías; ANDRADE, Carlos Fernando S. Evaluation of seven new electronic mosquito repellers. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 121, n. 2, p. 185-188, 2006.

CAMARGO, S. A.B., SEVERO, T. H., & VIDAL, M. B. Controle biológico do carapato bovino *Rhipicephalus (boophilus) microplus* por aves encontradas no bioma Pampa. **Anais da 14ª Mostra de Iniciação Científica**. Bagé: URCAMP, 53, 2017.

CANGUSSU, Alex Sander R. et al. A hybrid protein containing MSP1a repeats and Omp7, Omp8 and Omp9 epitopes protect immunized BALB/c mice against anaplasmosis. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 6, 2018.

CARELLI, Grazia et al. Detecção e quantificação de DNA de *Anaplasma marginale* em amostras de sangue de bovinos por PCR em tempo real. **Microbiologia veterinária**, v. 124, n. 1-2, pág. 107-114, 2007.

CARVALHO, Claudio José Barros de; MOURA, Maurício Osvaldo; RIBEIRO, Paulo Bretanha. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46, n. 2, p. 107-144, 2002.

CASTAÑEDA-ORTIZ, Elizabeth J. *et al.* Association of *Anaplasma marginale* strain superinfection with infection prevalence within tropical regions, **Plos One**, v.10, p.1-2, 2015.

CASTIGLIONI, Lilian; BICUDO, Hermione Elly Melara de Campos. Molecular characterization, relatedness of *Haematobia irritans* (horn fly) populations, by RAPD-PCR. **Genetica**, v. 124, p. 11-21, 2005.

CAVALCANTI, Milena Paiva Cavalcanti *et al.* Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008.

CDC. **CDC – DPDx – Ticks.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>>.

CHOMEL, Bruno B. *et al.* Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 1, p. 51–59, 1 jan. 1994.

CHOMEL, Bruno. Tick-borne infections in dogs - An emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology**, v.179, n.4, p.294-301, 2011.

Cortinas, R., & Jones, C. J. (2006). Ectoparasites of cattle and small ruminants. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, 22(3), 673-693.

COSTA, Valéria M. de M. et al. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 239-243, 2011.

COSTA-SANTOLIN, Isis Daniele Alves. **Estudo de carapatos associados com aves no entorno do tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil; detecção de *Rickettsia spp.*, e o desenvolvimento de métodos moleculares para análise de interações carapato microrganismo.** 2014. 143p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

CRINGOLI, G. *et al.* Epidemiology of bovine tick-borne diseases in southern Italy. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 421–426, jul. 2002.

CROSBY, Francy L. *et al.* Reduced Infectivity in cattle for an outer membrane protein mutant of *Anaplasma marginale*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 6, p. 2206-2214, 2015.

CRUZ, ANGELITO PANGAN DELA, *et al.* Detecção molecular de *Anaplasma spp.* no sangue e no leite de gado leiteiro nas Filipinas. **Jornal Turco de Ciências Veterinárias e Animais**, 2019, 43.4: 540-545.

DA SILVA, Jenevaldo Barbosa; ANDRÉ, Marcos Rogério; MACHADO, Rosangela Zacarias. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 1, p. 20-25, 2016.

DA SILVA, Jenevaldo Barbosa; DA FONSECA, Adivaldo Henrique; BARBOSA, José Diomedes. Caracterização molecular de *Anaplasma marginale* em carapatos alimentando-se naturalmente de búfalos. **Infecção, Genética e Evolução**, v. 35, p. 38-41, 2015.

DA SILVA, Jenevaldo Barbosa; ANDRÉ, Marcos Rogério; MACHADO, Rosângela Zacarias. Baixa diversidade genética de *Anaplasma marginale* em bezerros de área endêmica para anaplasmosse bovina no estado de São Paulo, Brasil. **Carapatos e doenças transmitidas por carapatos**, v. 7, n. 1, pág. 20-25, 2016.

DA SILVA, Nayara B. *et al.* First report of *Anaplasma marginale* infection in goats, Brazil. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0202140, 2018.

