

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Transmissão Experimental de *Borrelia anserina*
(Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758):
Parâmetros Clínicos, Bioquímicos e Anátomo -
Histopatológicos**

Marcio Barizon Cepeda

2015



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

TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DE *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758): PARÂMETROS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E ANÁTOMO-HISTOPATOLÓGICOS

MARCIO BARIZON CEPEDA

Sob a Orientação do Professor

Adivaldo Henrique da Fonseca

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

598
C399t
T

Cepeda, Marcio Barizon, 1983-
Transmissão experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758): parâmetros clínicos, bioquímicos e anátomo-histopatológicos / Marcio Barizon Cepeda - 2015.
68 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 47-57.

1. Ave doméstica - Doenças - Teses. 2. Febre recorrente - Teses. 3. Espiroquetose - Teses. 4. Carrapato - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

MARCIO BARIZON CEPEDA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/02/2015



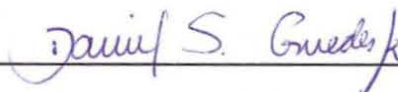
Adivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D.) UFRRJ
(Orientador)



Marilene de Farias Brito (Dr.^a) UFRRJ



Paulo Henrique Duarte Cançado (Dr.) EMBRAPA – Gado de Corte



Daniel da Silva Guedes Junior (Dr.) FIOCRUZ

Dedico esse trabalho à minha família que sempre acreditou na minha capacidade e me incentivou a seguir em frente, me apoiando de todas as formas; aos meus pais Edson e Lucimar, aos meus irmãos Edson e Patrícia, à minha namorada Aline, aos meus melhores amigos Rodrigo, Luciano e Guilherme, e à minha sobrinha e afilhada Helena, que tanta luz me trouxe nesta vida, obrigado por tudo!

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo, a Deus por sempre me acompanhar, dando força, coragem e a paz necessária para seguir adiante.

Agradeço ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, por seus ensinamentos, humildade, carinho e seu apoio incondicional durante minha passagem pelo Laboratório de Doenças Parasitárias; deixo aqui registrado minha gratidão e admiração.

Agradeço à minha irmã Patricia Barizon Cepeda pela amizade, ensinamentos, apoio e fraternidade, que foram fundamentais não só para a conclusão deste trabalho, mas também em todos os momentos da minha vida.

À minha família maravilhosa e ao meu amor Aline Braga Moreno, por estarem sempre presentes em todos os momentos, confortando, incentivando e acreditando em mim.

Um agradecimento especial ao meu cunhado e amigo Andrés Calderín García pela amizade, pelas palavras de apoio e auxílio com as análises estatísticas do trabalho.

Aos amigos, colegas e bolsistas do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio da Sanidade Animal do Convênio EMBRAPA/UFRRJ, Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, Rafaella Câmara Teixeira, Bruna de Azevedo Baêta, Carla Carolina Dias Ribeiro, Matheus Dias Cordeiro, Jéssica Fernandes Souza, Bruna Land Manier, Priscilla Nunes, Gustavo Castro, Carolina Marotta, Jenevaldo Barbosa, Lucinéia Costa Oliveira, Paulo César Magalhães e Maylin González pelo auxílio na realização do trabalho, convívio, amizade e aprendizagem.

Um agradecimento especial a Fabrício Gaudêncio e Ramon Pimenta por toda ajuda com a análise das amostras bioquímicas e manejo das aves, respectivamente.

Aos integrantes do Laboratório de Histopatologia da UFRRJ, Letícia Pinto, Ana Paula, Gabriela Cid, e em especial à Professora Doutora Marilene Brito, pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas, hospitalidade e pelos ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos professores Huarrison Santos e Cristina Amorim Ribeiro de Lima pelos ensinamentos na área de sanidade avícola e pela ajuda com a fabricação, formulação e aquisição das rações e das aves.

Ao meu amigo Sérgio Elias pela ajuda com os animais e pela sua amizade sincera e simpática, na qual me orgulho muito e levarei comigo para sempre.

Aos amigos da UFRRJ e do curso de Medicina Veterinária, Thiago Pedro Bernardo, Luciano Pereira de Souza, Guilherme Henrique Jacintho e em especial a Rodrigo Franco pelos divertidíssimos momentos de descontração e pela amizade incontestável que construímos.

A todos os funcionários e professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

A CAPES pela concessão da bolsa durante o período de Mestrado.

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho, obrigado!

BIOGRAFIA

Marcio Barizon Cepeda, filho de Edson Acácio Cepeda e Lucimar Costa Cepeda, nasceu em 19 de abril de 1983, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Concluiu tanto o ensino fundamental como o Ensino Médio na Escola Mercúrio em 1998 e 2000, respectivamente, ambos localizados na cidade do Rio de Janeiro.

No ano de 2005, ingressou no curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, colando grau e obtendo o título de Médico Veterinário em Janeiro de 2012.

Em 2014, exerceu a função de estagiário como Técnico em Laboratório no Hospital Maternidade Alexander Fleming e concluiu o Curso Técnico em Análises Clínicas pela Fundação de Apoio à Escola Técnica do Estado do Rio de Janeiro (FAETEC).

Em março de 2013 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Sanidade Animal, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES de 2013 até o presente momento. Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

RESUMO

CEPEDA, Marcio Barizon. **Transmissão Experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758): Parâmetros Clínicos, Bioquímicos e Anátomo – Histopatológicos**. Seropédica: UFRRJ, 2015. 68p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

A Espiroquetose Aviária é uma enfermidade septicêmica de curso agudo, cosmopolita, podendo acometer diversas espécies aviárias, sendo causada por *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891). Esta espiroqueta extremamente móvel pode ser encontrada no plasma sanguíneo das aves doentes, na fase aguda da doença. O experimento teve como objetivos estabelecer a transmissão experimental de *B. anserina* em *Gallus gallus* e avaliar as alterações clínicas, bioquímicas e anátomo-histopatológicas causadas pela espiroquetose aviária. Um total de 40 aves da espécie *G. gallus* foram divididas em quatro grupos inteiramente casualizados contendo dez animais cada: G1 - inoculadas com soro infectado com *B. anserina*; G2 - inoculado com soro fisiológico a 0,9%; G3 - exposto a carrapatos N3 de *Argas miniatus* infectados por *B. anserina*; G4 - exposto a carrapatos N3 de *A. miniatus* livres de *B. anserina*. O experimento durou 24 dias, sendo realizado diariamente a contagem de espiroquetas no sangue periférico das aves enfermas durante a infecção. O exame microscópico do soro dos grupos infectados, visualizados em microscopia de campo escuro, demonstrou inúmeras espiroquetas aglomeradas no pico de parasitemia. O período pré-patente e o período de patência, em dias, para o Grupo 1 foi respectivamente, $2 \pm 0,30$ e $5 \pm 1,38$. No Grupo 3, foram encontrados $5 \pm 0,97$ para o período pré-patente e $5 \pm 1,03$ para período de patência. Todas as aves dos Grupos 1 e 3 manifestaram no 3º DPI e 6º DPI respectivamente, sintomatologia que se caracterizou por inapetência, perda de peso, sonolência, diarreia esverdeada, mucosas hipocoradas, penas arrepiadas e hipertermia. Os sintomas permaneceram até o 9º DPI, quando cessou a espiroquetemia no sangue, melhorando a saúde das aves. Amostras de soro dos grupos experimentais foram coletadas, sendo a atividade de ALT e AST mensuradas, assim como o nível sérico do ácido úrico, creatinina, colesterol total, proteínas totais e glicose. Os níveis de ALT do Grupo 1 aumentaram apenas no 12º e 24º DPI em relação ao seu grupo controle e no Grupo 3 esses níveis se mantiveram elevados até o 20º DPI. A enzima AST pouco oscilou nos grupos experimentais, embora no Grupo 1 esteve aumentado no 12º DPI. O aumento do ácido úrico, das proteínas totais e de ALT nas aves infectadas cursaram com o quadro clínico e permaneceram até mesmo após o período de espiroquetemia da infecção. A histopatologia hepática revelou a presença de infiltrados inflamatórios mononucleares, focos de necrose fibrinóide, congestão, dilatação dos sinusóides, obstruções e vacuolização de hepatócitos. No baço, houve perda do tecido linfóide e necrose fibrinóide na região medular. Evidenciou-se ainda a presença de congestão e inflamação nos rins, assim como inflamação e edema de meninges. Espiroquetas foram visualizadas nos tecidos quando coradas pela prata, marcando sua presença no interior de vasos e de hepatócitos. Conclui-se que a borreliose aviária provocou alterações clínicas que coincidiram com a espiroquetemia das aves. O aumento da atividade enzimática de ALT, do ácido úrico e das proteínas totais, associados aos achados anátomo-histopatológicos, com presença das espiroquetas nos tecidos, confirmam os danos hepáticos e a septicemia da doença.

Palavras - chave: Borreliose, galinhas domésticas, carrapatos.

ABSTRACT

CEPEDA, Marcio Barizon. **Experimental transmission of *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) in *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758): Clinical Parameters, Biochemicals, Anatomical - Histopathologic**. Seropédica: UFRRJ, 2015. 68p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

Avian spirochaetosis is a cosmopolitan septicemic disease of acute stroke, which can affect various avian species and is caused by *Borrelia anserina*. This can be an extremely mobile spirochete found in the plasma of infected birds in the acute phase of the disease. The experiment aimed to establish the experimental transmission of *B. anserina* in *Gallus gallus* and evaluate the clinical, biochemical and anatomical and histopathological changes caused by infection. A total of 40 fowls were divided into four completely randomized groups of ten animals each: G1 - inoculated with serum infected with *B. anserina*; G2 - inoculated with 0.9% saline; G3 - exposed to nymphs of 3rd instar of *Argas miniatus* infected with *B. anserina*; G4 - exposed to nymphs of 3rd instar of *A. miniatus* free of *B. anserina*. The experiment lasted 24 days, being held daily, spirochetes were counted in the peripheral blood of sick birds during infection. Microscopic examination serum of infected groups, viewed in dark field microscopy, showed several spirochetes crowded at peak parasitaemia. The prepatent period and patency period in days for group 1 was, respectively, 2 ± 0 , 30 and $5 \pm 1,38$. In Group 3, it was found $5 \pm 0,97$ in the prepatent period and $5 \pm 1,03$ for the patency period. All the fowls in groups 1 and 3 expressed on day 3 and 6 after inoculation (DAI), respectively, symptoms characterized by appetite and weight loss, drowsiness, greenish diarrhea, pale mucous membranes, ruffled feathers and hyperthermia. The symptoms remained until the 9th DAI, when the spirochetemia blood ceased, improving the health of fowls. Serum samples were collected from the experimental groups, with an ALT and AST activity, and measured, as well as the level of serum uric acid, creatinine, total cholesterol, total protein and glucose. ALT levels from group 1 increased only at 12 and 24 DPI in relation to its control group, while in group 3 these levels remained high until the 20 DAI. AST enzyme oscillated less in the experimental groups, although in group 1 it was increased at 12 DAI. Increased uric acid, and ALT of total proteins in infected fowls evolved with the clinical picture and remained even after spirochaetemia infection. Liver histopathology revealed the presence of mononuclear inflammatory infiltrates, fibrinoid necrosis foci, congestion, dilation of sinusoids, obstructions and vacuolization of hepatocytes. In the spleen, there was loss of lymphoid tissue and fibrinoid necrosis in the spinal region. It also showed the presence of congestion and inflammation in the kidneys, as well as inflammation and edema meninges. Spirochetes were seen in the tissue when stained with silver, marking their presence in vessels and hepatocytes. Avian borreliosis caused clinical changes coincided with spirochetemia fowls. The increased enzyme activity of ALT, uric acid and total protein, associated with anatomical and histopathological findings with the presence of spirochetes in tissues, confirm the liver damage and septicemia disease.

Key words: borreliosis, domestic chickens, ticks.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Médias dos períodos de pré-patência e patência da infecção experimental por *Borrelia anserina* em aves (Grupos 1 e 3). 24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Carrapato adulto da espécie <i>Argas miniatus</i> .	7
Figura 2. Ciclo de vida de carrapato argasídeo, detalhando suas fases evolutivas, além da identificação dos seus estágios infectivos e de diagnóstico.	8
Figura 3. Círculo de Proteção para alojar as aves durante a fase inicial de criação.	14
Figura 4. Medição da temperatura no interior do círculo de proteção.	14
Figura 5. Infestação de pintos de 10 dias de vida com larvas de <i>Argas miniatus</i> , visando à recuperação de larvas ingurgitadas.	16
Figura 6. Improvisação de técnica para recuperação de larvas de <i>Argas miniatus</i> e utilização de uma lona porosa de cor branca envolvendo a caixa para facilitar a coleta.	17
Figura 7. Interior da caixa onde os pintos foram alojados para infestação, mostrando o fundo revestido com pedaços de papelão para servir de abrigo para as larvas ingurgitadas de <i>Argas miniatus</i> .	17
Figura 8. Método de identificação das aves através de anilha de plástico na pata, com o respectivo número da ave.	18
Figura 9. Inoculação intramuscular de soro infectado com <i>Borrelia anserina</i> em uma ave do Grupo 1.	19
Figura 10. Inoculação intramuscular de soro fisiológico a 0,9% em uma do Grupo 2.	19
Figura 11. Alimentação das ninfas de terceiro ínstar infectadas com <i>Borrelia anserina</i> em uma ave do Grupo 3.	19
Figura 12. Alimentação das ninfas de terceiro ínstar livres de <i>Borrelia anserina</i> em uma ave do Grupo 4.	20
Figura 13. Utilização da Câmara de Neubauer para a realização da contagem de espiroquetas durante o curso da infecção.	20
Figura 14. Coleta de sangue realizada na veia metatársica medial.	21
Figura 15. Visualização do soro das aves do Grupo 1, mostrando grande quantidade de espiroquetas no pico de parasitemia da infecção e o comportamento de aglomeração (Objetiva 40x).	24
Figura 16. Registro fotográfico de alguns sinais clínicos observados em aves do Grupo 1 enfermas e o aspecto das fezes durante a infecção e após a recuperação dos animais. a – Aves com comportamento sonolento; b – Ave com penas arrepiadas e sem interesse pelo alimento;	

c – Alteração na coloração das fezes durante a infecção, com consistência líquida e coloração esverdeada; d – Consistência das fezes normais após a recuperação das aves. 27

Figura 17. Fígado de ave infectada por *Borrelia anserina*, apresentando hepatomegalia e congestão. 37

Figura 18. Fígado acometido pela doença ocupando grande parte da cavidade celomática da ave, apresentando manchas esbranquiçadas e pequenas áreas claras na superfície. 37

Figura 19. Baço acometido de ave infectada, apresentando intensa congestão e consistência friável ao corte. 38

Figura 20. Rins de uma ave infectada ainda na cavidade mostrando aumento de tamanho e congestão. 39

Figura 21. Fragmento de rim de ave infectada apresentando superfícies irregulares e consistência fiável. 39

Figura 22. Registro fotográfico histopatológico das alterações observadas nos diferentes tecidos das aves dos grupos infectados por *Borrelia anserina*. (Barra = 50 µm). a – Fígado: perivasculite mononuclear (Obj. 40x); b – Fígado: perivasculite mononuclear com fibrina (Obj. 40x); c – Fígado: trombo no interior de um vaso (Obj. 25x); d – Fígado: necrose fibrinóide e perivasculite (Obj. 40x); e – Rim: perivasculite (Obj. 40x); f – Rim: congestão (Obj.16x). 42

Figura 23. Registro fotográfico histopatológico realizado através da coloração de HE, das alterações observadas nos diferentes tecidos das aves dos grupos infectados por *Borrelia anserina*. (Barra= 50µm). g – Coração: miocardite (Obj. 40x); h – Baço: necrose fibrinóide (Obj. 16x); i – Cérebro: infiltrado inflamatório perivascular mononuclear (Obj. 16x); j – Cérebro: plexocoroidite mononuclear com fibrina (Obj. 25x); k – Cérebro: edema submeningeano (Obj. 25x); l – Cérebro: inflamação mononuclear da meninge com presença de fibrina (Obj. 25x). 43

Figura 24. Registro fotográfico da visualização das espiroquetas nos diferentes tecidos das aves infectadas, corados por prata pela técnica de Whartin-Starry (Barra= 10 µm). a – Rim (Obj. 100x); b – Rim: interior de um vaso (Obj. 100x); c – Plexo coroide (Obj. 100x); d – Baço (Obj. 100x); e – Fígado: interior de hepatócito (Obj. 100x); f – Coração (Obj. 100x). 45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Curva de crescimento de *Borrelia anserina* no sangue das aves dos Grupos 1 e 3. As setas indicam o dia exato da visualização das espiroquetas em cada grupo 25
- Gráfico 2.** Representação gráfica da dinâmica de ganho de peso de *Gallus gallus* durante o período experimental. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 28
- Gráfico 3.** Representação da mensuração da temperatura corporal das aves durante todo o período experimental. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 29
- Gráfico 4.** Atividade da Alanina transaminase (ALT) nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 30
- Gráfico 5.** Atividade da Aspartato Aminotransferase (AST) nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 31
- Gráfico 6.** Concentração sérica de Ácido úrico nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 32

Gráfico 7. Concentração de Creatinina nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 33

Gráfico 8. Concentração sérica de Glicose nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 33

Gráfico 9. Concentração sérica de Colesterol total nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*). 34

Gráfico 10. Concentração sérica de Proteínas totais nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*) 35

Gráfico 11. Gráfico de *score* da análise dos componentes principais (PCA) do peso médio corporal e dos parâmetros bioquímicos 36

Gráfico 12. Chaveamento da análise dos componentes principais (PCA) do peso médio corporal e dos parâmetros bioquímicos. 36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I - Certificado de Guia de trânsito animal e de vacinação dos pintos para Doença de Marek e Bouba Aviária no incubatório.	58
Anexo II - Certificado sanitário da ausência de <i>Salmonella</i> spp e <i>Mycoplasma</i> spp nas matrizes.	59
Anexo III - Quadro da composição da ração, fabricada com a ausência de coccidiostáticos, antibióticos e promotores de crescimento, fornecida durante a fase inicial de criação das aves e quadro de exigências nutricionais da ração fabricada e fornecida às aves durante a fase inicial (1 a 28 dias de vida).	60
Anexo IV - Quadro da composição da ração, fabricada com a ausência de coccidiostáticos, antibióticos e promotores de crescimento, fornecida durante a fase de crescimento das aves e quadro de Exigências Nutricionais da ração fabricada e fornecida às aves durante a fase de crescimento (29 a 60 dias de vida).	62
Anexo V - Composição da ração fabricada com ausência de coccidiostáticos, antibióticos e promotores de crescimento, fornecida durante a fase de acabamento das aves (61 a 91 dias de vida) e Tabela de Exigências Nutricionais da ração fornecida às aves durante a fase de acabamento (61 a 91 dias de vida).	64
Anexo VI - Quadro de Exigências Nutricionais do frango de corte Embrapa 041 por fase de criação.	66
Anexo VII - Quadro de Sugestão de fórmulas de ração para frango de corte colonial.	67
Anexo VIII - Medicamentos utilizados no experimento.	68

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O Gênero <i>Borrelia</i> spp: morfologia, aspectos gerais e biologia	3
2.2. A espiroqueta <i>Borrelia anserina</i> e o vetor biológico	4
2.2.1. Histórico e classificação	4
2.2.2. Morfologia da <i>Borrelia anserina</i>	5
2.2.3. Epidemiologia	5
2.2.4. Criopreservação e manutenção de <i>Borrelia anserina</i>	6
2.2.5. Aspectos biológicos do carrapato <i>Argas (Persicargas) miniatus</i>	6
2.3. A Espiroquetose aviária	9
2.3.1. Sinais clínicos e Diagnóstico	9
2.3.2. Caracterização e Alterações bioquímicas	10
2.3.3. Caracterização e Alterações Anátomo-Histopatológicas	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Obtenção das aves	13
3.2. Local de execução do estudo	13
3.3. Criação e manejo das aves	13
3.4. Obtenção, formulação e fornecimento das aves	14
3.5. Procedimento experimental	15
3.6. Pesagem e avaliação da presença de sinais clínico das aves	15
3.7. Origem, preparo do inóculo e manutenção de <i>Borrelia anserina</i>	15
3.8. Origem e infecção dos carrapatos	15
3.9. Delineamento experimental	17
3.10. Procedimentos experimentais nos grupos	18
3.11. Espiroquetemia	20
3.12. Coleta de sangue e análise bioquímica	20
3.13. Necropsia e coleta de material	22
3.14. Exame macroscópico dos órgãos	23

3.15. Técnicas de confecção, montagem e coloração das lâminas	23
3.16. Análises estatísticas	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Parâmetros epidemiológicos e espiroquetemia	24
4.2. Sinais clínicos da infecção	26
4.3. Análise da Bioquímica sérica	30
4.3.1. Análise dos Componentes Principais	35
4.4. Aspectos macroscópicos das lesões	36
4.5. Histopatologia	39
4.5.1. Exame histopatológico das alterações causadas pela infecção	40
4.5.2. Coloração de prata e visualização das espiroquetas	44
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

A agricultura familiar exerce um papel fundamental na economia brasileira, representando uma produção de 37,87% de todo o montante nacional e abrange 85,17% dos estabelecimentos rurais (CIAS, 2010). A criação de galinha caipira colonial é uma fonte de renda adequada para os pequenos proprietários, pois a rusticidade de suas instalações facilita a reutilização de equipamentos e subprodutos. No entanto, a avicultura familiar como criação de aves de produção, apresenta algumas desvantagens como o baixo investimento em equipamentos e técnicas sanitárias inadequadas. Esses fatores são importantes na manutenção e sanidade do plantel, tendo em vista que um ineficiente planejamento pode acarretar na instalação de parasitoses (CRUZ et al., 2012).