DARRIBA, Diego *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DE ANDRADE, ANGELINA BOSSI FRAGA *et al.* Parâmetros genéticos e fenótipicos da infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por moscas-dos-chifres (*Haematobia irritans*). In: **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso** (ALICE). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba, SP. Anais... Piracicaba: SBZ, 2001. p. 574-575., 2001.

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 FOURNIÈRE S. *et al.*, Transovarial Transmission of *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks Results in a Bottleneck for Strain Diversity. **Pathogens**. 2023 Aug 2;12(8):1010.

DE LA FOURNIERE, Sofia *et al.* Transovarial Transmission of *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks Results in a Bottleneck for Strain Diversity. **Pathogens**, v. 12, n. 8, p. 1010, 2023.

DE LA FUENTE, *et al.* Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 382-390, 2007.

DE LA FUENTE, *et al.* Functional genomics and evolution of tick–*Anaplasma* interactions and vaccine development. **Veterinary parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 175-186, 2010.

DE LA FUENTE, *et al.* Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3, p. 307–316, 26 maio 2004.

DE LA FUENTE, *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.

DE LA FUENTE, *et al.* Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. **Veterinary microbiology**, v. 88, n. 3, p. 275-285, 2002.

DE LA FUENTE, J. *et al.*, Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, p.163–173. 2001.

DE LA FUENTE, VAN DEN BUSSCHE, Ronald A.; KOCAN, Katherine M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichiae). **Veterinary parasitology**, v. 97, n. 1, p. 65-76, 2001.

DERINGER, James R. *et al.* Identification of a T-cell epitope that is globally conserved among outer membrane proteins (OMPs) OMP7, OMP8, and OMP9 of *Anaplasma marginale* strains and with OMP7 from the *A. marginale* subsp. *centrale* vaccine strain. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 1, p. e00406-16, 2017.

DOS SANTOS PEREIRA, Inês. **CONTROLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* UTILIZANDO Metarhizium anisopliae NO RECÔNCAVO DA BAHIA**. 2021.

EDWARDS, K. T.; GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A. S. Examination of the internal morphology of the Ixodid tick, *Amblyomma maculatum* Koch,(Acari: Ixodidae); a “how-to” pictorial dissection guide. **Midsouth Entomol**, v. 2, n. 1, p. 28-39, 2009.

ESTRADA-PEÑA, Agustín *et al.* Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. **BMC biology**, v. 7, p. 1-13, 2009.

ESTRADA-PEÑA, Agustín *et al.* A análise filogeográfica revela associação do patógeno transmitido por carrapatos, *Anaplasma marginale*, sequências MSP1a com características ecológicas que afetam o desempenho do vetor de carrapatos. **Biologia BMC** , v. 1-13, 2009.

EYGELAAR Dewald. *et al.* Oosthuizen MC Hemoparasitas transmitidos por carrapatos em búfalos africanos (*Syncerus caffer*) de duas áreas de vida selvagem no norte do Botswana. **Vetores de parasitas**. 2015; 8:26.

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.

FERREIRA, Tássia Alana Alves *et al.* **Diagnóstico molecular e taxas de infecção de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovídeos e artrópodes parasitas na Amazônia**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Aplicada a Agropecuária. Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019.

FERREIRA, Tássia Alana Alves *et al.* **Diagnóstico molecular e taxas de infecção de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovídeos e artrópodes parasitas na Amazônia** . 2019. Tese de Doutorado. UFRA/Campus Belém.

FOIL, Lane D.; GORHAM, J. Richard. Mechanical transmission of disease agents by arthropods. In: Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 461-514.

GALAY, Remil L. *et al.* Molecular Prevalence of *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia* in domestic large ruminants and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks from Southern Luzon, Philippines. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 746705, 2021.

GARCIA, Marcos Valério *et al.* Biologia e importância do carapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Carrapatos**, p. 17, 2019.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 3, p. 1–4, mar. 2013.

Garrity GM. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer; 2001.

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.

GONÇALVES, Patrícia Macêdo. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, p. 187-194, 2000.

GONZÁLES, J. C. O carapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): revisão histórica e conceitual. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 23-28, 2002.

GOUY, Manolo; GUINDON, Stéphane; GASCUEL, Olivier. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2010.

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

GUERRERO, Felix David. *et al.* Mecanismos de resistência aos acaricidas em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 1-6, 2012.

GUILLEMI, Eliana C. *et al.* Molecular identification of *Anaplasma marginale* in two autochthonous South American wild species revealed an identical new genotype and its phylogenetic relationship with those of bovines. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-9, 2016.

HERRERA, Angie Natalia *et al.* **Anaplasmosis bovina hiperaguda: reporte de caso *Anaplasma marginale***. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em Medicina Veterinária. Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, 2019.

HORNOK, Sándor *et al.* Molecular evidence of a badger-associated *Ehrlichia sp.*, a *Candidatus Neoehrlichia lotoris*-like genotype and *Anaplasma marginale* in dogs. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 5, p. 1302-1309, 2018.

INOKUMA, Hisashi *et al.* Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon groESL and the citrate synthase gene (gltA) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1132-1136, 2002.

JONSSON, N. N.; REID., S. W. J. **Global Climate Change and Vector Borne Diseases. The Veterinary Journal**, v. 160, n. 2, p. 87–89, set. 2000.

KESSLER, Raul H.; SCHENK, Maria Aparecida M. **Carapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. 1998.

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

KLAFKE, G. et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 73–80, jan. 2017.

KOCAN, Katherine M. et al. Desafios atuais no diagnóstico e controle da anaplasmoses bovina. **O Médico Bovino**, p. 67-77, 2012.

KOCAN, Katherine M. et al. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S285-S300, 2004.

KOCAN, Katherine M. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

KOCAN, Katherine M. et al. Current challenges of the management and epidemiology of bovine anaplasmosis. **The bovine practitioner**, p. 93-102, 2010.

KOCAN, Katherine M. et al. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. **Journal of medical entomology**, v. 29, n. 4, p. 657-668, 1992.

KOCAN, Katherine M. et al. The genus *Anaplasma*: new challenges after reorganization. 2015.

KOCAN, Katherine M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 95–107, 10 fev. 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.

KUMAR, N. et al. Molecular Assessment of *Anaplasma marginale* in Bovine and *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Tick of Endemic Tribal Belt of Coastal South Gujarat, India. **Acta Parasitologica**, v. 64, n. 4, p. 700–709, 26 mar. 2019.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEHANE, Mike J. **The biology of blood-sucking in insects**. Cambridge University Press, 2005.

LEW, A. E. et al. A *msp1α* polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 325-335, 2002.

LEW, AE et al. Um ensaio de reação em cadeia da polimerase *msp1α* para detecção e diferenciação específicas de isolados de *Anaplasma marginale*. **Microbiologia Veterinária**, v. 86, n. 4, pág. 325-335, 2002.

LICÍNIO, Christiane OL; AYRES, Flávio M. The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, p. e2882021, 2021.

MACHADO, R. Z. *et al.* Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 438–446, 4 dez. 2015.

MACHADO, Rosangela Zacarias *et al.* Molecular diagnosis and genetic diversity of tick-borne Anaplasmataceae agents infecting the African buffalo Syncerus caffer from Marromeu Reserve in Mozambique. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2016.

MACHADO, Rosangela Zacarias *et al.* Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 24, p. 438-446, 2015.

MACHADO, Rosangela Zacarias *et al.* Detecção de Ehrlichia chaffeensis em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). **Parasitologia veterinária**, v. 139, n. 1-3, pág. 262-266, 2006.

MAGATON, Hellen Christine *et al.* O PADRÃO OURO PARA DIAGNÓSTICO DA SARS-COV-2. **ANAIIS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, v. 19, n. 19, 2022.

MARQUES, Roberta *et al.* Climate change implications for the distribution of the babesiosis and anaplasmosis tick vector, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary research**, v. 51, p. 1-10, 2020.

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.