Uma enfermidade de importância econômica, principalmente na criação e produção de aves onde é forte a inserção do sistema orgânico é a espiroquetose ou borreliose aviária (LISBÔA, 2008). Se trata de uma doença septicêmica, cosmopolita, aguda e que pode afetar diversas espécies de aves (ATALIBA, 2006), sendo causada pelo patógeno *Borrelia anserina* (SAKHAROFF, 1891). Dependendo da patogenicidade da cepa, a clínica da doença se manifesta através de um quadro caracterizado por hipertermia e polidipsia inicial, fraqueza muscular, sonolência, inapetência, diarreia esverdeada, cianose de mucosas acompanhada de hipotermia, transtornos paralíticos e morte (BOERO, 1967). A espécie *B. anserina* foi descrita pela primeira vez por Sakharoff em 1891, quando investigava a epidemiologia e a manifestação clínica dessa doença em gansos no Caucaso. No Brasil, mais precisamente no Rio de Janeiro, a enfermidade foi relatada por Marchoux e Salimbeni (1903) quando estudavam o curso da infecção natural em galinhas. A doença foi responsável por enormes mortalidades em aves de criações rústicas, com maior prevalência nas aves jovens, medidas profiláticas foram aplicadas e sua incidência foi reduzida de modo considerável (WOUDA et al., 1975).

Posteriormente ao seu relato inicial, a borreliose aviária foi notificada como a maior causa de mortalidade em aves de áreas tropicais e subtropicais da Europa, África, Índia e Indonésia; em partes da Austrália, na América Central e do Sul (MARCHOUX e SALIMBENI, 1903; McNEIL et al., 1949).

Os vetores envolvidos na transmissão de *B. anserina* são os carrapatos do gênero *Argas* (Latreille, 1796). Estes apresentam alta longevidade e funcionam como reservatórios para as espiroquetas que podem se instalar e sobreviver por longos períodos (DaMASSA; ADLER, 1979; BURGDORFER, 1985).

Os tipos de transmissão transtadial e transovariana transformam o vetor em um verdadeiro reservatório das espiroquetas e todas as fases evolutivas do carrapato são capazes de transmitir a doença (COOPER; BICKFORD, 1993).

No continente Europeu, a infecção é transmitida por *Argas persicus* (Oken, 1818) e *Argas reflexus* (Fabricius, 1794); no continente africano e na Austrália por *A. persicus* e nas Américas por *Argas miniatus* (Koch, 1844) (HUTYRA et al., 1947).

O diagnóstico da borreliose aviária pode ser feito através da constatação dos sinais clínicos característicos e a presença de infestações de carrapatos nas aves. Na fase aguda da doença, o diagnóstico pode ser auxiliado por esfregaços sanguíneos periféricos, preferencialmente corados pelo Giemsa, histopatologia dos órgãos afetados corados pela hematoxilina-eosina (SOARES et al., 2000), aposição de tecidos dos carrapatos como intestino e glândula salivar, e ainda, exame de hemolinfa e de líquido coxal em microscopia de campo escuro (BIER, 1985). Exames bioquímicos e hematológicos são importantes exames complementares por serem pouco invasivos e permitirem a obtenção de amostras com rapidez dos resultados.

A profilaxia da espiroquetose compreende o combate ao vetor biológico, através da aplicação de medidas de prevenção nos galinheiros, como a construção de alicerces sem frestas, manejo correto e higiênico das camas das aves e pulverização com acaricidas. A utilização de antibióticos do grupo das penicilinas, estreptomicinas e terramicinas têm se mostrado eficazes no tratamento das aves enfermas (HUTYRA et al., 1947; BOERO, 1967).

A espécie *B. anserina* tem sido tradicionalmente mantida em laboratório através de uma série de passagens sanguíneas em galinhas domésticas jovens e adultas ou em ovos de galinha embrionados (McNEIL et al., 1949; BARNES, 1997) e a criopreservação da cepa por longos períodos tem obtido sucesso (DHAWEDKAR; DHANESAR, 1983; LABRUNA et al., 1999). Amostras de soro infectado por *B. anserina* são mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido (LABRUNA et al., 1999) e o meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) tem sido estabelecido como o meio de escolha para o cultivo de *Borrelia* spp., pois apresenta os ingredientes essenciais pra seu crescimento e exigências nutricionais (ASLAM et al., 2012).

Por ser uma doença que afeta consideravelmente o sistema orgânico de criação de aves, o presente estudo será importante no sentido de minimizar perdas econômicas, contribuindo ainda, para um melhor entendimento da enfermidade e da biologia do agente etiológico e a relação parasito/hospedeiro

Neste sentido, objetivou-se estabelecer a transmissão experimental através da inoculação de soro e exposição de *A. miniatus* infectados por *B. anserina* em aves da espécie *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) e avaliar os parâmetros clínicos, bioquímicos e anátomo-histopatológicos da espiroquetose aviária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Gênero *Borrelia* spp: morfologia, aspectos gerais e biologia

A descrição do gênero *Borrelia* Swellengrebel, 1907 foi realizada em homenagem a Amédée Borrel. Estruturalmente, os membros deste grupo possuem formato helicoidal com 3 a 10 espiras, com dimensões de 0,2 a 0,5 mm por 3 a 30 mm. Externamente a espiroqueta possui duas membranas de revestimento, a primeira envolve um protoplasma cilíndrico de onde saem flagelos e a segunda contém muitas proteínas de superfície (KRIEG; HOLT, 1984; BARBOUR; HAYES, 1986).

São bactérias gram-negativas, microaerófilas, crescem em temperatura de 33°C em meios artificiais específicos e podem ser visualizadas com a utilização da microscopia de campo escuro e contraste de fase. Podem ser observadas também quando marcadas com corantes à base de prata em cortes histológicos comprometidos pela enfermidade (BARBOUR; HAYES, 1986; ABERER; DURAY, 1991; QUINN et al, 1994; KONEMAN, 2008).

Leeuwenhoek (1861) observou pela primeira vez a espiroqueta em material oriundo da mucosa bucal e intestinal do homem, porém apenas em 1868 na Rússia, Obermeier descobriu que em sangue de indivíduos com febre recorrente, havia a presença de espiroquetas (PÊSSOA, 1963; PAVLOVSKY, 1965). Por um bom tempo, as borrelias foram classificadas no grupo das algas, protozoários e bactérias e a partir de 1948, foram reclassificadas e incluídas em um grupo específico dentre as bactérias (PÊSSOA, 1963; KRIEG; HOLT, 1984). Na maioria dos casos, a distinção entre as espécies de borrelia é feita pela identificação do vetor específico que transmite a espiroqueta, o hospedeiro vertebrado susceptível (mamíferos ou aves) e a variação da infectividade do agente etiológico em animais de laboratório (DAVIS, 1956; FELSENFELD, 1971).

As bactérias do gênero, em sua maioria, são parasitas sanguíneos dos animais, aves e do homem. Em animais silvestres, os roedores funcionam como reservatórios naturais e hospedeiros biológicos (BARBOUR; HAYES, 1986). As espécies de borrelia foram nomeadas segundo seu vetor e a identificação se dá pela junção da biologia, bioquímica e estudos moleculares (HOOGSTRAAL, 1985; MARCONI et al., 1995).

São transmitidas por carrapatos, embora possam também ser transmitidas por culicídeos, tabanídeos e sifonápteros (MAGNARELLI et al., 1986). Segundo Restrepo et al (1994) e Schwan (1996), infecções sucessivas por borrelias sem a participação do carrapato, acarretam uma significativa redução de sua patogenicidade, podendo até se tornarem apatogênicas.

Existem mecanismos próprios das borrelias que estão diretamente relacionados à transmissão. Por exemplo, a variabilidade antigênica, seja no carrapato ou no escape do sistema imune do organismo hospedeiro praticado pela borrelia, a temperatura ambiental em que habita o carrapato, a qual por muitas vezes é capaz de prejudicar a viabilidade das espiroquetas, interferindo na fisiologia e na digestão do vetor (NAKAYAMA et al., 1989). Pesquisas sobre a dependência bioquímica entre a espiroqueta e o vetor foram feitas e estas resultaram na descoberta de que essa associação ocorre ao nível do trato intestinal do carrapato, quando do desenvolvimento e multiplicação da borrelia (HOOGSTRAAL, 1985; SCHWAN, 1996; RANDOLPH et al., 1996).

As espiroquetas podem ser transmitidas tanto transovariana como transestadialmente. Em espécies transmitidas por argasídeos, a transmissão ocorre principalmente pela forma

transovariana, embora haja também a transmissão transtadial (HOOGSTRAAL, 1985; BARBOUR; HAYES, 1986).

A passagem das espiroquetas pelo carrapato é marcada pela chegada e estabelecimento na cavidade intestinal e na sua presença nos espaços intersticiais das células intestinais. De acordo com Balashov (2005) e Zung et al (1989) com o início do repasto sanguíneo, as espiroquetas migram via hemolinfa da cavidade corporal para as regiões basal, lateral e apical das células das glândulas salivares, gânglio nervoso e outras regiões internas. O desenvolvimento e a multiplicação das borrelias no carrapato são influenciados por diversos processos fisiológicos durante o ciclo de vida do vetor. Diminuição do número de espiroquetas conforme o carrapato vai mudando de estágio e o número excessivo de espiroquetas, são exemplos de limitação da infecção pelo vetor.

Atualmente são reconhecidos cinco tipos de enfermidades causadas por microrganismos do gênero *Borrelia* que podem acometer animais e humanos. A febre recorrente foi a primeira borreliose descrita como causadora de enfermidade no ser humano, tendo como agente a *Borrelia recurrentis* (Lebert 1874) Bergey et al. 1925 (WANG et al., 1997) *lato sensu* com mais de 20 espécies, cujos vetores são carrapatos do gênero *Ornithodoros* Koch, 1837 (PAVLOVSKY, 1965). A espiroquetose aviária descrita em seguida, tem como agente a *B. anserina*, cujos vetores são os carrapatos do gênero *Argas*, que acometem aves de diversas ordens taxonômicas (QUINN, 1994). A borreliose bovina, cujo agente é a *Borrelia theileri* (Leveran, 1903) pode também acometer ovinos e equinos e tem como vetores carrapatos ixodídeos, principalmente o *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (NEITZ, 1956; CALLOW, 1967). A mais recente é o aborto epizootico bovino, que tem como agente etiológico a *Borrelia coriacea* Johnson, 1987 e o *O. coriaceus* Koch, 1844 como vetor (JOHNSON et al., 1987; ZINGG; LEFEBVRE, 1994).

O maior grupo é o da borreliose de Lyme constituindo-se em uma enfermidade cosmopolita, infecto-contagiosa de caráter multissistêmico e que acomete humanos e animais. Até o momento, os principais agentes descritos pertencem às seguintes espécies/genoespécies: *Borrelia burgdorferi* Johnson et al., 1984, *Borrelia garinii* (Baranton et al., 1992), *Borrelia lusitaniae* Le Fleche et al., 1997, *Borrelia valaisiana* Wang et al., 1997, *Borrelia afzelli* (Canica et al., 1993), *Borrelia japonica* Kawabata et al., 1993, *Borrelia miyamotoi* (Fukunaga et al. 1995 et al., 1993), *Borrelia andersoni* Marconi et al., 1995 e *Borrelia lonestari* (Barbour et al., 1996).

2.2. A espiroqueta *Borrelia anserina* e o vetor biológico

2.2.1. Histórico e Classificação

A espiroquetose aviária é uma enfermidade septicêmica aguda, cosmopolita, que acomete aves de diferentes espécies, sendo causada por *B. anserina*. Este agente etiológico foi descrito pela primeira vez em 1891 por Sakharoff, após um grande surto da infecção em gansos *Anser cygnoides* Linnaeus, 1758 na Rússia. Após seu relato inicial, a borreliose aviária foi notificada como a maior causa de mortalidade em aves, em áreas tropicais e subtropicais da Europa, África, Índia e Indonésia; em partes da Austrália, na América Central e do Sul (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; McNEIL et al., 1949). Foram relatados casos de espiroquetose aviária em galinhas, perus (McNEIL et al., 1949) e faisões mongolianos (MATHEY, 1955) nos Estados Unidos (ROKEY, 1961) e também no Novo México e Texas (FRANCIS, 1956), porém nestes últimos o microrganismo não foi detectado no sangue das aves parasitadas. Em 1923, no Sudão, o primeiro caso de borreliose aviária foi relatado em

galinhas domésticas e a doença foi descrita como a maior causa de morte naquele período. No Paquistão, *B. anserina* foi isolada de *Argas* sp. (ASLAM et al., 2012). Cooper e Bickford (1993) relataram um surto em galos de rinha no estado da Califórnia, Estados Unidos da América. Marchoux e Salimbeni (1903) foram os primeiros a relatar no Brasil um surto natural em galinhas, e através de estudos, demonstraram que carrapatos do gênero *Argas* eram os vetores responsáveis pela transmissão do patógeno de galinhas doentes para outras saudáveis.

Em muitos países, no passado, a espiroquetose foi relatada como uma doença severa que afetava a indústria avícola (ARAGÃO, 1911; GORRIE, 1950) e atualmente está limitada a pequenas criações de subsistência ou venda para locais restritos onde há o carrapato vetor.

Sakharoff, em 1891 nomeou o organismo como *Spirochaeta anserina* (WENYON, 1926). Contudo, durante o início do século XX, *B. anserina* foi denominada de diferentes maneiras (KNOWLES et al., 1932). Encontram-se no Manual Bergey de Bacteriologia Determinativa, edição de 1984, as seguintes sinonímias: *Spirochaeta gallinarum*, *Treponema anserinum*, *Spirochaeta anserina* e *Spirochaeta anatis* (KRIEG; HOLT, 1984).

Estas diversas nomeações ocorreram pelo fato de testes de imunidades cruzadas em aves de laboratório com cepas de diferentes regiões terem dado negativos. A classificação taxonômica desta espiroqueta, de acordo com os táxons de bactérias (BARBOUR; HAYES, 1986; NCBI, 2005), está representada da seguinte maneira:

Reino - Procaryotae

Classe - Spirochaetes

Ordem - Spirochaetales

Família - Spirochaetaceae

Gênero - *Borrelia*

Espécie - *Borrelia anserina*

2.2.2. Morfologia da *Borrelia anserina*

O agente etiológico da espiroquetose aviária é a *B. anserina*, uma bactéria Gram-negativa, microaerófila, de corpo helicoidal, com aproximadamente 15 a 20 fibrilas axiais ou flagelos periplasmáticos (HOLT *et al.*, 1994). São extremamente móveis, possuem de 4 a 7 ondulações e apresentam um único cílio em cada extremidade (BOERO, 1967). São constituídas de um cilindro protoplasmático, onde em sua região terminal estão inseridos seus flagelos periplasmáticos (BARBOUR; HAYES, 1986). Morfologicamente, o gênero *Borrelia* também possui número reduzido de espiras em detrimento de outras bactérias da família (PFISTER et al., 1994; QUINN et al., 1994), entretanto dentro de uma mesma espécie pode haver pleomorfismo (BENNETT., 1995). Sua reprodução se dá por meio de fissão binária transversal (AUSTIN, 1993).

2.2.3. Epidemiologia

A espiroquetose aviária foi diagnosticada no Rio de Janeiro por Marchoux e Salimbeni, em 1903 e é uma doença septicêmica aguda que acomete aves dos grupos dos galiformes, anatídeos, passeriformes, columbiformes e algumas aves silvestres (WOUDA et al., 1975; QUINN et al., 1994). Os principais hospedeiros naturais são a galinha doméstica

(*G. gallus*), os perus (*Melleagris gallopavo*), patos (*A. cygnoides*), faisões (*Phasianus colchicus*) e os canários (*Serinus canarius*) (McNEIL, et al., 1949).

Segundo estudos de Hutyra et al (1947), o período pré-patente da infecção nas aves, quando transmitida por picadas de carrapatos infectados, é de quatro a seis dias e o período de incubação da doença é em média de três a oito dias (BOERO, 1967; BIER, 1985). Estudos experimentais envolvendo infecção com *B. anserina*, demonstraram que o período pré-patente é de 48 horas pós-inoculação de sangue citratado infectado por via intramuscular (SHOMMEIN; KHOGALI, 1974; BANDOPADHYAY; VEGAD, 1983).

2.2.4. Criopreservação e manutenção de *Borrelia anserina*

A criopreservação é uma técnica de eleição em muitos bancos de microrganismos, tendo em vista que fornece uma contínua fonte de tecidos e células vivas geneticamente estáveis para diversos fins, além de auxiliar em pesquisas e processos biomédicos (BROCKBANK et al., 2007). Culturas bacterianas são mantidas a longos prazos através da padronização das técnicas de congelamento (HOLLAND et al., 2003). Segundo Michel e Garcia (2003), infecções experimentais utilizando bactérias criopreservadas, têm comprovado que o agente etiológico mantém sua virulência após o processo de congelamento a -70°C . Uma variedade de experimentos, onde se foi necessário a manutenção de *B. anserina* foram realizados a partir de sua refrigeração e congelamento.

Labruna et al (1999), antes da criopreservação, submeteram amostras de soro de aves experimentalmente infectadas a dois processos de estabilização, utilizando glicerol a 50% e dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10%. Embora a adição de ambos os estabilizantes terem mantido a infectividade da cepa, o DMSO a 10% no soro de galinha se mostrou mais eficiente como criopreservante.

Muitos estudos sobre a preservação, estabilização e o meio de suspensão mais eficazes para conservar a cepa de *B. anserina* foram realizados. Dhawedkar e Dhanesar (1983), após muitos estudos com a *B. anserina* no nitrogênio líquido, comprovaram que o sangue infectado adicionado de citrato de sódio, estabilizante de glicerol 6 a 10% e o meio de Hank para suspensão, obtiveram resultados satisfatórios.

B. anserina tem sido mantida em laboratório através de passagens sanguíneas sucessivas em aves jovens ou ovos embrionados (LEVINE et al., 1990; BARNES, 1997;). McKercher (1949) submeteu uma cepa de *B. anserina* por vinte passagens sucessivas em ovos embrionados, obtendo resultados satisfatórios quando a inoculação foi feita sobre a membrana cório alantóide. O cultivo *in vitro* de *B. anserina* é um procedimento não muito simples, pelo fato desta bactéria ter uma característica fastidiosa e necessitar de um alto padrão nutricional do meio (McNEIL et al., 1949; MERCHANT; PACKER, 1965; HOLT et al., 1994). Levine et al (1990), após estudar o comportamento de *B. anserina* no meio BSK, relatou que as espiroquetas, por volta da décima segunda passagem, tiveram sua virulência bastante reduzida.

2.2.5. Aspectos biológicos do carrapato *Argas (Persicargas) miniatus*

O vetor responsável pela transmissão da borreliose aviária é um carrapato pertencente à família Argasidae (Canestrini, 1890) e ao gênero *Argas*. Na região neotropical são conhecidas 10 espécies do gênero, que abrangem cerca de 60 espécies em todo o mundo. Na Europa, a transmissão ocorre pelo parasitismo de *A. persicus* e *A. reflexus*. Em Portugal, foi

relatado pela primeira vez a presença de *A.(A) reflexus reflexus*, em locais onde existiam ninhos de pombos e em paredes de madeira onde serviam de ninhos de pardais (ROSA et al, 2004). Na África e na Austrália a enfermidade é transmitida por *A. persicus*. Primeiros registros de *A. persicus stricto sensu* foram encontrados no sul da Austrália, sendo a única espécie encontrada em aves domésticas (PETNEY, 2004). Esta espécie é um dos principais vetores que transmitem uma diversidade de agentes etiológicos nesta região. Na África, *Argas africanus* Hoogstraal et al., 1975 foi descrito e seus estágios imaturos e adultos criados em laboratório (HOOGSTRAAL et al., 1975), sendo seu parasitismo ligado à aves selvagens. Nas Américas, a doença é transmitida por *A. miniatus* (HUTYRA, et al., 1974).