MERGEN, Maria Eduarda; SOUZA, Marília Mascarenhas. Leishmaniose Visceral canina, métodos diagnósticos e tratamento na atualidade—Revisão de literatura. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 6, n. 13, p. 1024-1036, 2023.

MOREL, N. *et al.* Strategic control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation on beef cattle grazed in Panicum maximum grasses in a subtropical semi-arid region of Argentina. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 144, p. 179–183, 1 set. 2017.

OCHIRKHUU, Nyamsuren, *et al.* Levantamento epidemiológico molecular e análise genética de infecções transmitidas por vetores em bovinos na Ilha de Luzon, Filipinas. **Parasitologia veterinária**, 2015, 212.3-4: 161-167.

OLIVEIRA-SIQUEIRA T.G.C.; AMARANTE A.F.T. **Parasitologia animal – Animais de produção**. Rio de Janeiro: UPUB, 2001.

OYARZÚN, M. P.; QUIROZ, Andres; BIRKETT, M. A. Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. **Medical and veterinary entomology**, v. 22, n. 3, p. 188-202, 2008..

PALMER, G. H. *et al.* Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology today**, v. 15, n. 7, p. 281-286, 1999.

PALMER, Guy H. et al. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5381-5384, 2004.

Perry B, Grace D. Os impactos das doenças pecuárias e o seu controlo nos processos de crescimento e desenvolvimento que são a favor dos pobres. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 2009; 364 :2643–2655.

POHL, Anna Elisabeth *et al.* Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 129-135, 2013.

RAMOS, Carlos AN *et al.* Comparação entre diversos抗ígenos para o diagnóstico de *Anaplasma marginale* por ELISA. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 37-41, 2010.

RECK, J. *et al.* Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 1, p. 59–62, 1 jan. 2014.

REINBOLD, James B. *et al.* Detecção de *Anaplasma marginale* e *A. phagocytophilum* em amostras de sangue periférico bovino por ensaio de PCR duplex com transcriptase reversa em tempo real. **Revista de microbiologia clínica**, v. 48, n. 7, pág. 2424-2432, 2010.

RIBEIRO , A. C. C. L. R.; FURLONG, J. **Controle de Carapatos**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/producao/sistemas-de-producao/manejo-sanitario/controle-de-carapatos>. Acesso em: 3 nov. 2023.

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.B., PASSOS, L.M.F. Tristeza Parasitaria bovina. **Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia**, v. 39, 36-52, 2002.

RODRIGUES DS, Leite RC. Impacto económico de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: estimativa da diminuição da produção de leite numa exploração leiteira. **Arq Bras Med Vet Zootec.** 2013; 65 :1570–1572.

RODRIGUES, Augusto *et al.* Biologia e controle de *Stomoxys Calcitrans* (Linnaeus, 1758)(Diptera: Muscidae) em áreas destinadas à produção de cana-de-açúcar. 2022.

RODRIGUES, Gratchela D. et al. Molecular of *Anaplasma marginale* Theiler (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in horseflies (Diptera: Tabanidae) in Uruguay. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 22460, 2022.

RUYBAL, P. *et al.* Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.162, n.1-2,p.176-180, maio 2009.

RUYBAL, Paula *et al.* Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. **Veterinary parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 176-180, 2009.

SACCHI, ABV *et al.* Prevalência e caracterização molecular de agentes Anaplasmataceae em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) de vida livre. **Imunologia comparada, microbiologia e doenças infecciosas**, v. 35, n. 4, pág. 325-334, 2012.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: **A laboratory manual**. 2. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v. 3104p.

SAMISH, M.; PIPANO, E.; HADANI, A. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus annulatus* ticks in cattle. **American journal of veterinary research**, v. 54, n. 3, p. 411-414, 1993.

SANTOS, G. B. **Estudo epidemiológico da tristeza parasitária bovina em rebanhos dos municípios de Petrolina e Ouricuri, estado de Pernambuco**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. Petrolina: Universidade Federal Vale do São Francisco, 2013.

SANTOS, Grace B. *et al.* Tristeza Parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1-7, 2017.

SANTOS, Grace B. *et al.* Tristeza Parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1-7, 2017.

SATURNINO, B. W. E. **Diagnóstico clínico e hematológico da tristeza parasitária em rebanhos bovinos nos Municípios de Santa Cruz e São Francisco, Paraíba**. Disponível em: <<https://repositorio.ifpb.edu.br/handle/177683/2889>>.

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.

SHAW, Susan E. *et al.* Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74-80, 2001.

SILVA JUNIOR, J. R., ANDRADE JUNIOR, L. R. P., OLIVEIRA, A. R., MARMOL, A. B., & MARMOL, G. B. **Tristeza Parasitária em Bovino Girolando –Relato de Caso**. Anais do VII Congresso de Iniciação Científica da Fundação Educacional de Ituverava. Ituverava: Fundação Educacional de Ituverava. 2018

SILVA, Jenevaldo Barbosa da *et al.* Análise dos fatores de risco relacionados à resistência ao *Rhipicephalus microplus* e à resposta imune-humoral anti-*Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros. 2012.

SILVA, Jenevaldo Barbosa *et al.* Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 4, p. 499-507, 2015.

SILVA, Jenevaldo Barbosa *et al.* Diversidade genética e filogenia molecular de *Anaplasma marginale* estudada longitudinalmente sob condições naturais de transmissão no Rio de Janeiro, Brasil. **Carrapatos e Doenças Transmitidas por Carrapatos**, v. 6, n. 4, pág. 499-507, 2015.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and emerging diseases**, v. 59, n. 4, p. 353-360, 2012.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and emerging diseases**, v. 59, n. 4, p. 353-360, 2012.

SUAREZ, Carlos E.; NOH, Susan. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 109-125, 2011.

SUDAN, Vikrant; SHARMA, R. L.; BORAH, M. K. Subclinical anaplasmosis in camel (*Camelus dromedarius*) and its successful therapeutic management. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 38, n. 2, p. 163-165, 2014.

TAVARES, D. R. **Estudo epidemiológico e fatores de risco associados à tristeza parasitária em rebanhos bovinos nos municípios de Santa Cruz e São Francisco, Paraíba**. Disponível em: <<https://repositorio.ifpb.edu.br/handle/177683/2893>>.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. Tradução: Thaís Gomes Rocha; Tradução: José Jurandir Fagliari. 4 Edição ed. Editora Guanabara Koogan.2017.

TOGNOLI, L.; CREPALDI, N.; MEDEIROS. *Haematobia irritans*: revisão literária. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** -ISSN: 1679-7353 Ano VII - Número 12 -Janeiro de 2009.

TORIONI DE ECHAIDE, Susana *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.

TRINDADE, Hébelys Ibiapina da; ALMEIDA, Katyane de Sousa; FREITAS, Fagner Luiz da Costa. Tristeza parasitária bovina–revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, 2011.

TURRUELLA, Yuneiki Fonseca; POMPA, Graciela Yera; RODRÍGUEZ, Eugenio Torres. Anaplasmosis en bovinos de la raza Siboney de Cuba, infectados con (*Boophilus*) microplus (REVISIÓN). **Redel. Revista Granmense de Desarrollo Local**, v. 4, p. 469-477, 2020.

TURRUELLA, Yuneiki Fonseca; POMPA, Graciela Yera; RODRÍGUEZ, Eugenio Torres. Anaplasmosis en bovinos de la raza Siboney de Cuba, infectados con (*Boophilus*) microplus (REVISIÓN). **Redel. Revista Granmense de Desarrollo Local**, v. 4, p. 469-477, 2020.

UILENBERG, G. Veterinary Significance of Ticks and Tick-Borne Diseases. In: **Tick Vector Biology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992, p. 23–33.

UILENBERG, Gerrit. Notes sur les babesioses et l'anaplasmoses des bovins à Madagascar. IV. Note additionnelle sur la transmission. 1970.

VEGA, Laura E. Orozco *et al.* *Anaplasma marginale* field challenge: protection by an inactivated immunogen that shares partial sequence of msp1α variable region with the challenge strain. **Vaccine**, v. 25, n. 3, p. 519-525, 2007.