O carrapato da espécie *A. (P.) miniatus* (**Figura 1**) é a única espécie do gênero que ocorre no Brasil, e tem como hospedeiros as aves domésticas (*G. gallus*). Nas Américas do Sul e Central, casos de sua ocorrência foram relatados. Apenas no Brasil, estudos realizados por Rohr (1909), Magalhães (1979) e Schumaker et al. (1988), evidenciaram aspectos de sua biologia. De acordo com Kohls et al (1970), essa espécie de carrapato é de suma relevância econômica no Continente Americano, pois está associada a um quadro anêmico e espoliativo das aves parasitadas, assim como a capacidade de transmitir *B. anserina* e outros patógenos. Não se conhece sobre a existência de hospedeiros silvestres de *A. (P.) miniatus*.

Esta espécie de argasídeo se mantém na natureza principalmente em pequenas criações rústicas e domésticas de *G. gallus* e sua importância se deve às perdas na produtividade, decorrente do hematofagismo e da transmissão de agentes patogênicos, dentre os quais pode-se citar *B. anserina*, transmitida pelas vias transestadial e primordialmente transovariana (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; HOOGSTRAAL, 1979; LISBÔA, 2006).

A paralisia por carrapatos é um quadro induzido pelas larvas em aves jovens, principalmente no final do ingurgitamento (GOTHE; KOOP, 1974; MAGALHÃES, 1979; MANS et al., 2004) cuja ocorrência e gravidade dependem da quantidade de neurotoxina que é liberada nos tecidos da ave.



Figura 1. Carrapato adulto da espécie *Argas miniatus*. Fonte: <http://cloud.cnpqc.embrapa.br/controlado-carrapato-ms/museu-do-carrapato/>

Na ausência de seus hospedeiros, os carrapatos argasídeos podem sobreviver por longos períodos (HOOGSTRAAL, 1985) e atuam como reservatórios naturais, nos quais as espiroquetas podem se manter vivas por períodos prolongados.

Argasídeos são carrapatos heteroxenos, de hábito alimentar noturno, que apresentam no seu ciclo de vida (**Figura 2**) características biológicas de estágio larval, que permanece sobre o hospedeiro pelo período de 3 a 7 dias para se alimentar, ninfas que realizam de 3 a 5 mudas ou até 7 estágios ninfais dependendo da espécie, estágios ninfais e adultos que se alimentam entre 10 e 45 minutos, preferencialmente à noite, além de possuírem dimorfismo sexual pouco evidente (KOHLS et al., 1970). As fêmeas dependem do repasto sanguíneo e de pelo menos uma cópula inicial para realizar a postura (RHOR, 1909).

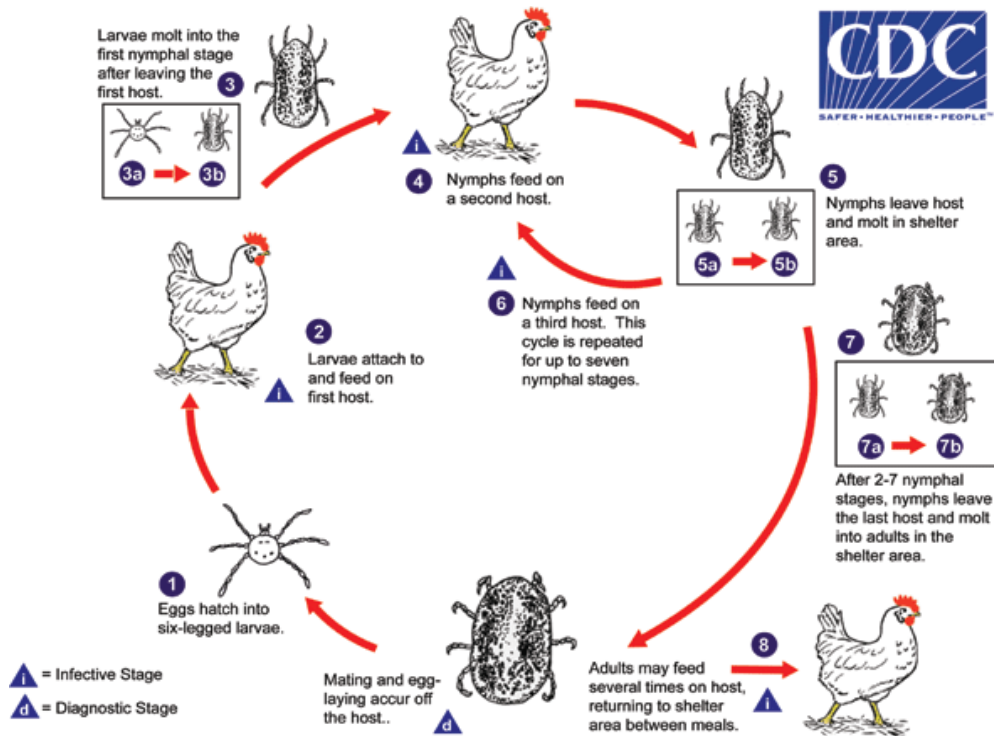


Figura 2. Ciclo de vida de carrapato argasídeo, detalhando suas fases evolutivas, além da identificação dos seus estágios infectivos e de diagnóstico. Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>.

Em sua fase de vida livre, o carrapato pode ser encontrado em regiões do galinheiro com pouca luminosidade, formando ninhos e realizando as etapas de muda, período de ecdise e cópula. O período de fixação no hospedeiro está diretamente relacionado à eficiência da transmissão, embora para os argasídeos esse tempo não seja relevante (DODGE, 1973; HOOGSTRAAL, 1985; SONENSHINE, 1991). Segundo os estudos realizados por Balashov (1972) e Hoogstraal (1985), na família Argasidae, a transmissão de borrelia pode ocorrer pela saliva e também via líquido coxal.

A interação da borrelia com o carrapato se manifesta de uma forma tão estreita, que a espécie pode ser isolada e identificada com o auxílio do xenodiagnóstico (APPEL et al., 1993). Três dias após a alimentação em uma ave infectada, já é possível detectar as espiroquetas no líquido coxal dos carrapatos. Dentro de 14 dias, decorrente de um processo de multiplicação no interior do carrapato, as espiroquetas já se encontram instaladas por todo o corpo, principalmente nas glândulas salivares e tubos de Malpighi (BIER, 1985). No

momento da transmissão de *A.(P) miniatus* para uma ave susceptível, a saliva do carrapato age farmacologicamente, bloqueando células fagocitárias e inflamatórias, contribuindo para a penetração e multiplicação do patógeno (RIBEIRO et al, 1987; URIOSTE et al, 1994).

Boero (1967) afirma que quando o carrapato alcança seu limite de repleção e ingurgitamento, o líquido coxal é liberado na região próxima das partes bucais. As espiroquetas, que estão presentes na hemocele e em todo o organismo do carrapato, migram para o órgão coxal e são expelidas juntamente com o líquido para a região da picada (BONÉ, 1939). A transmissão ocorre pela penetração das espiroquetas através das lesões ocasionadas pela introdução do aparelho bucal dos carrapatos.

A diferença entre os machos e as fêmeas é evidenciada morfológicamente pelas dimensões e pelas características sexuais secundárias (MAGALHÃES, 1979). O período de jejum influencia o peso dos instares ninfais, onde em condições de jejum prolongado (60 dias) o número de instares ninfais é alterado (SANTOS, 2008). Todos os instares do ciclo de vida do carrapato são capazes de transmitir *B. anserina* (COOPER; BICKFORD, 1993).

Colônias de *Argas* spp. infectadas com *B. anserina* têm sido usadas para manutenção de bactérias viáveis e patogênicas (LABRUNA et al., 1999), pois os carrapatos atuam como reservatórios naturais nos quais espiroquetas sobrevivem por um longo tempo (BURGDORFER, 1985).

2.3. A Espiroquetose aviária

2.3.1. Sinais clínicos e Diagnóstico

Os sinais clínicos da enfermidade são caracterizados por hipertermia e polidipsia inicial, profunda fraqueza muscular, sonolência, inapetência, diarreia verde escura, podendo evoluir para um quadro de cianose com hipotermia, paralisia e morte (LISBÔA, 2006). Nas aves enfermas ocorre ainda hepatomegalia com presença de manchas esbranquiçadas e/ou fígado com aspecto de noz moscada e esplenomegalia (BOERO, 1967; BIER, 1985).

O diagnóstico de borreliose causada por *B. anserina* em aves durante a fase aguda pode ser realizado através de esfregaços sangüíneos periféricos, preferencialmente corados pelo Giemsa, e através de exames histopatológicos dos órgãos afetados, corados pela hematoxilina-eosina (SOARES et al., 2000). Pode-se utilizar também como auxílio diagnóstico, a aposição de tecidos dos carrapatos como intestino e glândula salivar, e ainda, exame de hemolinfa e de líquido coxal em microscopia de campo escuro (BIER, 1985). A espiroqueta se encontra no plasma sangüíneo das aves infectadas durante os estágios iniciais da doença (DICKIE; BARRERA, 1964; BURGDORFER; SCHWAN, 1991). A conclusão do diagnóstico pode ser auxiliada pela investigação e confirmação da existência do carrapato vetor nos galinheiros e a presença de larvas ingurgitadas parasitando as aves enfermas (BOERO, 1967).

Surtos são comumente reportados, mas o diagnóstico laboratorial é dificultado, haja visto que geralmente é realizada antibioticoterapia nas aves imediatamente após o aparecimento de mortalidade (GARG; GAUTAM, 1971).

2.3.2. Caracterização e alterações bioquímicas

Os valores de uma análise sanguínea hematológica e bioquímica são amplamente utilizados para se conhecer o estado fisiológico de um animal. Nas aves, esses valores podem ser influenciados pela idade, habitat, sazonalidade, momento reprodutivo, tipo de criação, estado nutricional e estresse ambiental (CAMPBELL, 2004; THRALL, 2004). O máximo de volume de sangue que pode ser coletado equivale a 2% do peso corporal em frangos saudáveis. Em contrapartida, em animais doentes esse volume de sangue coletado com segurança, é no máximo 1% do peso corporal (LUMEIJ, 1997). Os locais de eleição para coleta de sangue em aves são a veia jugular, veia ulnar, veia metatársica medial, seio venoso caudal occipital e através da punção cardíaca (LEWANDOVSKI et al., 1986).

Nas aves, os rins auxiliam a excreção de ácido úrico pelos túbulos renais (REECE, 2006), sendo juntamente com a uréia, os testes bioquímicos utilizados para avaliar a função renal, embora, a uréia possua valor diagnóstico pouco significativo quando comparada ao ácido úrico (AMAND, 1986). O ácido úrico é o principal metabólito nitrogenado das aves, com aproximadamente 60 a 80% do total nitrogenado excretado pela urina, sendo a maior parte de sua concentração sanguínea eliminada via secreção tubular.

Os níveis de ácido úrico normais para aves jovens variam de 1 a 2 mg/dL, enquanto que nas aves em postura, os níveis são de 2 a 7 mg/dL. Concentrações sanguíneas de ácido úrico superiores a 15 mg/dL, sugerem distúrbios na função renal que podem ser causadas por nefropatias, toxinas ou obstruções (AMAND, 1986; LUMEIJ, 1997; SCHIMDT et al., 2007). A dosagem de creatinina em aves para fins de diagnóstico possui pouca importância, pois a creatina é eliminada antes da conversão em creatinina, sendo ideal a dosagem das concentrações plasmáticas de creatina para detectar uma possível redução na taxa de filtração glomerular (LIERZ, 2003).

Assim como nos mamíferos, a dosagem das atividades enzimáticas nas aves são essenciais para detectar distúrbios hepatocelulares ou exacerbação de sua produção. A enzima aspartato aminotransferase (AST) atua como um marcador sensível inespecífico de alterações hepatocelulares nas aves. Elevações da concentração sanguínea de AST podem sugerir um quadro de lesão grave e difusa, além de alterações musculares devido à sua alta inespecificidade (KANEKO et al., 1997). Valores de AST acima de 275 UI/L estão associados às lesões hepáticas e musculares, assim como valores superiores a 800UI/L sugerem danos hepáticos severos (CAMPBELL, 2004). Da mesma forma que em equinos e ruminantes, nas aves, a enzima alanina aminotransferase (ALT), encontra-se principalmente no citosol dos hepatócitos e das células musculares. Geralmente, elevações na atividade da ALT estão relacionadas à lesão hepática ou muscular (JAENSCH, 2000; HARR, 2002; GRUNKEMEYER, 2010). A atividade da ALT na maioria das espécies de aves varia de 19 a 50 UI/L (LUMEIJ, 1997; CAMPBELL, 2004).

As concentrações de glicose no sangue variam dependendo da espécie e na maioria das espécies variam de 200 a 500 g/L (THRALL et al., 2004). A hipoglicemia da ave pode ser provocada por inanição prolongada, doença hepática severa, septicemia, enterotoxemia e problemas endócrinos como hipotireoidismo. O quadro hiperglicêmico é estabelecido em situações onde as aves apresentam no sangue, altos níveis de glicocorticoides endógenos ou exógenos em situações como esforço, excitação, temperaturas extremas, estresse ou medicação com glicocorticoides (CAPITELLI; CROSTA, 2013).

Os valores de proteína total nas espécies de aves costumam ser menores quando comparados com os dos mamíferos, geralmente variam de 2,5 a 4,5 g/L (HARR, 2002). A hipoproteinemia pode ser causada por excesso de hidratação, diminuição da produção de

albumina ou globulinas e pela perda de proteínas associada a hemorragia, vasculite, nefropatia ou enteropatia. Já nos casos de elevação da concentração de proteínas, os valores passam a ser mais significativos quando avaliados concomitantemente com o hematócrito e sugerem desidratação ou aumento na síntese de globulinas (MELILLO, 2013; CAPITELLI; CROSTA, 2013).

O colesterol é eliminado na forma de ácidos biliares e os valores de referência para aves variam de 100 a 250 g/L. Casos de obstrução biliar extra-hepática, fibrose hepática, lipemia, inanição, hiperplasia de condutos biliares ocasionam altos valores de colesterol. Níveis reduzidos de colesterol podem estar associados a fases terminais da integridade hepática e um quadro de inanição (HOCHLEITHNER, 1994; THRALL et al., 2004).

Outros estudos com infecções experimentais em *G. gallus*, também relatam alterações na bioquímica sérica de aves enfermas, como o realizado por Rivetz et al (1977a), após infectar galinhas com cepas de Newcastle patogenicamente diferentes; Rivetz et al (1977b), após transmitir experimentalmente *B. anserina* em galinhas domésticas e Vashist (2011) através da transmissão de *B. anserina* e *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941).

2.3.3. Caracterização e alterações anátomo-histopatológicas

McNeil (1949) após estudar a infecção por *B. anserina* em perus, detalhou o exame histopatológico e as alterações causadas pela doença no baço, fígado, pulmões, rins, miocárdio, intestino e cérebro. Shommenin e Khogali (1974) realizaram um estudo sobre a histopatologia e o diagnóstico da borreliose aviária, através de exames dos órgãos afetados corados pela hematoxilina-eosina (HE). As espiroquetas podem ser visualizadas em tecidos, quando utilizada coloração à base de prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al., 1994).

As lesões mais importantes observadas no exame *pós-mortem* das aves infectadas são encontradas no baço e fígado. O sistema imunológico das aves assemelha-se ao dos mamíferos (VAINIO; IMHOF, 1995), todavia, a estrutura e a diferenciação dos órgãos apresentam diferenças. O baço é o órgão linfóide secundário mais importante nas aves, possui formato arredondado e segmentado em dois compartimentos: o primeiro é responsável por armazenar eritrócitos e deter antígenos, chamado polpa vermelha e o segundo é encarregado das respostas imunológicas, rico em linfócitos, chamado polpa branca (TIZARD, 2002). Na espiroquetose aviária, o aumento do baço é constante, com lesões caracterizadas por áreas de infartos anêmicos e hemorrágicos. Estas lesões são produzidas por embolias capilares devido ao grande acúmulo de espiroquetas durante o pico de parasitemia (BOERO, 1967). Nasri et al (2010) e Bandopadhyay e Vegad (1983), estudaram a patologia da espiroquetose aviária em aves de diferentes idades e demonstraram que o baço de todas as aves infectadas no experimento apresentaram graus variados de aumento do órgão e manchas em sua superfície. Microscopicamente, o tecido esplênico acometido evidencia a presença de inúmeras células monocitárias, inclusões e vacuolizações devido a intensa atividade dos macrófagos (BOERO, 1967).

Inúmeras alterações hepáticas podem ser encontradas no fígado de frangos, que podem incluir distúrbios circulatórios, tóxicos, infecciosos e neoplásicos. Diversas lesões no fígado são inespecíficas quanto à etiologia, mas fornecem informações essenciais sobre a ocorrência de enfermidades sistêmicas (HOERR, 1996). As alterações hepáticas macroscópicas podem afetar sua forma, coloração, tamanho e consistência, além da produção de lesões visíveis. De acordo com Boero (1967), o fígado acometido pela borreliose, apresenta-se aumentado de tamanho, friável, com pequenos focos de necrose, mostrando degeneração gordurosa difusa com aspecto brilhante e coloração amarelada. A vesícula biliar encontra-se distendida e repleta, contendo bile verde escura e espessa.

À necropsia, os rins encontram-se hiperêmicos e hemorrágicos, com áreas extensas de congestão, aumentados e levemente friáveis. Microscopicamente, ocorre também uma intensa descamação dos tubos coletores com depósitos hialinos e uma infiltração linfocítica no tecido intersticial. O coração apresenta lesões principalmente à nível de miocárdio, constituindo um processo inflamatório da região. Outras alterações podem ainda ser encontradas como, tumefação das fibras musculares e pericardite com presença de um exsudato fibrinoso da cavidade (McNEIL, 1949; BOERO, 1967).

No SNC, mais precisamente no cérebro e cerebelo são encontradas as alterações mais características da enfermidade, como uma grande área de congestão meníngea, presença de perivasculite e hiperemia do córtex (BOERO, 1967).

Conforme Hutyra et al (1947), as espiroquetas multiplicam-se primeiramente no fígado, no baço e na medula óssea. Quatro a seis dias depois, migram para a circulação sanguínea onde ocorre intensa multiplicação, produzindo substâncias tóxicas e levando o hospedeiro a acessos febris, acúmulos celulares e perivasculites nos órgãos acometidos.

Técnicas de coloração são amplamente utilizadas para a observação das espiroquetas nos tecidos acometidos pela infecção por *B. anserina*. Técnicas de impregnação por prata são as mais eficazes na demonstração de algumas bactérias específicas, como *Helicobacter pylori* (Marshall e Warren, 1980), *Legionella pneumophila* (Brenner; Steigerwalt; McDade, 1979), além do grupo das espiroquetas. Levaditi (1905) utilizou a impregnação por prata em blocos de tecido para visualizar *Treponema pallidum* (Schaudinn e Hoffman, 1905) o agente causador da sífilis. Vail (1987) e Churukian (1988) descreveram a utilização de forno microondas como uma das modificações feitas para aprimorar a técnica de coloração de prata.

Burns (1982), utilizando o método modificado de coloração de prata de Dieterle conseguiu demonstrar espiroquetas em cortes de tecido intestinal. A técnica modificada de Whartin-Starry (1920) é geralmente muito utilizada nos laboratórios, pois envolve procedimentos que coram os organismos de forma consistente e produz eficientemente uma coloração de fundo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das aves

Para realização do experimento foram adquiridas 40 aves de 1 dia de vida, de mesmo lote, sexo e da espécie *G. gallus*, linhagem comercial “Redbro Plumé” ou “Caipira Francês” com aptidão para corte. As aves foram obtidas de um núcleo avícola localizado no município de Caxias do Sul – RS, classificado por sua finalidade como Granja de Matrizes de Galinha (*G. gallus domesticus*). As aves foram vacinadas ainda no incubatório contra a Doença de Marek e Bouba aviária e monitoradas segundo o certificado de vacinação e guia de trânsito animal (**Anexo I**) e suas matrizes foram consideradas isentas de *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp. (**Anexo II**).

3.2. Local de execução do estudo

As aves foram criadas e mantidas no biotério pertencente ao Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e biotério anexo, ambos localizados no prédio do Projeto Sanidade Animal (PSA/UFRRJ).

3.3. Criação e manejo das aves

As aves foram acondicionadas em um círculo de proteção característico para esta fase inicial de crescimento das aves, com dimensões e recursos ideais, em relação à altura, diâmetro, arraçoamento e água, visando maior conforto das aves no interior da construção (**Figura 3**). A cama do interior do círculo de proteção foi revestida por maravalha para facilitar a absorção dos excrementos. Antes da chegada das aves, foi instalada uma campânula para fornecer o aquecimento adequado do ambiente a uma temperatura aproximada de 32°C (**Figura 4**). Até o sétimo dia de vida das aves, a temperatura foi mantida por volta de 30°C, o diâmetro do círculo de proteção foi aberto gradativamente e as aves foram realojadas em gaiolas suspensas. Todas as técnicas e atividades exercidas nesta etapa de criação e manejo dos pintos, com o propósito de fornecer o máximo de conforto e bem-estar, foram seguidas rigorosamente (AVILA, 2004).

A partir da segunda semana de vida até o término do experimento, as aves foram mantidas em gaiolas suspensas, em um recinto com janelas teladas, ventilado, com presença de exaustão de ar. Foram alojadas duas aves por gaiola, com fornecimento diário de água e ração, todas submetidas às mesmas condições de luminosidade, temperatura, ventilação e possíveis causas de estresse. Todo o experimento foi realizado no período de abril a setembro de 2014.



Figura 3. Círculo de Proteção para alojar as aves durante a fase inicial de criação.



Figura 4. Medição da temperatura no interior do círculo de proteção.

3.4. Obtenção, formulação e fornecimento de ração às aves

A alimentação das aves durante o experimento foi conduzida de modo a atender todas as necessidades e exigências nutricionais para frangos de corte desta linhagem. Para obter o desenvolvimento adequado das aves, em todas as etapas do manejo alimentar, foram seguidas formulações, quantidades e exigências nutricionais específicas de cada fase. A ração foi elaborada na Fábrica de Ração do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e produzida à base de suplementos minerais e vitamínicos com ausência de coccidiostáticos, antibióticos e de promotores de crescimento.

A formulação, composição e as exigências nutricionais da ração foram calculadas e produzidas de acordo com o peso e a fase de crescimento das aves, que compreendeu as fases inicial (**Anexo III**), de crescimento (**Anexo IV**) e acabamento (**Anexo V**). As rações foram formuladas de acordo com as tabelas de “Exigências Nutricionais para frangos de corte

colonial Embrapa 041 por fase de criação” (BASSI et al., 2006) (**Anexo VI**) e de “Sugestão de fórmulas de ração para frangos de corte colonial” (AVILA et al., 2005) (**Anexo VII**). A quantidade de ração oferecida às aves durante as fases de crescimento foi aumentada gradualmente para suprir as necessidades nutricionais e fisiológicas dos animais.

3.5. Procedimento experimental

No início do experimento, as aves encontravam-se com 49 dias de idade e no dia anterior foram submetidas à análise por meio de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa (eosina azul de metileno, Giemsa - Merck) para avaliar se havia presença de hemoparasitos e todas foram negativas segundo a análise microscópica.

3.6. Pesagem e avaliação da presença de sinais clínicos nas aves

A pesagem das aves foi realizada em sete momentos diferentes durante o procedimento experimental, através de balança digital portátil com gancho. A medição ocorreu aos 49, 53, 57, 61, 65, 69 e 73 dias de vida.

As aves foram observadas diariamente em relação às alterações clínicas como cor das mucosas, cor e consistência das fezes, letargia ou prostração, penas arrepiadas, ingestão de alimentos e a verificação da temperatura corporal foi realizada diariamente até o décimo sexto dia pós-inoculação (DPI). A mensuração da temperatura retal foi feita através de termômetro clínico digital, levando-se em consideração aspectos individuais das aves, como a influência do peso, idade, umidade relativa do ar e consumo de alimento nas possíveis oscilações na temperatura.

3.7. Origem, preparo do inóculo e manutenção de *Borrelia anserina*

O soro com a cepa de *B. anserina* foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Essas amostras de soro infectadas foram mantidas em nitrogênio líquido, submetidas a uma temperatura de -196°C, com adição de DMSO a 10% como criopreservante (LABRUNA et al., 1999) no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/ Projeto Sanidade Animal.

Para obtenção de cepa de segunda passagem, uma ave adulta comprovadamente livre de hemoparasitos, através de esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa, foi imunossuprimida com Acetato de metilprednisolona (Depo – Medrol[®]) (SOUZA, 1998), administrado por via intramuscular, em dose única de 30 mg/Kg/PV (**Anexo VIII**). No dia seguinte esta ave recebeu o inóculo de 0,5 ml de soro infectado com *B. anserina* (LISBÔA et al 2009), coletando-se sangue diariamente através de tubos capilares de micro-hematócrito submetidos à centrifugação. O soro obtido foi analisado em microscopia de campo escuro para verificar a presença de espiroquetas. No quarto dia pós-inoculação (DPI), depois de constatado o pico de parasitemia, foram coletadas amostras desse soro de segunda passagem.

3.8. Origem e infecção dos carrapatos

Os carrapatos utilizados no experimento são oriundos de criações familiares de *G. gallus*, localizadas no município de Três Rios, RJ e Rio de Janeiro, bairro de Santa Cruz, RJ. Foram identificados como pertencentes à espécie *A. (P.) miniatus*, segundo Magalhães (1979).

Os argasídeos foram mantidos no Laboratório de Doenças Parasitárias em uma estufa do tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) a uma temperatura ideal de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de 80% em todas as fases evolutivas de seu ciclo biológico. Para aumentar a população da colônia, foram realizadas infestações e recuperações de larvas ingurgitadas, utilizando-se pintos de 10 dias de vida, acondicionados em uma caixa adequada com comedouro e bebedouro (**Figura 5**). A caixa foi revestida em suas bordas com fita adesiva dupla face para evitar a fuga das larvas e coberta em sua totalidade por uma lona porosa transparente para facilitar a visualização dos carrapatos (**Figura 6**). Foram improvisados ninhos de papelão para fornecer abrigo devido ao hábito nidícola dos carrapatos desta espécie (**Figura 7**). Após a primeira coleta das larvas, foram realizadas mais três alimentações desses carrapatos em aves adultas saudáveis, comprovado através de esfregaços sanguíneos, para estabelecer um número significativo de ninfas de terceiro ínstar e iniciar o procedimento experimental.

Para obtenção da infecção dos carrapatos, as ninfas de segundo ínstar foram colocadas para se alimentar na ave que inoculada com *B. anserina* de segunda passagem, quando a mesma se encontrava no pico de espiroquetemia, até ficarem repletos e completar seu ingurgitamento. Após uma semana, foi possível através de uma análise microscópica em campo escuro, detectar a presença de inúmeras espiroquetas no líquido coxal dos carrapatos.



Figura 5. Infestação de pintos de 10 dias de vida com larvas de *Argas miniatus*, visando à recuperação de larvas ingurgitadas.



Figura 6. Improvisação de técnica para recuperação de larvas de *Argas miniatus* e utilização de uma lona porosa de cor branca envolvendo a caixa para facilitar a coleta.



Figura 7. Interior da caixa onde os pintos foram alojados para infestação, mostrando o fundo revestido com pedaços de papelão para servir de abrigo para as larvas ingurgitadas de *Argas miniatus*.

3.9. Delineamento experimental

As aves foram divididas em quatro grupos inteiramente casualizados com dez animais em cada.

Grupo 1	Inoculado com soro recuperado de duas passagens em ave infectada
Grupo 2	Grupo controle do Grupo 1 – inoculado com solução fisiológica a 0,9%
Grupo 3	Grupo infestado com ninfas de terceiro ínstar de <i>A. miniatus</i> infectados com <i>B. anserina</i> através da alimentação em ave infectada
Grupo 4	Grupo controle do Grupo 3 – infestados com ninfas de <i>A. miniatus</i> de terceiro ínstar livres de <i>B. Anserina</i>

Todos os grupos foram alojados em gaiolas suspensas, com dois animais por gaiola. As aves foram identificadas por meio de anilhas de plástico colocadas em uma das patas, com o respectivo número do animal (**Figura 8**).



Figura 8. Método de identificação das aves através de anilha de plástico na pata, com o respectivo número da ave.

3.10. Procedimentos experimentais nos Grupos

As amostras de soro infectado com *B. anserina* foram descongeladas em banho-maria a uma temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 1$. As amostras foram diluídas com 90 μL de Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x na proporção de 1:10 e as espiroquetas foram contadas utilizando Câmara de Neubauer, através do protocolo de contagem de espiroquetas e pela utilização da seguinte fórmula: Contagem de Espiroquetas / 4 x diluição x 10^4 = espiroquetas/mL : (ABARACÓN, 1987). A visualização foi feita em microscópio OLYMPUS BX 41 de contraste de fase com campo escuro e a contagem foi realizada através de um contador manual de células.

As aves do Grupo 1 receberam o inóculo de 250 μL de soro infectado, com concentração de $3,7 \times 10^6$ espiroquetas/mL (**Figura 9**) e aves do Grupo 2, o inóculo de 250 μL de soro fisiológico a 0,9% (**Figura 10**), ambos os grupos por via intramuscular.

Quatro ninfas de *A. miniatus* de terceiro ínstar infectadas, foram colocadas para alimentar-se até completar o ingurgitamento em cada ave do Grupo 3 (**Figura 11**). Durante a alimentação dos carrapatos, as aves tiveram as patas e a cabeça contidas para evitar a ingestão das ninfas. As ninfas foram colocadas na face interna das asas da ave, onde sua área de deslocamento foi limitada, com isso foi possível visualizar o carrapato durante todo o processo. Nas aves do Grupo 4, foram alimentadas quatro ninfas de terceiro ínstar, livres de *B. anserina* (**Figura 12**). O resto do procedimento ocorreu assim como o descrito para o Grupo 3.



Figura 9. Inoculação intramuscular de soro infectado com *Borrelia anserina* em uma ave do Grupo 1.



Figura 10. Inoculação intramuscular de soro fisiológico a 0,9% em uma ave do Grupo 2.



Figura 11. Alimentação das ninfas de terceiro instar infectadas com *Borrelia anserina* em uma ave do Grupo 3.

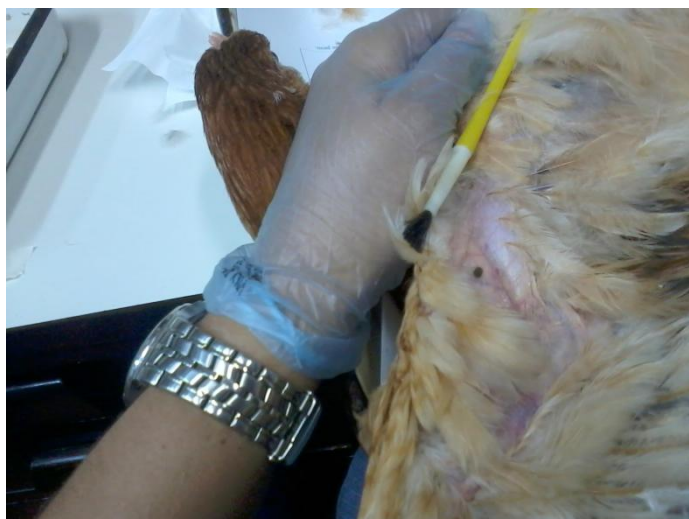


Figura 12. Alimentação das ninfas de terceiro ínstar livres de *Borrelia anserina* em uma ave do Grupo 4.

3.11. Espiroquetemia

Amostras de sangue foram coletadas diariamente dos grupos infectados (Grupos 1 e3), através de capilares de micro-hematócrito, sendo centrifugados para obtenção do soro. O soro obtido foi diluído em solução salina de PBS para auxiliar na contagem das espiroquetas.

Foram avaliadas as concentrações de espiroquetas/mL durante o curso da infecção a partir do primeiro até o 9º dia após a inoculação pelo soro infectado. O soro foi colocado em Câmara de Neubauer (**Figura 13**) e foi realizada a contagem de espiroquetas em microscópio de contraste de fase invertida, com aumento de 20x.



Figura 13. Utilização da Câmara de Neubauer para a realização da contagem de espiroquetas durante o curso da infecção.

3.12. Coleta de sangue e análise bioquímica

Amostras de sangue total das aves dos quatro grupos experimentais foram coletadas três dias antes do início do experimento, aos 46 dias de vida, e depois aos 53, 57, 61, 65, 69 e

73 dias de vida. A coleta foi realizada, sempre à tarde e através de venopunção da veia metatársica medial (**Figura 14**) utilizando-se uma seringa de 3 mL, sendo obtido um volume de 4 mL de sangue total de cada ave. No momento da coleta, o sangue foi imediatamente acondicionado em tubos do tipo Eppendorf de 2 mL e preservados em caixa de isopor contendo gelo, com a finalidade de transportar as amostras em segurança para o laboratório.



Figura 14. Coleta de sangue realizada na veia metatársica medial.

As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro obtido foi conservado em freezer a -80°C , sendo gradativamente processados no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV/UFRRJ) e submetidos à análise de bioquímica sérica. Foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), glicose, ácido úrico, creatinina, proteínas totais e colesterol total. Os Grupos 2 e 4 foram utilizados como controles internos para os grupos 1 e 3 submetidos à infecção, funcionando como meios de comparação e/ou valores de referência. Sendo assim, todos os grupos sofreram as mesmas condições experimentais

Para proceder à análise das amostras de soro, foi utilizado o analisador A15 automatizado (Applied Biosystems). As análises foram feitas pelo método colorimétrico, através de “kits” comerciais (Biosystems Reagents e Instruments).

Para a determinação da glicose, $3\ \mu\text{L}$ de soro foram adicionados a $300\ \mu\text{L}$ do reagente ($100\ \text{mmol/L}$ de fosfato, $5\ \text{mmol/L}$ de fenol, $10\ \text{U/ml}$ de glicose-oxidase, $1\ \text{U/ml}$ de peroxidase, $0,4\ \text{mmol/L}$ de 4 – aminoantipirina e pH de 7,5) e o produto originado pela oxidação de 4 – aminoantipirina, foi determinada por espectofotometria de absorção máxima a $510\ \text{nm}$. A solução padrão de glicose foi utilizada a uma concentração de $100\ \text{mg/dL}$ (TRINDER, 1969), sendo as leituras expressas em mg/dL .

Para avaliar a atividade enzimática de ALT, $25\ \mu\text{L}$ foram adicionados a $300\ \mu\text{L}$ do reagente ($150\ \text{mmol/L}$ Tris, $750\ \text{mmol/L}$ de L – alanina, desidrogenase láctica $> 1350\ \text{U/L}$, pH 7.3, $1,3\ \text{mmol/L}$ NADH, $75\ \text{mmol/L}$ de 2 – oxoglutarato, $148\ \text{mmol/L}$ de hidróxido de sódio, $9,5\ \text{g/L}$ de azida de sódio) e o produto formado foi determinado por espectofotometria de absorção máxima a $340\ \text{nm}$. As leituras foram expressas em U/L .

Para a determinação da atividade enzimática de AST, 25 µL de soro foram adicionados a 300 µL de reagente (121 mmol/L de Tris, 362 mmol/L de L-aspartato, desidrogenase maláctica > 460 U/L, desidrogenase láctica > 660 U/L, pH 7.8, 1,3 mmol/L de NADH, 75 mmol/L de 2-oxoglutarato, 255 mmol/L de hidróxido de sódio, 9,5 g de azida de sódio), sendo formado um produto por espectrofotometria de absorção máxima de 340 nm. As leituras foram expressas em U/L.

Para a mensuração das proteínas totais, 4 µL de soro foram adicionados a 300 µL de reagente (6 mmol/L de acetato de cobre, 12 mmol/L de iodeto de potássio, 1,15 mol/L de hidróxido de sódio), sendo o produto originado por espectrofotometria de absorção de no máximo 540 nm, utilizando-se albumina de soro de ave, como solução padrão a uma concentração de 50 g/L (GORNALL et al., 1949). As leituras foram expressas em g/L.

Para a determinação dos parâmetros bioquímicos de função renal foram realizados os seguintes métodos: para determinar o ácido úrico, 25 µL de soro foram adicionados a 300 µL de reagente (100 mmol/L de fosfato, 1,5g/L de detergente, 4mmol/L diclorofenolsulfonato, uricase > 0,12 U/mL, ascorbato oxidase > 5 U/mL, peroxidase > 1 U/mL, 0,5 mmol de 4-aminoantipirina, pH 7.8) e o produto formado por espectrofotometria de absorção máxima a 520 nm. As leituras foram expressas em mg/dL. Na determinação da creatinina, 0,1 µL de soro foram adicionados a 1 ml de reagente (0,4 mol/L de hidróxido de sódio, detergente, 25 mmol/L de Ácido pícrico), e o produto formado pela espectrofotometria de absorção máxima de 500nm. As leituras foram expressas em mg/dL.

Na determinação do colesterol total, 10 µL de soro foram adicionados a 300 µL de reagente (0,05 mmol/L de colato de sódio, 28 mmol/L de fenol, colesterol esterase > 0,2 U/mL, 0,5 mmol/L de 4-aminoantipirina, pH 7.0) e o produto originado por espectrofotometria de absorção máxima foi de 500 nm. As leituras foram expressas em mg/dL.

3.13. Necropsia e coleta de material

Duas aves do grupo 1 e duas do grupo 2, foram eutanasiadas no quarto DPI do soro infectado no grupo 1, período no qual ocorre o pico de parasitemia de acordo com Nasri et al (2010). Duas aves do grupo 3 e duas do grupo 4, foram eutanasiadas no oitavo DPI do grupo 3, período em que ocorre o pico de parasitemia quando pela alimentação de carrapatos infectados (HUTYRA et al., 1947; McNEIL et al., 1949; BOERO, 1967; BIER, 1985).

As aves foram eutanasiadas conforme os métodos recomendáveis descritos nas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA para aves (2013). Para a realização da eutanásia, foi administrado por via endovenosa, 1mL/kg/PV de Tiopental sódico (**Anexo VIII**). As aves foram auscultadas durante o procedimento para comprovar a redução do batimento cardíaco e a eficiência da prática. A necropsia das aves e a coleta de material foram realizadas de acordo com o Manual de Necropsia do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA/UFRGS).

3.14. Exame macroscópico dos órgãos

Fragmentos de fígado, baço, coração, rins e sistema nervoso central (SNC) foram coletados e avaliados quanto à sua consistência, formato, tamanho e cor. Todos os órgãos foram examinados ainda na carcaça e posteriormente separados e examinados.

3.15. Técnicas de confecção, montagem e coloração das lâminas

Todos os procedimentos histológicos realizados a partir dos fragmentos dos órgãos obtidos durante a necropsia foram realizados no Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As amostras de fragmentos dos órgãos das aves enfermas foram submetidas a cortes histológicos que envolveram uma série de etapas segundo Timm (2005), essenciais à preservação e visualização das estruturas celulares. A coleta obedeceu ao limite de 5 mm de espessura, a fim de evitar alterações autolíticas nos tecidos. Fragmentos de tecidos saudáveis das aves do grupo controle também foram coletados para fins de comparação.

Os fragmentos obtidos no momento da necropsia foram imersos em formol tamponado a 10% para garantir a boa preservação das estruturas. Para garantir a eficiência do processo de fixação, o volume de formol foi ajustado para dez vezes o tamanho do fragmento.

Os fragmentos foram clivados e colocados em cassetes histológicos, identificados e processados segundo a técnica histológica padrão (ou de rotina).

Os cortes histológicos foram submetidos às colorações de Hematoxilina-Eosina (Harris, 1900) e pelo método de impregnação por prata (Whartin & Starry, 1920). As alterações histopatológicas foram observadas em microscópio HUND WETZALAR H600 e as imagens capturadas pela câmera digital NIKON COOLPIX 4300. As espiroquetas foram visualizadas pelo mesmo microscópio, utilizando-se óleo de imersão e objetiva de 100x.

3.16. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, subdividido em parcelas, apresentando quatro tratamentos em cada parcela, com dez repetições por tratamento. Os gráficos foram plotados no Microsoft Excel 2007 e a análise quantitativa dos parâmetros estudados foi realizada através do programa estatístico Statgraphics Centurion XVI – Version 16.2.04 (64-bit); os dados foram analisados de forma independente para cada grupo experimental em cada dia de infecção, o que permitiu calcular os valores de média, desvio-padrão, variância, coeficiente de variação, erro padrão, máximo e mínimo. Foi realizado um tratamento estatístico de análises de componentes principais (PCA) para os dados de peso médio corporal e parâmetros bioquímicos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parâmetros epidemiológicos e espiroquetemia

A análise microscópica do soro do Grupo 1, revelou a presença de inúmeras espiroquetas aglomeradas (**Figura 15**). Os valores médios em dias de $2 \pm 0,30$ e $5 \pm 1,38$ obtidos do Grupo 1, corresponderam aos índices epidemiológicos de período de pré-patência e período de patência, respectivamente, enquanto para o Grupo 3, o período pré-patente foi em dias de $5 \pm 0,97$ e o período de patência, também em dias foi de $5 \pm 1,03$ (**Tabela 1**).

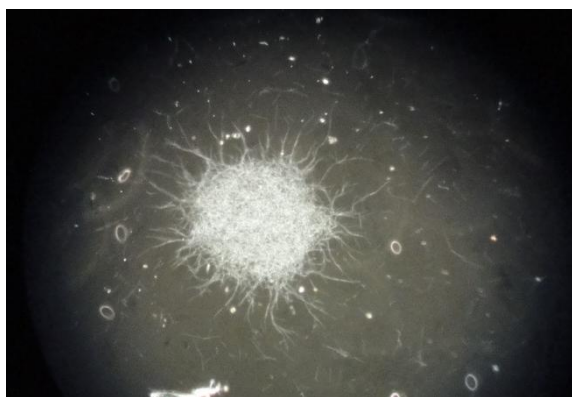


Figura 15. Visualização do soro das aves do Grupo 1, mostrando grande quantidade de espiroquetas no pico de parasitemia da infecção e o comportamento de aglomeração (Aumento de 40x).

Tabela 1. Médias dos períodos de pré-patência e patência da infecção experimental por *Borrelia anserina* em aves (Grupos 1 e 3).

	Aves dos Grupos 1 e 3 (n= 10)	
	Grupo 1	Grupo 3
Período pré-patência (dias)	$2 \pm 0,30$	$5 \pm 0,97$
Período de patência (dias)	$5 \pm 1,38$	$5 \pm 1,03$

As aves dos grupos infectados (Grupos 1 e 3) revelaram uma espiroquetemia mesmo na ausência de sinais clínicos característicos da doença, permitindo a obtenção de uma curva de crescimento bacteriano durante a infecção (**Gráfico 1**).

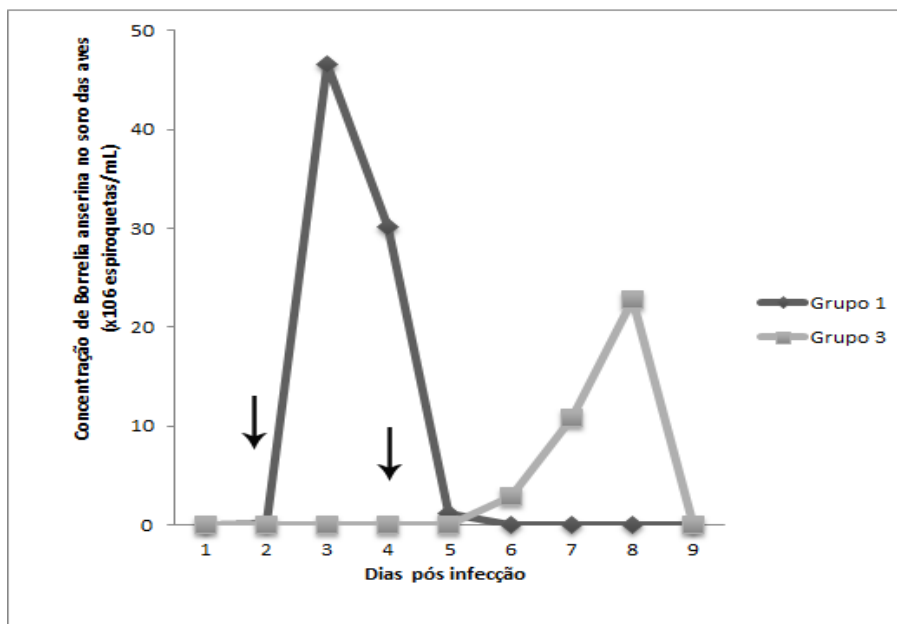


Gráfico 1. Curva de crescimento de *Borrelia anserina* no sangue das aves dos Grupos 1 e 3. As setas indicam o dia exato da visualização das espiroquetas em cada grupo.

No Grupo 1, as espiroquetas puderam ser visualizadas no soro no 2º DPI, sendo a espiroquetemia mais acentuada em relação ao Grupo 3 e atingiram seu pico no 3º DPI e apresentaram a formação de aglomerados bacterianos. O número de espiroquetas caiu abruptamente a partir do quarto dia e desapareceu do sangue das aves ao 6º DPI.

O crescimento bacteriano nas aves do Grupo 3 foi tardio quando comparado ao observado no Grupo 1, com a detecção das espiroquetas a partir do 4º DPI, nas aves 5, 6 e 9, e o restante apenas no 6º DPI. O número máximo de espiroquetas foi observado no 8º DPI, e a partir do 9º DPI, já não havia mais espiroquetas na circulação sanguínea dos animais.

Shommein e Khogali (1974) e Bandopadhyay e Vegad (1983) relataram um período pré-patente de 2 a 4 dias, quando inoculado soro ou sangue em aves experimentalmente infectadas por *B. anserina*. Segundo os mesmos autores, esse período curto entre a inoculação e o aparecimento das espiroquetas pode estar relacionado à via de inoculação e à concentração de espiroquetas no soro inoculado. Rivetz et al (1977b), após análise microscópica de esfregaços sanguíneos de frangos infectados através da inoculação intramuscular de sangue infectado por *B. anserina*, encontrou um período pré-patente de 3 dias após a inoculação e o pico estabelecido entre 5º e 7º DPI. Nasri et al (2010) reportaram o aparecimento de espiroquetas no sangue periférico em 48 horas após a inoculação de soro ou sangue citratado, permanecendo no sangue das aves em 4 a 6º DPI, com pico de parasitemia no 3º DPI. O período pré-patente encontrado no presente trabalho, foi semelhante ao observado nos trabalhos anteriores.

Lisbôa (2006) relatou um período pré-patente de cinco dias, quando *B. anserina* foi inoculada por *A. miniatus* infectados, com pico de espiroquetemia constatado entre o 6º e 9º DPI. Hutyra et al (1947) e Bier (1985) relataram um período pré-patente de 4 a 6 dias, sendo este um resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

Restrepo et al (1994) e Schwan (1996), observaram que existe uma dependência bioquímica entre a espiroqueta e o vetor, sendo este fato essencial para conferir desenvolvimento de patogenicidade à borrelia. Os carrapatos utilizados no presente estudo foram expostos à infecção 30 dias antes do início dos procedimentos experimentais, o que garantiu um tempo necessário para que as espiroquetas se instalassem e se multiplicassem no carrapato, o que segundo Bier (1985), ocorre após duas semanas da alimentação em uma ave infectada. Sugere-se, desta forma, que a morte de dois animais do Grupo 3 possa ter ocorrido em decorrência da maior patogenicidade da borrelia inoculada via carrapato.

As aves enfermas se recuperam após a crise causada pela espiroquetemia, adquirem imunidade por longos períodos e resistem a novas infecções, embora, Marchoux e Salimbeni (1903), relatem que após esta crise, mesmo com o desaparecimento das espiroquetas do sangue, as aves possam apresentar um quadro debilitante severo, podendo vir a óbito pelas lesões orgânicas causadas pela doença. Casos de mortes pela espiroquetemia podem ocorrer pela inibição da síntese de hemácias por toxinas bacterianas, o que culmina em prejuízos na absorção de oxigênio e consequente asfixia (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903).

4.2. Sinais clínicos da infecção

Algumas aves do Grupo 1 já manifestavam sinais clínicos da doença no 2º DPI, mas apenas a ave 1, apresentou todos os sinais característicos da enfermidade, como sonolência (**Figura 16a**), penas arrepiadas e perda de apetite (**Figura 16b**), mucosas (crista e barbela) hipocoradas e diarreia esverdeada (**Figura 16c**).

A partir do 3º DPI, todas as aves do Grupo 1 já apresentavam os sinais clínicos, os quais perduraram até o 9º DPI, apenas a ave 3 apresentou diarreia esverdeada ainda visível. No 10º DPI, as aves recuperaram a saúde, apresentando melhora na consistência das fezes (**figura 16d**) e voltaram a se alimentar normalmente.

As aves do Grupo 3 manifestaram os sinais clínicos da doença mais tardiamente em relação ao Grupo 1 infectado por soro. No 2º DPI, a ave 5 do Grupo 3, se encontrava com as penas arrepiadas e as aves 1 e 2, no 5º DPI, apresentaram o mesmo sinal clínico. No 6º DPI, todas as aves já apresentavam os sinais clínicos. Estes sinais perduraram até 10º DPI, com a detecção de uma diarreia esverdeada na ave 2.



Figura 16. Registro fotográfico de alguns sinais clínicos observados em aves do Grupo 1 enfermas e o aspecto das fezes durante a infecção e após a recuperação dos animais. a – Ave com comportamento sonolento; b – Ave com penas arrepiadas e sem interesse pelo alimento; c – Alteração na coloração das fezes durante a infecção, com consistência líquida e coloração esverdeada; d – Consistência das fezes normais após a recuperação das aves

Nos Grupos 1 e 3, os sinais clínicos foram mais evidentes e intensos no início da primeira e segunda semanas, respectivamente. Este fato sugere que as diferenças observadas em relação ao período de incubação nos dois grupos, sejam devido ao maior número de espiroquetas e a maior velocidade de migração bacteriana, quando inoculado soro por via intramuscular, em relação à inoculação feita pelo carrapato. Segundo Boero (1967), o período de incubação é de 5 a 8 dias quando as espiroquetas são inoculadas através da picada de carrapatos infectados. A intensidade dos sinais clínicos também coincidiu com o pico de espiroquetemia das aves.

A forma aguda da espiroquetose aviária é a mais observada em aves acometidas pela infecção, com sintomatologia clínica perdurando de 5 a 6 dias e expressão de algumas manifestações mórbidas que tornam possíveis um diagnóstico clínico aproximado. O quadro clínico inicial da enfermidade se caracteriza por uma intensa polidipsia, em virtude do grande volume de sangue enviado para os principais órgãos de irrigação como o fígado, baço, rins e intestino e a intensa sonolência e letargia se deve à penetração das espiroquetas no cérebro e medula espinal que determina um caráter neurotrópico em sua parasitemia (BOERO, 1967). No presente trabalho, o curso da infecção exibiu um caráter agudo e septicêmico, fato comprovado pelo grande número de espiroquetas encontrado no sangue periférico dos grupos das aves infectadas (Grupos 1 e 3) e pelas lesões teciduais produzidas.

Estudando experimentalmente a patologia da borreliose aviária, Nasri et al (2010) observou um quadro de anorexia, diarreia, palidez de crista e barbela, paralisia de asas e penas arrepiadas durante infecção. Sinais clínicos semelhantes foram observados neste trabalho.

De acordo com Bandopadhyay e Vegad (1983), a diarreia esverdeada observada no curso da infecção se deve à ocorrência de enterite e hemossiderose, embora as espiroquetas desapareçam no intestino em 96 horas após a infecção. Além disto, Boero (1967) relatou em seus estudos que a coloração esverdeada das fezes também ocorra por extravasamento biliar, que recobre as fezes intensamente com esta cor. A absorção intestinal e o peristaltismo normal também ficam prejudicados, contribuindo para consistência líquida e/ou pastosa das fezes, que voltam ao normal após a cura clínica das aves. A ave 4 do Grupo 1 e as aves 4 e 6 do Grupo 3, morreram no 5º DPI e 9º DPI respectivamente. Nenhuma ave dos grupos controles (Grupos 2 e 4) manifestou sinal clínico característico da doença.

Foram avaliadas as médias dos pesos diários ao longo do curso da infecção dos quatro grupos experimentais (**Gráfico 2**). Houve uma queda do peso médio corporal das aves do Grupo 1, durando até a terceira pesagem (8º DPI). O período no qual foi observado a redução no peso corporal das aves do Grupo 1, é compatível com a fase de maior intensidade dos sinais clínicos (relativo aos três primeiros dias após a infecção) e de aproximação do pico de espiroquetemia. Em relação ao Grupo 3, houve uma redução no peso corporal médio das aves apenas entre a segunda e a terceira pesagens (entre o 4º DPI e 8º DPI). Estes achados sobre o peso corporal deste grupo cursam paralelamente com a manifestação dos principais sinais clínicos da infecção e se enquadram dentro do período de maior espiroquetemia. A partir da quarta pesagem, foi constatado um aumento progressivo no ganho de peso dos animais.

As aves dos grupos controles (Grupos 2 e 4) ganharam peso normalmente como já era previsto antes do experimento.

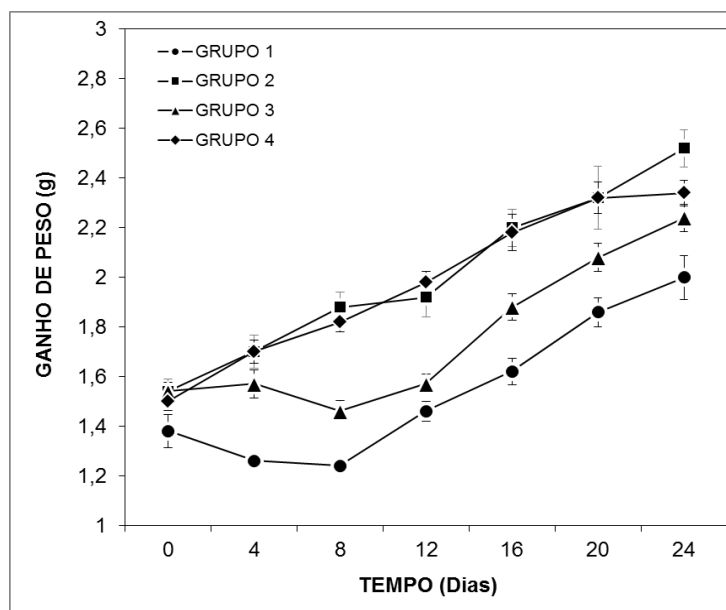


Gráfico 2. Representação gráfica da dinâmica de ganho de peso de *Gallus gallus* durante o período experimental. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

Foram observadas alterações na temperatura corporal das aves dos grupos infectados (Grupos 1 e 3) em relação aos grupos controles (Grupos 2 e 4) (**Gráfico 3**). No Grupo 1, houve um aumento da temperatura média corporal das aves do 1º ao 5º DPI, que normalizou a partir do 6º DPI. Em relação ao Grupo 3, o aumento foi observado no intervalo entre o 5º DPI e o 8º DPI, e a temperatura normalizou-se a partir do 9º DPI. As aves dos Grupos 2 e 4 mantiveram a temperatura em valores normais durante toda avaliação.

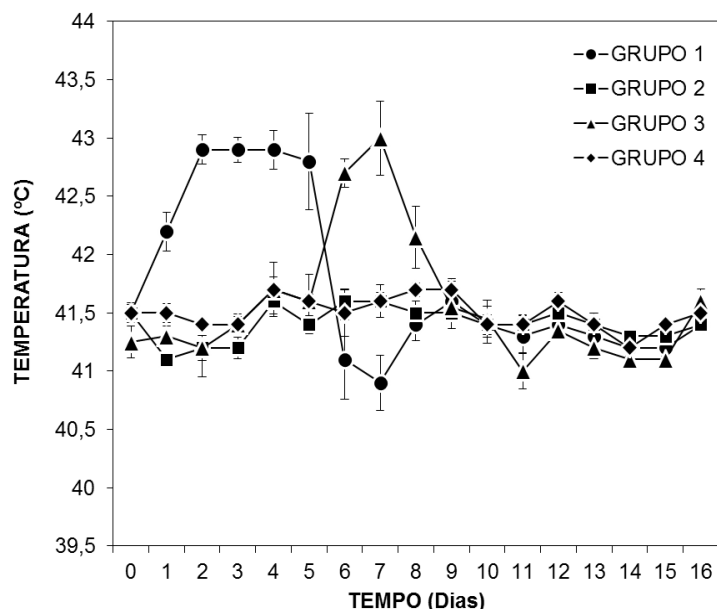


Gráfico 3. Representação da mensuração da temperatura corporal das aves durante todo o período experimental. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

A redução do peso médio corporal das aves, nos períodos citados acima, ocorreu provavelmente devido ao estado de prostração e sonolência causado pela infecção, quando as aves perdem o estímulo e o interesse pelo alimento. Segundo Marchoux e Salimbeni (1903), as aves sobreviventes à infecção, apresentam melhora no seu estado físico e voltam a ganhar peso normalmente, o que ocorreu no presente trabalho.

A temperatura corporal normal das aves varia entre 41 e 42 °C (WELKER et al., 2008). Boero (1967) relatou que o aumento da temperatura nas aves enfermas se deve à grande invasão das espiroquetas no sangue e sua multiplicação no plasma. Relatou também que quando a temperatura se normaliza, as aves já não apresentam mais as espiroquetas na corrente sanguínea e se estabelece um período apirético. Segundo o mesmo autor, a febre produz a chamada adinamia ou fraqueza muscular durante a infecção, além das espiroquetas consumirem a glicose do plasma e as reservas do glicogênio muscular, fatores esses que também contribuem para a redução do peso corporal das aves.

Com o aumento da temperatura, a primeira resposta comportamental das aves é a restrição no consumo de ração (HURWITZ et al., 1980), portanto as respostas obtidas no presente estudo estão de acordo com a literatura.

4.3. Análise da Bioquímica Sérica

Os resultados obtidos revelaram nas aves, em decorrência da borreliose, as alterações nos valores bioquímicos séricos durante a patologia da doença.

Os resultados dos valores bioquímicos das aves do grupo 1 correspondentes a ALT, apresentaram elevação em sua atividade apenas no 12° e 24° DPI, sendo estes os maiores valores séricos para esta enzima. Após o pico enzimático no 12° DPI, houve uma normalização do seu nível, aproximando-se dos níveis do seu grupo controle (Grupo 2). Quanto ao grupo exposto aos carrapatos infectados, os níveis de ALT se mantiveram mais elevados que os do seu grupo controle e mantiveram esse comportamento até o 20° DPI (Gráfico 4).

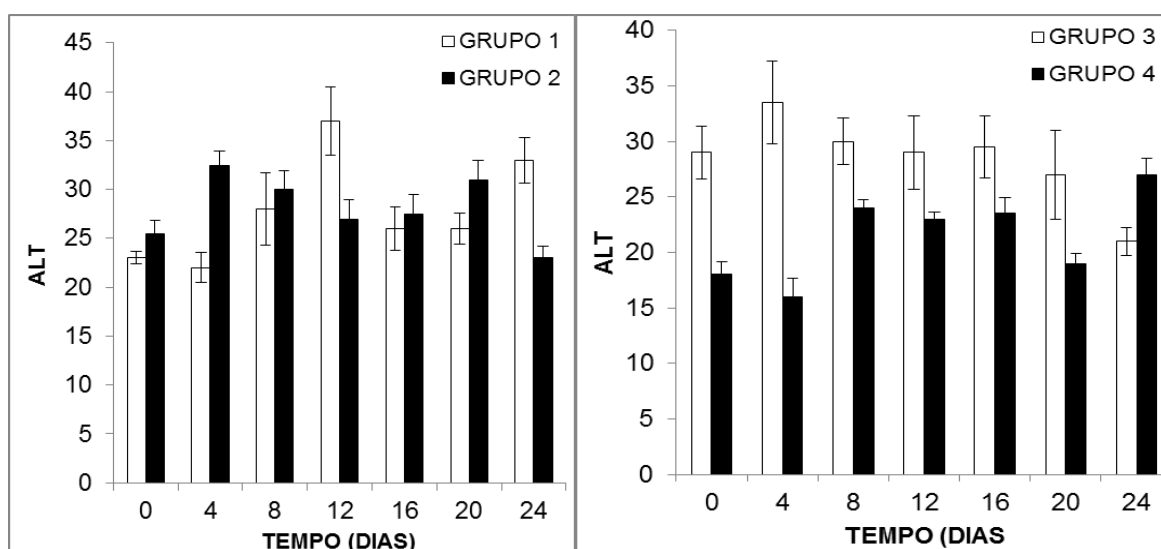


Gráfico 4. Atividade da Alanina transaminase (ALT) nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

Estes dados diferem dos resultados encontrados por Vashist (2011), que estudando as alterações bioquímicas causadas pela infecção, encontrou níveis elevados da enzima ALT na terceira semana de infecção, após inocular soro infectado com *B. anserina* em aves domésticas.

Os níveis séricos de AST do grupo 1, mostraram-se aproximadamente iguais aos do grupo controle (Grupo 2), sendo observadas pequenas oscilações de sua atividade (Gráfico 5), exceto no 12° DPI, quando houve um aumento considerável para esta enzima. Vashist (2011), observou poucas variações na atividade desta enzima ao longo de seu período experimental.

A elevação enzimática de ALT observada no grupo controle (Grupo 2) (Gráfico 4), durante os primeiros dias de avaliação, pode ter ocorrido devido ao estresse mediante a

contenção para coleta e/ou variações ambientais, que por muitas vezes alteram a fisiologia e o metabolismo normais dos animais. Vashist (2011) relatou aumento das atividades enzimáticas de ALT na primeira semana pós-infecção por *B. anserina*. Este aumento da atividade inicial pode ser explicado por Borsa et al (2006), quando relaciona o clima, manejo e tipo de alimentação com possíveis interferências no resultado das análises bioquímicas.

No presente estudo, o Grupo 1 revelou apenas uma pequena elevação da atividade enzimática de AST no 4º DPI, com maiores valores no 12º DPI, enquanto Rivetz et al (1977b), observaram elevação significativa desta enzima a partir do 3º dia, com maiores valores na terceira semana. No Grupo 3 infectado, houve um pequeno aumento entre 8º e 12º DPI, depois houve uma queda após esse período e uma posterior normalização (**Gráfico 5**).

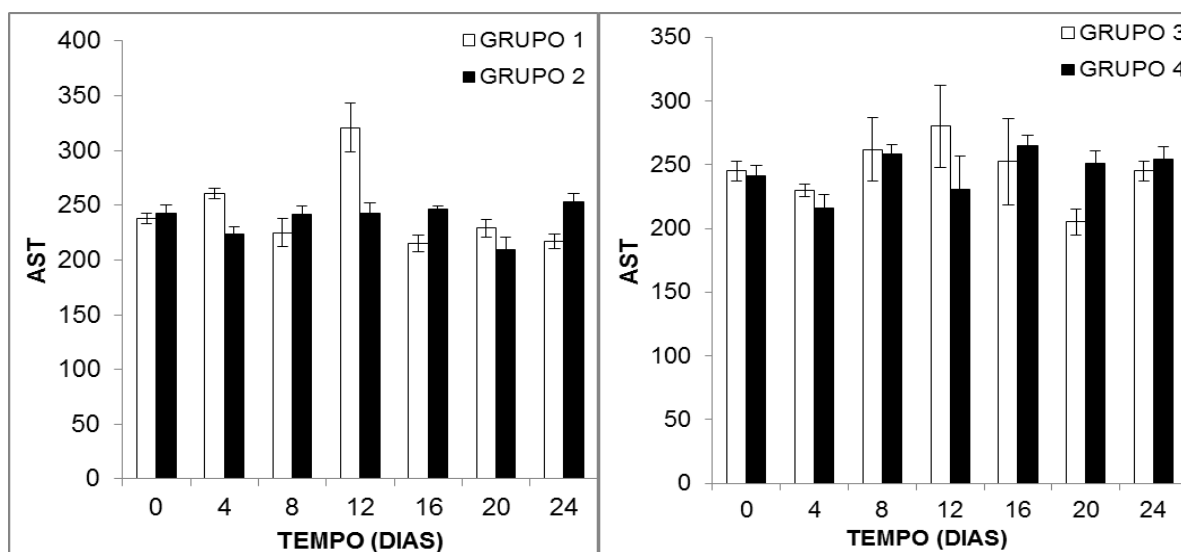


Gráfico 5. Atividade da Aspartato Aminotransferase (AST) nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

Os valores elevados das transaminases nos grupos infectados (Grupos 1 e 3), nos períodos citados acima, podem ter sido ocasionados por lesões hepáticas, com possível diminuição da função do órgão. Assim como Capitelli e Crosta (2013), que relataram que o aumento nos valores dessas enzimas no sangue podem mensurar o grau de lesão hepática. Esse aumento dos níveis séricos das transaminases também pode ser explicado por Kaneko (1989), que relata que o distúrbio hepático decorrente do rompimento dos hepatócitos é resultante de alterações na permeabilidade celular.

Segundo Fudge (2000), a enzima ALT não é hepatoespecífica e pode também indicar lesões em outros tecidos. Um aumento desta enzima pode indicar lesões severas do fígado e musculatura esquelética, embora AST também não seja específica para indicar danos hepáticos nas aves, e é a mais utilizada para essa finalidade devido à sua alta sensibilidade como marcador de lesão.

A atividade sérica de ALT foi mais evidenciada do que propriamente AST, sugerindo que houve graves danos hepáticos. A atividade de ALT se manteve elevada por mais tempo

no Grupo 3, possivelmente pela maior patogenicidade e severidade das lesões no fígado, quando as espiroquetas são inoculadas por carrapatos.

No Grupo 1, o ácido úrico apresentou um período de elevação de sua concentração, apenas entre 16^o e 20^o DPI (**Gráfico 6**). Essa elevação no ácido úrico é em grande parte consequência de um comprometimento renal, com prejuízos significativos na sua eliminação normal pela urina. Conforme Rivetz et al (1977b), o aumento deste metabólito em aves domésticas é devido a danos primários (na funcionalidade dos rins) ou secundários, como por exemplo, em casos de redução do estado nutricional dos animais.

Os altos níveis de ácido úrico observados nos grupos experimentais, em particular aqueles encontrados no grupo controle (Grupo 4) (**Gráfico 6**), podem ser também explicados pelo fornecimento de uma dieta com alto teor de aminoácidos, já que a ração oferecida às aves possuía em sua composição compostos proteicos essenciais para o desenvolvimento do frango de corte.

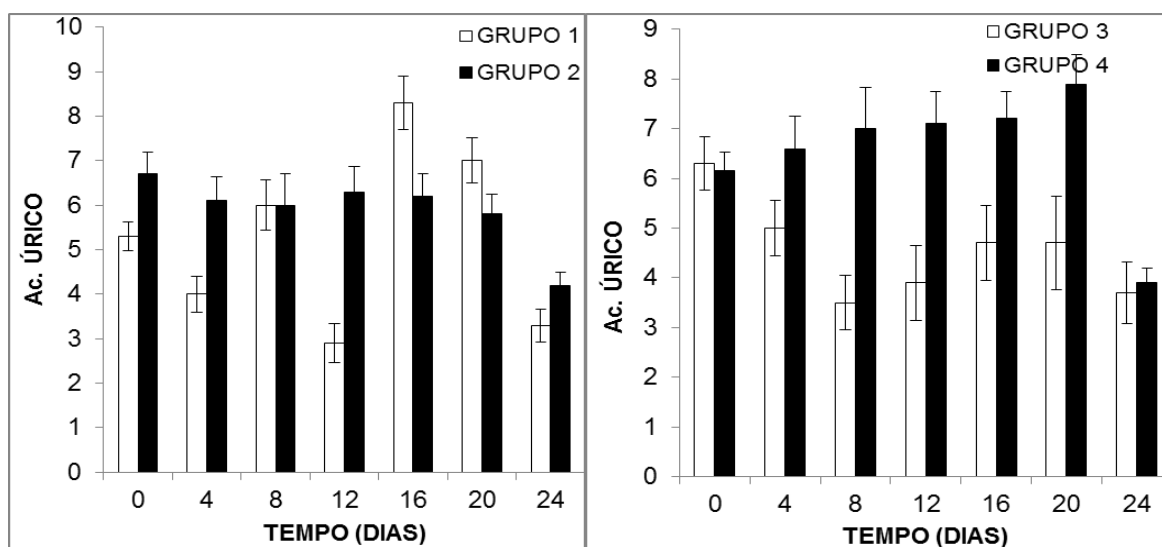


Gráfico 6. Concentração sérica de Ácido úrico nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

Os valores de creatinina dos grupos experimentais (**Gráfico7**), demonstraram poucas oscilações durante o curso da infecção. Segundo Lierz (2003) e Campbell (2004), a creatinina possui pouco valor diagnóstico em aves e raramente é utilizada em laboratórios de rotina.

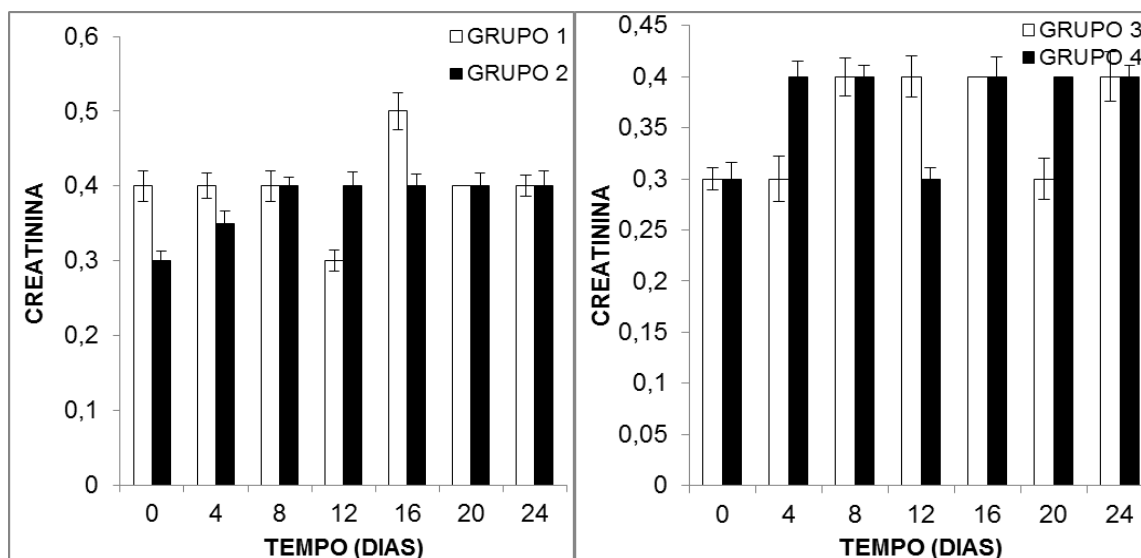


Gráfico 7. Concentração de Creatinina nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

Os níveis de glicose sanguínea dos grupos infectados (Grupos 1 e 3) permaneceram aproximadamente iguais aos níveis dos grupos controles (Grupos 2 e 4) (**Gráfico 8**), mesmo com a instalação de um período de jejum das aves durante a infecção.

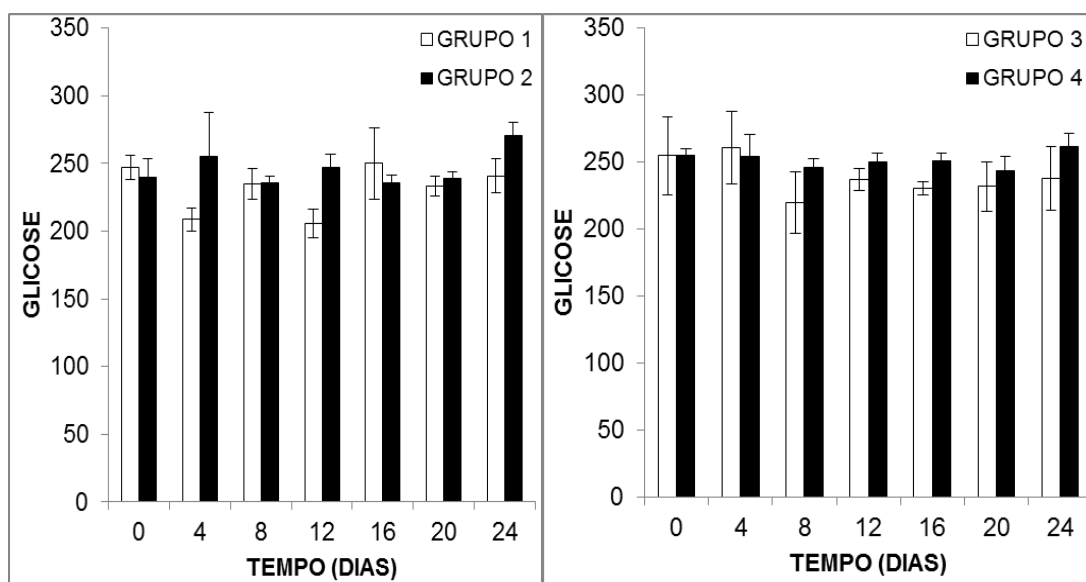


Gráfico 8. Concentração sérica de Glicose nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

Essas informações corroboram com os achados bioquímicos de Rivetz et al (1977b), que mensurou a glicose durante a infecção por *B. anserina*. Segundo Campbell (2004), quando as aves atravessam um período curto de jejum, proveniente de qualquer alteração, o organismo consegue normalizar os teores séricos através da glicogenólise hepática. E diferentemente dos mamíferos, as aves em períodos longos de jejum não utilizam a glicose, e sim as gorduras como provedor de energia.

Os valores séricos de colesterol total dos quatro grupos estão representados no **Gráfico 9**.

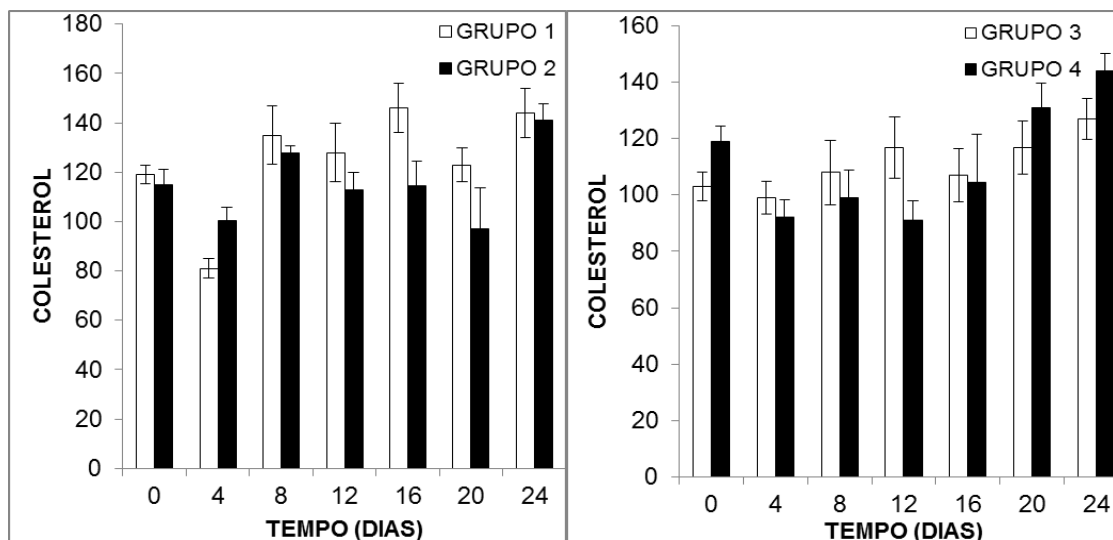


Gráfico 9. Concentração sérica de Colesterol total nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

No Grupo 1, observou-se um aumento nos níveis de colesterol do 8º ao 24º DPI. O fígado é o principal órgão onde o colesterol endógeno é produzido. Essas alterações no colesterol total das aves provavelmente ocorreram devido ao acometimento hepático durante a infecção. Segundo Amand (1986) e Kaneko et al (1997), o aumento de colesterol nas aves pode ocorrer por insuficiência hepática, obstrução biliar extra hepática, fibrose ou hiperplasia de ductos biliares.

O aumento da concentração sérica das proteínas totais foi mais evidente no Grupo 1 (4º DPI ao 16º DPI) em relação ao Grupo 3, no qual foi observado um aumento apenas no 16º DPI. Os valores estão demonstrados no **Gráfico 10**.

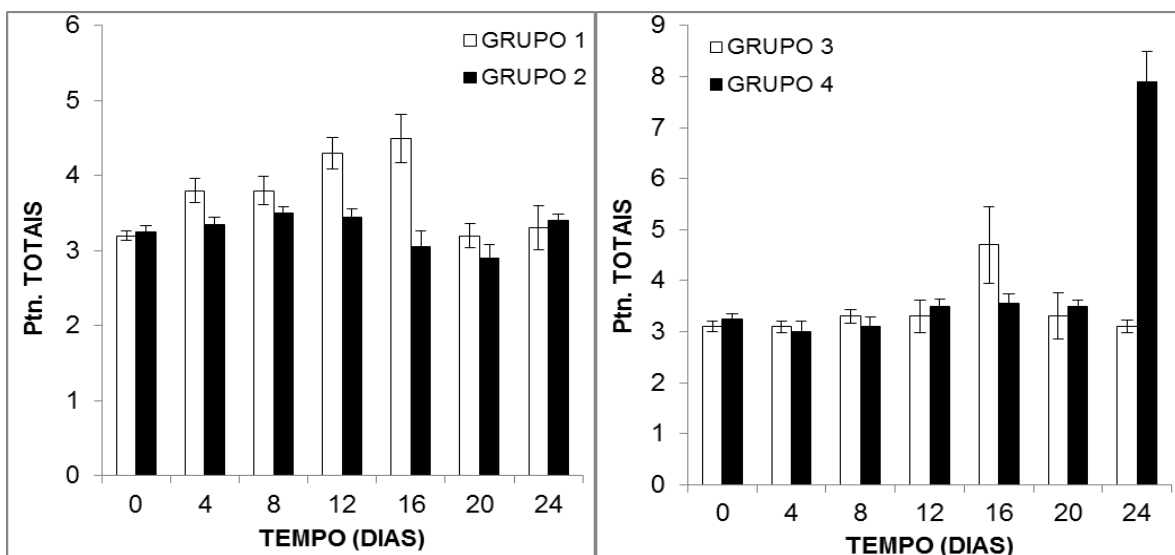


Gráfico 10. Concentração sérica de Proteínas totais nos quatro grupos experimentais. Grupo 1 (Aves inoculadas com soro infectado por *Borrelia anserina*), Grupo 2 (Aves inoculadas com soro fisiológico a 0,9%), Grupo 3 (Aves expostas à carrapatos infectados com *Borrelia anserina*) e Grupo 4 (Aves expostas à carrapatos livres de *Borrelia anserina*).

Rivetz et al (1977b) encontrou apenas no 5º e 7º DPI de sangue infectado um aumento das proteínas totais. Essa elevação das proteínas se deve em grande parte pela produção intensa de imunoglobulinas em resposta à infecção estabelecida na ave. De acordo com Lumeij (1997) e Jones (1999), em condições inflamatórias agudas ou crônicas, como nas nefropatias e insuficiência hepática, pode ocorrer o aumento das proteínas totais, principalmente pela elevação das globulinas.

4.3.1. Análise dos componentes principais

A análise de componentes principais (PCA) é um recurso estatístico de análise exploratória e multivariada dos dados, que permite analisar simultaneamente medidas múltiplas para cada variável. Algumas diferenças encontradas entre os grupos experimentais quando analisadas em conjunto, poderão se revelar significativas ou não. De acordo com Lyra et al (2010), a PCA permite revelar a existência ou não de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas e de agrupamentos entre amostras.

Lyra et al (2010), relata que a análise de componentes principais ilustra a relação entre os parâmetros pelo gráfico de *score* e que a primeira componente principal (PC1) modela o comportamento dos dados. A análise dos gráficos de PCA no presente trabalho demonstra uma relação entre algumas variáveis. Os **Gráficos 11** e **12** mostram que os valores de peso médio corporal, ácido úrico, ALT, creatinina e proteínas totais foram os que mais variaram em relação aos grupos controles, tendendo a se agrupar e adquirindo um comportamento independente do tempo em dia, enquanto os valores de AST e glicose, não variaram significativamente durante o experimento, em relação aos grupos controles, agrupando-se do lado oposto no gráfico. Biologicamente, a relação entre a perda do peso corporal, ALT, ácido úrico e proteínas totais elevados podem ser explicados pelo próprio quadro infeccioso instalado pela borreliose aviária, que resultou no aumento de seus valores encontrados nas análises bioquímicas já relatadas acima. Os valores de AST e glicose, por sua vez apresentaram pequenas oscilações nos seus valores, sendo pouco expressivas no diagnóstico bioquímico do presente trabalho.

Esta análise dos componentes principais demonstrou estatisticamente, as relações existentes entre os parâmetros clínicos e bioquímicos dos grupos experimentais e os gráficos

de *score* mostraram a separação destes parâmetros segundo seus comportamentos em função do tempo.

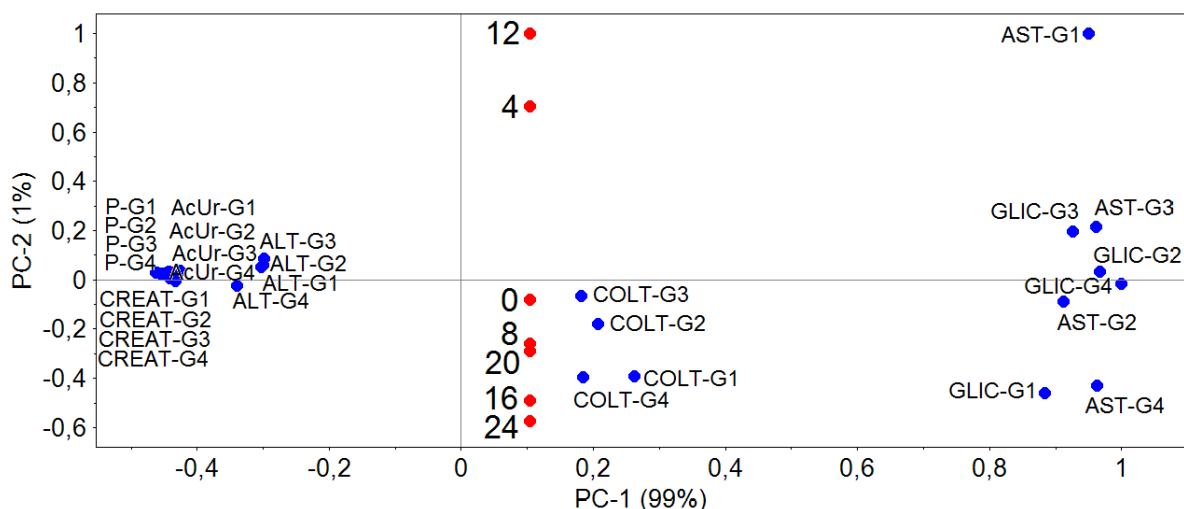


Gráfico 11. Gráfico de *score* da análise dos componentes principais (PCA) do peso médio corporal e dos parâmetros bioquímicos.

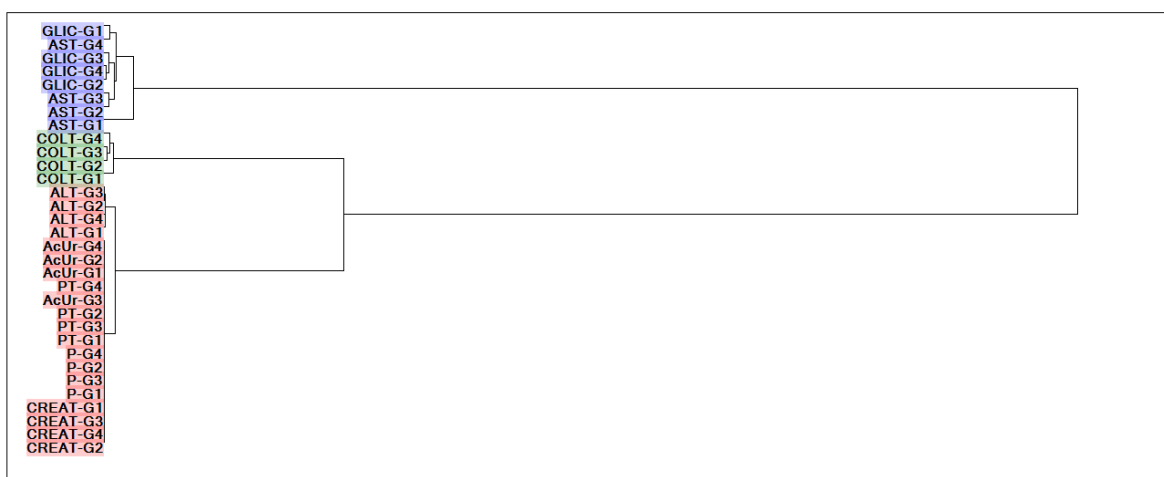


Gráfico 12. Chaveamento da análise dos componentes principais (PCA) do peso médio corporal e dos parâmetros bioquímicos.

4.4. Aspectos macroscópicos das lesões

A inspeção macroscópica foi realizada com os órgãos ainda na cavidade celomática e posteriormente a extração. As aves dos Grupos 1 e 3, apresentaram no momento da necropsia, uma considerável hepatomegalia com congestão dos órgãos (**Figura 17**), aumento em sua espessura, bordas arredondadas e irregulares e coloração tendendo à vermelho – azulado, o que caracterizou um quadro de cianose. Constatou-se ainda presença de manchas esbranquiçadas e pequenas áreas claras na superfície dos órgãos (**Figura 18**). O fígado acometido das aves do Grupo 1, mostrou-se grande e praticamente ocupando grande parte da

cavidade celomática, quando inspecionado ainda na carcaça e os fígados das aves do Grupo 3 se mostraram friáveis após a manipulação. As vesículas biliares das aves dos dois grupos estavam repletas, com bile viscosa e escurecida.



Figura 17. Fígado de ave infectada por *Borrelia anserina*, apresentando hepatomegalia e congestão



Figura 18. Fígado acometido pela doença ocupando grande parte da cavidade celomática da ave, apresentando manchas esbranquiçadas e pequenas áreas de claras na superfície.

Segundo Boero (1967), o fígado de uma ave acometida por *B. anserina*, sofre um processo inflamatório agudo intenso. O órgão aumenta de tamanho e na necropsia pode apresentar acúmulos de gordura e focos de necrose. De acordo com Butler (1976), o depósito de gordura, podendo ser difuso ou não, revela um fígado de aspecto amarelado e de consistência friável, processo esse decorrente de lesões nos hepatócitos que prejudicam sua capacidade de metabolização normal, podendo ocorrer a retenção das gorduras. Estas informações sobre o dano hepático causado pela infecção corroboram com os achados patológicos do presente estudo, em relação ao processo inflamatório e à presença de focos de necrose na superfície dos órgãos.

Após estudar a patologia da espiroquetose aviária em aves de diferentes idades, Nasri et al (2010), revelaram alterações hepáticas decorrentes da infecção por *B. anserina* em exames realizados de três a cinco dias após a infecção e observaram fígado congesto, grande e friável. De forma semelhante o presente experimento também revela no 4º DPI das aves do

Grupo 1, fígados marcados pelas mesmas lesões e no 8º DPI das aves do Grupo 3 aumento do órgão e fragilidade tecidual. McNeil (1949) revelou ligeiras diferenças nas alterações hepáticas em perus, quando infectados experimentalmente por *B. anserina*, em relação à infecção em galinhas, tanto na fase de crescimento como em adultos, com o fígado apresentando ocasionalmente algumas petéquias, pequenos abscessos na superfície, aumento de tamanho e áreas de infarto na periferia do órgão, porém não tão evidentes e consistentes como encontrado em galinhas.

A principal causa do aumento e da congestão hepática nas aves dos grupos infectados pode estar ligada à sobrecarga do órgão, devido à presença de substâncias tóxicas produzidas pelas bactérias durante o quadro septicêmico causado pela infecção e pelo processo inflamatório intenso na região.

O exame macroscópico dos baços coletados das aves dos grupos infectados revelou esplenomegalia. Os órgãos apresentavam-se congestionados e de consistência friável, ainda pôde-se verificar evidenciação dos folículos linfóides (**Figura 19**).



Figura 19. Baço acometido de ave infectada apresentando intensa congestão e consistência friável ao corte

Estes achados estão de acordo com Shommein e Khogali (1974), que observaram aumento de 4 a 6 vezes maior que o normal e Bandopadhyay & Vegad (1983), que visualizaram também presença de manchas. Estes autores afirmam que a esplenomegalia encontrada durante a infecção é causada por uma reação inflamatória intensa, mediada por mecanismos eritrofagocitários, hiperplasia reticular e presença de hemossiderose. Com o comprometimento esplênico, a produção de eritrócitos é prejudicada e a destruição dos eritrócitos se torna maior que sua síntese. No baço, durante a infecção por *B. anserina*, pode-se encontrar lesões hemorrágicas e áreas de infarto anêmico, ocasionadas por embolias capilares, que se instalam devido ao grande aglomerado de espiroquetas presentes no pico da parasitemia (BOERO, 1967).

Os rins das aves infectadas encontravam-se no momento da necropsia, congestionados e aumentados de tamanho (**Figura 20**). À palpação, os rins se mostraram friáveis, com superfícies irregulares e os lóbulos evidenciados (**Figura 21**), o que segundo Boero (1967) é um achado comum na espiroquetose aviária.

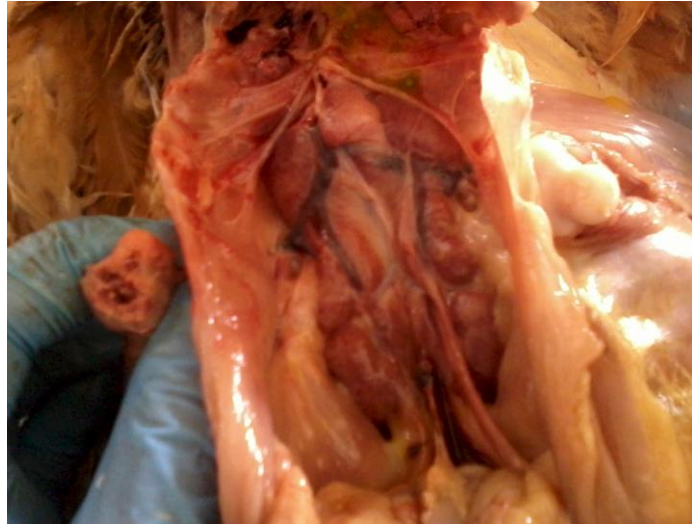


Figura 20. Rins de uma ave infectada ainda na cavidade mostrando aumento de tamanho e congestão.



Figura 21. Fragmento de rim de ave infectada, apresentando superfícies irregulares e consistência friável.

Shommein e Khogali (1974), também encontraram achados renais semelhantes ao presente estudo, como aumento e flacidez dos órgãos, além de uma hemorragia da região capsular do órgão.

Quanto ao coração, não houve alterações macroscópicas importantes, embora Shommein e Khogali (1974) e Boero (1967), relatem a presença de petéquias no pericárdio de aves infectada, quadro de miocardite difusa e pericardite com exsudato fibrinoso na cavidade.

Macroscopicamente, não houve alterações na morfologia e/ou coloração dos cérebros examinados. Não foram encontradas alterações após avaliação macroscópica dos órgãos das aves dos grupos controles.

4.5. Histopatologia

4.5.1. Exame histopatológico das lesões causadas pela infecção

A análise microscópica das lâminas com fragmentos de tecido hepático das aves do grupo 1 revelou uma discreta vacuolização difusa nos hepatócitos, presença de pequenos focos de infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente perivascular rico em macrófagos (**Figura 22a**) que variaram de leves a moderados, inflamação periportal mononuclear (pericolangite) com presença de eosinófilos. Além disso, evidenciou-se congestão e dilatação dos sinusóides hepáticos, discreta bilestase, edema dos espaços de Disse e focos de necrose fibrinóide (**Figura 22d**).

Quanto às aves do Grupo 3, as lâminas exibiram um tecido hepático com acentuados focos de infiltrado inflamatório mononuclear perivascular rico em macrófagos e presença de eosinófilos e fibrina (**Figura 22b**). Revelou-se também dilatação dos capilares sinusóides com a presença de uma substância eosinofílica no interior, além da presença de trombos de fibrina no interior dos vasos (**Figura 22c**). Estes resultados estão de acordo com Vashist (2011), que encontrou alterações hepáticas semelhantes como congestão, dilatação dos capilares sinusóides e presença de um infiltrado inflamatório linfocítico, além de vacuolização hepatocelular.

De acordo com Boero (1967), o tecido hepático acometido pela infecção por *B. anserina* revela a presença de células monocitárias intensamente plasmáticas, com a presença de inclusões e vacuolizações produzidas pela atuação dos macrófagos. Nasri et al (2010), observou alterações microscópicas hepáticas importantes decorrentes da infecção pelas espiroquetas, como depósito de linfócitos no tecido conectivo interlobular, além de uma congestão com dilatação da veia porta. Srinivasan e Rao (1966) e Shommein e Khogali (1974), descreveram em seus estudos, um tecido hepático granular com presença de degeneração de hepatócitos e infiltração de células mononucleares nos sinusóides. Relatam ainda marcante dissociação dos cordões de hepatócitos, tecido com vários graus de necrose, além da presença de uma eritropoiese marcante. Esta eritropoiese também foi reportada por Cooper e Bickford (1993) após examinarem fragmentos hepáticos acometidos pela doença e observarem intensa atividade eritrofagocítica, com a presença de inúmeros fagócitos em células de Kupffer.

A eritrofagocitose instalada foi ocasionada pela destruição maciça de eritrócitos, estimulando uma produção desacelerada de glóbulos vermelhos pelo sistema hematopoiético. As toxinas produzidas pelas espiroquetas inibem a formação de novos eritrócitos, levando o fígado a um estado de asfixia e conseqüentemente prejudicando a atividade normal do órgão (SHOMMEIN e KHOGALI, 1974).

As alterações enzimáticas observadas durante o experimento provavelmente estão associadas aos distúrbios hepáticos causados pela infecção. O extravasamento das transaminases ocorreu devido à disfunção hepática originada por estados necróticos, ruptura dos hepatócitos com conseqüente aumento da permeabilidade celular e também por processos obstrutivos como interrupção do fluxo biliar (KANEKO, 1989). A pericolangite observada provavelmente ocorreu devido ao intenso processo inflamatório das vias biliares intra-hepáticas, acarretando em edema no espaço de Disse. A necrose fibrinóide constatada ocorreu devido à destruição vascular causada pelas bactérias e deposição de fibrina na parede dos vasos hepáticos.

O exame histopatológico dos tecidos esplênicos das aves infectadas revelou uma redução considerável do tecido linfóide e necrose com leves filamentos e depósitos de fibrina na região medular do órgão (**Figura 23h**), além da presença de acúmulos de substância eosinofílica. Estes achados corroboram os resultados encontrados por Shommein e Khogali

(1974), que relataram um tecido esplênico com aumento de eosinófilos e um espessamento do endotélio das artérias esplênicas, caracterizando o quadro de esplenomegalia. Segundo estes mesmos autores, a polpa vermelha reduziu de tamanho, sendo observado na região, infiltrado de células reticuloendoteliais, além da presença de macrófagos, linfócitos e eritrócitos.

Segundo Bandopadhyay e Vegad (1983), a esplenomegalia observada na infecção foi causada por hiperplasia reticular e um processo inflamatório intenso, estabelecido para combater a infecção bacteriana. Achado histopatológicos encontrados por estes autores como intensa eritrofagocitose em consequência da destruição de hemácias e produção de hemossiderina, não foram observados neste experimento. Focos de necrose também foram encontrados por Nasri et al (2010), sendo também observado nos baços examinados no presente estudo.

Nas lâminas do tecido renal, foram evidenciados focos de leve inflamação perivascular (**Figura 22e**), predominantemente mononuclear com presença de eosinófilos, em geral em torno das veias intralobulares. Foram visualizados também congestão (**Figura 22f**) e dilatação dos vasos sanguíneos, além de alguns trombos de fibrina. Alterações renais, como glomerulonefrite, foram relatadas por Srinivasan e Rao (1966) em exame microscópico de tecidos acometidos pela enfermidade. Cooper e Bickford (1993) observaram um foco linfoplasmocitário disperso e uma fibroplasia intersticial nos rins.

Estas alterações inflamatórias, acompanhadas da congestão do órgão, sugerem uma sobrecarga renal. A taxa de filtração glomerular foi afetada em sua funcionalidade resultando na ineficiência da eliminação do ácido úrico observado no grupo 1.

Apenas uma ave do grupo 1 apresentou alterações no tecido cardíaco, com presença de pequenos focos de infiltrado inflamatório mononuclear rico em macrófagos entre as fibras musculares cardíacas e presença de eosinófilos (**Figura 23g**). Srinivasan e Rao (1966) descreveram uma degeneração das fibras do miocárdio, aumento da granularidade e perda das estriações cardíacas, achados estes não encontrados no atual estudo.

O exame histopatológico do sistema nervoso revelou um tecido cerebral com alterações a nível do plexo coróide com inflamação local (**Figura 23j**), presença de infiltrado inflamatório perivascular mononuclear (**Figura 23i**), inflamação mononuclear de meninge (**Figura 23l**) e edema submeningeano (**Figura 23 k**). A presença do edema nas meninges é causada pelo denso infiltrado inflamatório instalado no local e provavelmente contribuiu, juntamente com a presença das espiroquetas, para o estabelecimento de um estado de torpor e prostração verificado durante o período sintomatológico da doença.

Relatos sobre alterações patológicas em tecidos cerebrais causadas pela espiroquetose aviária são ainda muito escassos na literatura. Alterações congestivas dos vasos sanguíneos cerebrais e mudanças nos neurônios são relatadas, mas foram pouco estudados.

As quatro aves dos grupos controles (Grupos 2 e 4) não apresentaram alterações histopatológicas em seus órgãos ao exame microscópico.

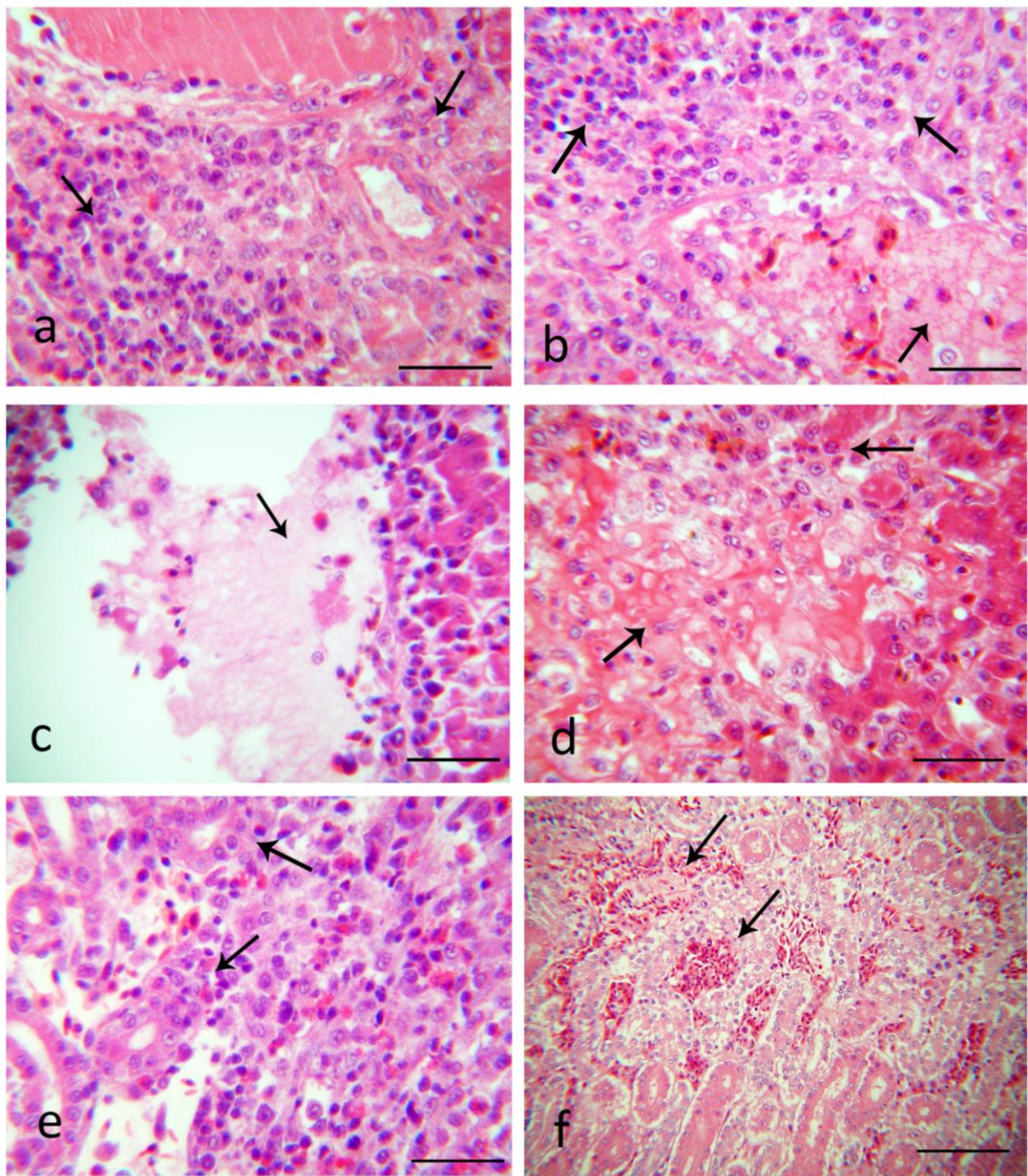


Figura 22. Registro fotográfico histopatológico das alterações observadas nos diferentes tecidos das aves dos grupos infectados por *Borrelia anserina*. (Barra = 50 μ m). a – Fígado: perivasculite mononuclear (Obj. 40x); b – Fígado: perivasculite mononuclear com fibrina (Obj. 40x); c – Fígado: trombo de fibrina no interior de um vaso (Obj. 25x); d – Fígado: necrose fibrinóide e perivasculite (Obj. 40x); e – Rim: perivasculite (Obj. 40x); f – Rim: congestão (Obj.16x).

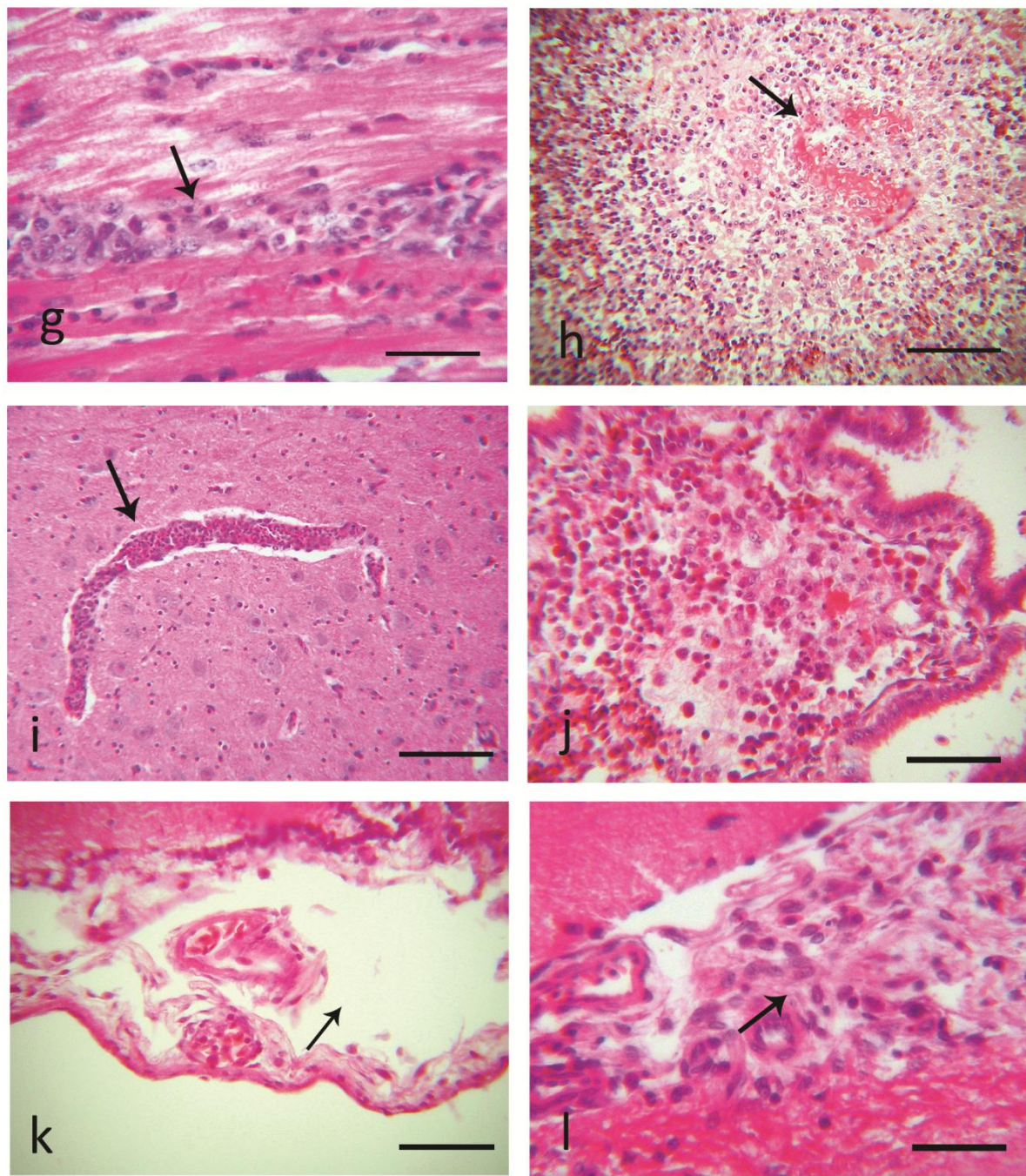


Figura 23. Registro fotográfico histopatológico realizado através da coloração de HE, das alterações observadas nos diferentes tecidos das aves dos grupos infectados por *Borrelia anserina*. (Barra= 50µm). g – Coração: miocardite (Obj. 40x); h – Baço: necrose fibrinóide (Obj. 16x); i – Cérebro: infiltrado inflamatório perivascular mononuclear (Obj. 16x); j – Cérebro: plexoroidite mononuclear com fibrina (Obj. 25x); k – Cérebro: edema submeningeano (Obj. 25x); l – Cérebro: inflamação mononuclear da meninge com presença de fibrina (Obj. 25x).

4.5.2. Coloração de prata e visualização das espiroquetas

A impregnação argêntica pelo método de Warthin-Starry é usada rotineiramente em laboratórios e permite a visualização simultânea de bactérias, alterações histológicas em casos de gastrite e em outras patologias como a metaplasia intestinal (ZIMAITY et al., 1999). As lâminas dos cortes histológicos do fígado, baço, rins, coração e cérebro das aves dos grupos infectados por *B. anserina* foram coradas para visualização das espiroquetas nos tecidos. No presente estudo foram observadas espiroquetas em todos os tecidos examinados na histopatologia (**Figura 24**), principalmente no fígado, baço, rins e coração das aves infectadas. Foram observadas tanto no interior de hepatócitos, células epiteliais dos rins e miócitos cardíacos, como no meio extracelular, no interior de vasos e espaço submeningeano, o que caracteriza um quadro agudo e septicêmico da doença. Esta técnica de coloração também foi utilizada por Cooper e Bickford (1993), tendo revelado um grande número de espiroquetas nos vasos sanguíneos e no interstício do fígado, rins e baço.

Segundo Kiernan (2002), a técnica de coloração com a prata confirma a presença das espiroquetas e de outros componentes bacterianos pertencentes à espécie nos tecidos e apresenta uma coloração negra, que distingue as bactérias de outros organismos.

Garvey (1996) relatou a utilização da impregnação por prata para o diagnóstico auxiliar em um caso de Doença de Lyme na América do Norte, sendo as espiroquetas visualizadas a partir de fragmentos de pele infectada. Espirilos e espiroquetas possuem pouca afinidade pelos corantes comumente empregados, corando-se fracamente e quando corados pela prata, podem ser visualizados em marrom-escuro ou negro contra um fundo castanho-amarelado.

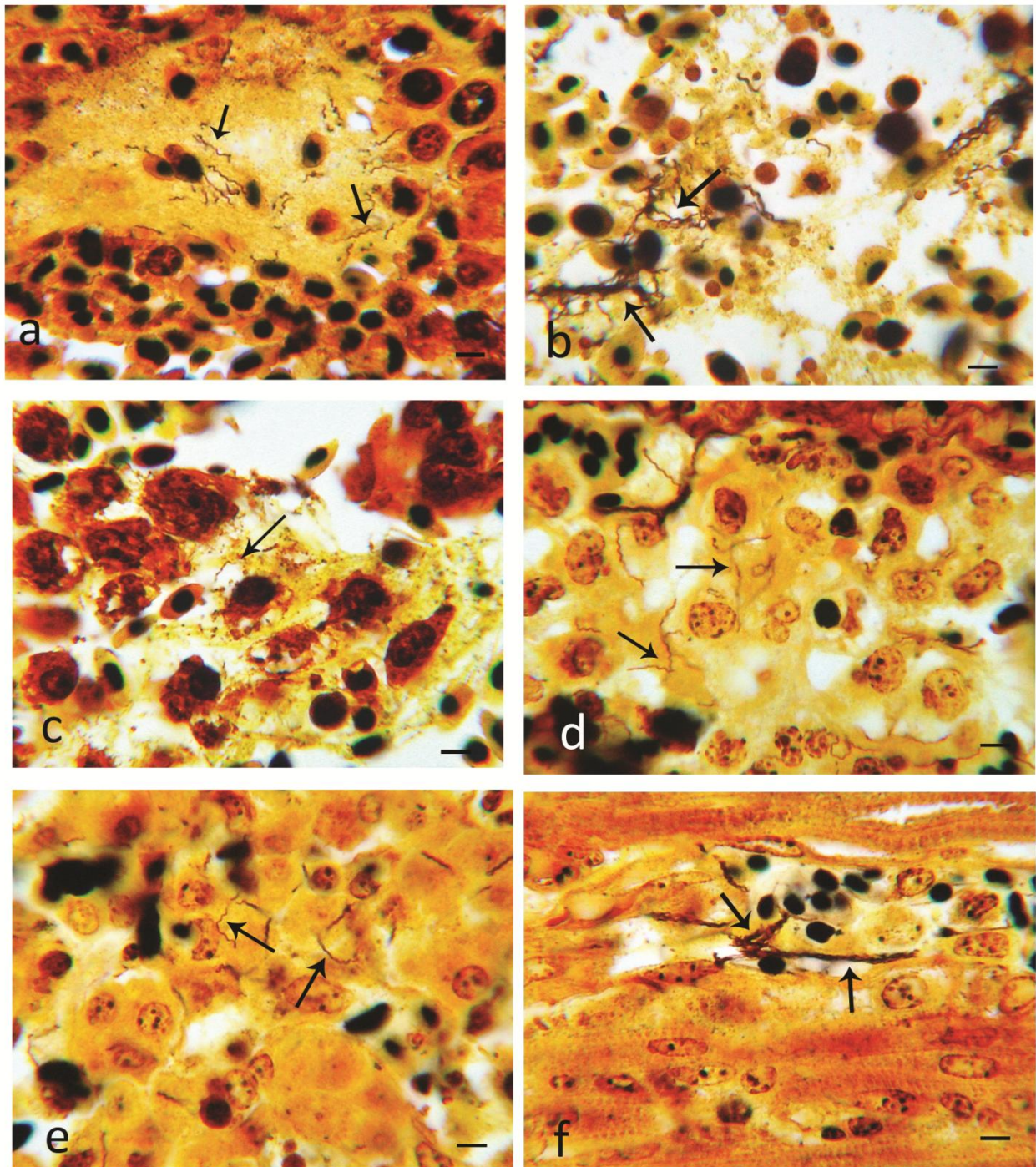


Figura 24. Registro fotográfico da visualização das espiroquetas nos diferentes tecidos das aves infectadas, corados por prata pela técnica de Whartin-Starry (Barra= 10 μ m). a – Rim (Obj. 100x); b – Rim: interior de um vaso (Obj. 100x); c – Plexo coroide (Obj. 100x); d – Baço (Obj. 100x); e – Fígado: interior de hepatócito (Obj. 100x); f – Coração (Obj. 100x).

5. CONCLUSÕES

1. Através dos valores médios em dias dos parâmetros epidemiológicos, foi constatado que há diferenças quanto aos períodos pré- patente e de patência para os grupos expostos à infecção por *B. anserina*. O grupo que foi exposto aos carrapatos infectados obteve resultados epidemiológicos mais tardiamente que o grupo inoculado com soro infectado por *B. anserina*. Os valores foram confirmados através da realização de uma curva bacteriana durante o curso da infecção.
2. As aves infectadas por *B. anserina*, apresentaram sintomatologia clínica característica da espiroquetose aviária, como palidez de mucosas, penas arrepiadas e prostração, diarreia esverdeada, hipertermia, sonolência e inapetência. As aves dos grupos experimentais que foram estudadas até o fim da avaliação, não apresentaram mais espiroquetas no sangue, com melhora considerável em seu estado sanitário.
3. A infecção por *B. anserina* causou danos hepáticos severos confirmados através das alterações bioquímicas encontradas durante a infecção, principalmente em relação ao aumento de ALT. Estas alterações, associadas aos achados anátomo-histopatológicos no fígado, refletiram fielmente o estado sanitário das aves durante a infecção.
4. A infecção por *B. anserina* provocou alterações histopatológicas graves no fígado, rins e baço, além da presença marcante das espiroquetas em todos os tecidos avaliados. Estes fatos confirmaram o caráter agudo e septicêmico da espiroquetose aviária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERER E.; DURAY P.H. Morfology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 29(4):764-772, 1991.
- ABARÁCON, D. **Programa de adiestramiento em salud animal para América Latina**. Organización Panamericana de Salud, Terra Nova AS, Washington, D. C. USA, 291p, 1987.
- AMAND, W.B. Avian Clinical Hematology and Blood Chemistry. In: FOWLER, M.E. **Zoo and Wild Animal Medicine**, 2nd edition. Philadelphia, W.B. Saunders, p. 264-276, 1986.
- APPEL, M.J.G.; ALLAN S.; JACOBSON R.H.; LAUDERDALE T.L.; CHANG Y.F.; SHIN S.J.; THOMFORD J.W.; TODHUNTER R.J.; SUMMERS B.A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *Journal of Infect Diseases*. 167:651-664, 1993.
- ARAGÃO, H.B. Soroterapia e vacinação na espiroquetoze das galinhas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 3, 3-39, 1911.
- ASLAM, B.; HUSSAIN, I.; MAHMOOD, M.S.; RAHMAN, S.U.; SIDDIQUE, A.B. Flagellin gene based phylogenetic analysis of Pakistani strain of *Borrelia anserina* isolated from *Argas* ticks. **African Journal of Microbiology Research**. 6:3214-3221, 2012.
- AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbondioxide in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 391, n. 12, p. 1103-1110, 1993.
- ATALIBA, ALEXANDRE CAMARGO. **Estudo de *Borrelia* spp no Brasil**. 61f: il. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.
- AVILA, V. S.; ALBINO, J.; BASSI, L. **Cuidados Iniciais na Produção do Frango de Corte Colonial Embrapa 041. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Suínos e Aves. 2004**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/cuidados_iniciais_prod_fc_colonial_emb_rapa_041_000fzo1kten02wx5ok0cpoo6aw1a2vz3.pdf> Acesso em: 24 de Junho de 2014.
- AVILA, V.S.; CODLEBELLA, A; BRUM, P.A.R.; FIGUEIREDO, E.A.P.; ARMILIATO, N.M. **Níveis de energia metabolizável para frangos de corte de alto desempenho, em criações alternativas. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 398. 4 p, 2005.**
- BALASHOV, Y.S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**. 8(5):159-376. 1972.

BALASHOV, Y. S. Bloodsucking Insects and Ticks and Mites, Vectors of transmissible Infections of Humans and Domestic Animals. **Entomological Review**. v. 85, n. 8, p. 990-1007, 2005.

BANDOPADHYAY, A. C.; VEGAD, J. L. Observations on the pathology of experimental avian spirochaetosis. **Research in Veterinary Science**, V. 35, n. 2, p-138-144, 1983.

BARANTON, G.; POSTIC, D.; SAINT GIROS, I.; BOERLIN, P.; PIFFARETTI, J. C. ASSOUS, M.; GRIMONT, P. A. D. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. Nov., and VS461 associated with Lyme borreliosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 378-83, 1992.

BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.

BARNES, H. J. Spirochetosis (Borreliosis). In: CAMEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MACDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. (Ed). **Disease of Poultry**. Iowa: Iowa State University Press Ames, p. 318-324. 1997.

BASSI, L. J.; ALBINO, J. J.; AVILA, V. S.; SCHIMDT, G. S.; JAENISCH, F. R. F. **Recomendações básicas para manejo de frangos de corte colonial. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves**. Documentos / Embrapa Suínos e Aves. 19p, 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/publicacao_i4t543i_000fjbm08m02wyi_v809gkz51a9e6qfs.pdf>. Acesso em: 07/12/14.

BENNETT, C.E. **Ticks and Lyme disease**. Advances in Parasitology. 36:343-405, 1995.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24.ed. Editora melhoramentos. São Paulo. 1234p, 1985.

BOERO, J. J. **Parasitosis animales**. Editora Universidade de Buenos Aires 498p, 1967.

BONÉ, G. L. **Excrétion des spirochetes de Dutton chez *Ornithodoros moubata***. Circulation Research of Society Biology.v. 130, p.84-85, 1939.

BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P.; SAITO, M.E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 48 (4),675–677, 2006.

BRASIL. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Tabela 1. Tabela de Agentes e Métodos de Eutanásia para aves por grupos taxonômicos. p.43. 2013.

BROCKBANK, K. G. M.; COVAULT, J. C.; TAYLOR, M. J. Guide Cryopreservation. Part 1: Cryobiology and Cryopreservation. **Thermo Fisher Scientific Inc**. p.1-9, 2007.

BURGDORFER, W. **Manual of Clinical Microbiology. Borrelia**. Ed E. H. LENNETTE. 4ºed. Washington, American Society for Microbiology, pp 479-484, 1985.

BURGDORFER, W.; SCHWAN, T. G. *Borrelia*. In: BALOWS, W. J. HAUSLER, JR., K. L. HERRMANN, H. D. ISENBERG, AND H. J. SHAWDOMY, eds. **Manual of clinical microbiology**, 5ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 560-566, 1991.

BURNS, A. Staining intestinal spirochetes. **Medicina of Laboratorial Science**. 39: 75-77, 1982.

BUTLER, E. J. Fatty liver diseases in the domestic fowl a review. **Avian Pathology**, 5: 1-14, 1976.

CALLOW, L. L. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. **British Veterinary Journal**, v. 123, n. 11, p. 492-497, 1967.

CAMPBELL, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M.A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, p. 479-492, 2004.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L.. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 16, n. 1, p. 71–120, 2013.

CDPA. **Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do SUL (UFRGS)**. Manual de Necropsia, p.14. Disponível em <www.cdpa.ufrgs.br>. Acesso em: 15 de nov. de 2014.

CHURUKIAN, C. J: A Whartin-Starry method for spirochetes and bacteria using a microwave oven. **Journal of Histotechnology**. 13: 149-151, 1988.

CIAS. **Central de Inteligência de Aves e Suínos**. Disponível em: www.cnpsa.embrapa.br/cias/. Acesso em: 18 de Novembro de 2014.

COOPER, G. L.; BICKFORD, A. A. Spirochetosis in California game chickens. **Avian Diseases**, v. 37, n. 4, p. 1167–1171, 1993.

CRUZ, F. G. G.; CHAGAS, E. O.; BOTELHO, T. R. P. Avicultura familiar como alternativa de desenvolvimento sustentável em comunidades ribeirinhas do Amazonas. **Interações**. Campo Grande, v.14, n.2, p. 197-202, jul./dez, 2012.

DaMASSA A.J.; ADLER H.E. Avian spirochetosis: natural transmission by *Argas (Persicargas) sanchezi* (Ixodoidea: Argasidae) and existence of different serologic and immunologic types of *Borrelia anserina* in the United States. **American Journal of Veterinary Research**. 40(1):154-157. 1979.

- DAVIS, G. E. The identification of spirochetes from human cases of relapsing fever by xenodiagnosis with comments on local specificity of tick vectors. **Experimental Parasitology**. 5:271–275,1956.
- DHAWEDKAR, R. G.; DHANESAR, N. S. Preservation of *Borrelia anserina* by liquid-nitrogen refrigeration. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 53, n. 10, p. 1124-1127, 1983.
- DICKIE, C. W.; BARRERA, J. A Study of the carrier state of avian spirochetosis in the chicken. **Avian Diseases**, v. 8, n. 2, p. 191-195, 1964.
- DODGE, R.W. Culture of ethiopian *Borrelia recurrentis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 25(6):935-939, 1973.
- FELSENFELD, O. **Borrelia**. Warren H. Green Publishing.St. Louis, MO,1971.
- FRANCIS, D. W: A case of fowl spirochetosis in New Mexico. **Poultry Science** 35: 1142-1143, 1956.
- FUDGE, A. M. Avian Liver and Gastrointestinal Testing. In: FUDGE, A.M. **Laboratory Medicine – Avian and Exotic Pets**; W.B. Saunders, p.47-55, 2000.
- GARG, R. R.; GAUTAM, O. P. Serological diagnosis of fowl Spirochetosis. **Avian Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 1971.
- GARVEY, W. Silver Impregnation Techniques to Identify Spirochetes and Other Bacteria. **Journal of Histotechnology**. Vol. 19, No. 3, p: 203-209, 1996.
- GORRIE, C. J. R. Vaccination against spirochetosis in fowls. **Journal of Australian Veterinary**. 26, 308–315, 1950.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.S.; David, M.M: Determination of serum protein by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**. 177: 751-760, 1949.
- GOTHE, R.; KOOP, E. Zur Biologischen Bewertung der Validitat von *Argas Persicargas) persicus* (Oken, 1818), *Argas (Persicargas) arboreus* kaiser, Hoogstraal und Kohls, 1964 und *Argas (Persicargas) walkerae* (Kaiser und Hoogstraal, 1969). I. Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie. **Zoological Parasitenkd**, v. 44, n.1, p. 299-317, 1974.
- GRUNKEMEYER, V. L. Advanced diagnostic approaches and current management of avian hepatic disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 13, n. 3, p. 413–427, 2010.
- HARR, K. E. Clinical chemistry of companion avian species: a review. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 31, n. 3, p. 140–151, 2002.
- HOCHLEITHNER, M. Biochemistries In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L. R. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, p. 176-198, 1994.

- HOERR, F.J. Liver: In.: RIDELL, C. **Avian histopathology**. Pensilvania: Library of Congress, P. 143-166, 1996.
- HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**. 543:217-234. 2003.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimor: Williams & Wilkins, 787p, 1994.
- HOOGSTRAAL, H., KAISER, M.N., WALKER, J.B., LEDGER, J.A., CONVERSE, J.D. and RICE, R.C.A. Observations on the subgenus *Argas* (Ixodoidea: Argasidae: *Argas*).10. *A. (A.)africolumbae*, n. sp., a Pretoria virus-infected parasite of birds in Southern and Eastern Africa. **Journal Medicine Entomology**. 12: 194-201, 1975.
- HOOGSTRAAL, H.. Ticks and Spirochetes. **Acta Tropica**. 36: 133-136,1979.
- HOOGSTRAAL H.. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances Parasitology*.24: 135–238, 1985.
- HURWITZ, S.; WEISELBERG, M.; EISNER, U., BARTOV, I.; RIESENFELD, G.; SHARVIT, M.; NIV, A.; BORNSTEIN, S. The energy requirements and performance of growing chickens and turkeys as affected by environmental temperature. **Poultry Science**, v.59, p.2290–2299, 1980.
- HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNINGER, R. **Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos**. Vol. 1. Editorial Labor, S.A., 739p, 1947.
- JAENSCH, S. Diagnosis of avian hepatic disease. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 9, n. 3, p. 126-135, 2000.
- JOHNSON, R. C.; BURGDORFER, W.; LANE, R. S.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.; HYDE, F. W. *Borrelia coriacea* sp. nov. putative agent of epizootic bovine abortion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 1, p. 72-74, 1987.
- JONES, M.P. Avian clinical pathology. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v.2, p.663-687, 1999.
- KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4^a ed. Academic, San Diego, 932p. 1989.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th ed., San Diego, Academic Press, 932p. 1997.
- KAWABATA, H.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 37