VIDOTTO, M. C. et al. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1α* and *msp4* genes. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 53, n. 9, p. 404-411, 2006.

VIDOTTO, M. C. et al. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1α* and *msp4* genes. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 53, n. 9, p. 404-411, 2006.

YBANEZ, Adrian Patalinghug et al. First molecular characterization of *Anaplasma marginale* in cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Cebu, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 1, p. 27-36, 2013.

ZAUGG, Jerry L. et al. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **Journal of Wildlife diseases**, v. 32, n. 1, p. 62-66, 1996.

ZEILSTRA-RYALLS, Jill; FAYET, Olivier; GEORGOPoulos, Costa. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. **Annual review of microbiology**, v. 45, n. 1, p. 301-325, 1991.

ZHANG, Han et al. Development and Comparison of Seminested PCR, qPCR, and LAMP for the Rapid Detection of *Arthrinium phaeospermum*, the Causal Agent of Bamboo Blight. **Forests**, v. 13, n. 6, p. 850, 2022.

ANEXO 1
QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO GERAL

Propriedade: _____
____ Responsável: _____ Telefone: _____
____ Nome _____ da
Propriedade: _____ Bairro: _____
Município: _____ Coordenadas geográficas:

1. INFORMAÇÕES SOBRE A PROPRIEDADE:

Área total da
fazenda _____

Altitude: _____

Relevo: () Planície () Montanhoso

Distância entre a propriedade e mata:

Distância entre
propriedade: _____

Número total de
bovinos: _____

Tipo de exploração: () Corte () Leite () Mista

Número de ordenhas: () Uma () Mais de uma

Tipo de ordenha: () Manual () Mecânica

Em caso de ordenha mecânica: () Pasto () Sala

Média de produção de leite (litro/vaca/dia): _____

Presença de outros animais na propriedade:

Cães () Não () Sim. Quantos? _____

Gatos () Não () Sim. Quantos? _____

Equinos () Não () Sim. Quantos? _____

Galinhas () Não () Sim. Quantos? _____

Animais silvestres () Não () Sim. Quantos? _____

Outros: _____

2. Informações sobre o rebanho:

Grau de sangue do
gado: _____

Sistema de criação: () Intensivo () Semi- intensivo

Tipos de Pastagem:

Acesso à mata: () Não () Sim

Local de manejo: () Na propriedade () Outro local: _____

Acesso a áreas externas à propriedade: () Não () Sim

Compartilhamento de pastagem com outros animais: () Não () Sim.

Quais? _____

Compra de animais: () Não () Sim

Destinação de fezes, capineira ou permanência no local?

-

Condições de higiene: () Satisfatórios () Insatisfatórios

Tipo de reprodução: () Monta () Inseminação

Tipo de piso do local de permanência dos bezerros: () Concreto/ cimento () Areia/ terra

Período de maior incidência de carrapatos: () Janeiro a Março - () Abril a Agosto - () Setembro a Dezembro.

Quais critérios utilizados para escolha do carrapaticida: () Indicação Médico Veterinário () Indicação loja agropecuária

Forma de aplicação do carrapaticida: () Pour on () Pulverização

Intervalo de aplicação do carrapaticida: () Frequentes () Sem frequência

Presença de moscas na propriedade: () Presença () Ausência

Assistência Médico Veterinário: () Sem assistência () Com assistência

Quarentena na aquisição de novos animais: () Sim () Não

Acesso de Cães nas áreas de pastagem: () Sim () Não

QUESTIONÁRIO EPIEMIOLÓGICO INDIVIDUAL

Identificação do animal: _____ **Sexo do animal:** _____

Idade: 12 a 24 meses () > 36 meses () **Escore Corporal:** 3 a 3,5 () 4 a 5 ().

Procedência do animal: () Comprado () Nascido na propriedade

Histórico de doença: () Sim () Não

Nível de infestação de carapatos: () Infestação Baixa () Infestação Média.

Animal já adoeceu alguma vez: _____

Quais doenças? _____

Como foi feito o diagnóstico e o tratamento?

Assistência Médico Veterinário:
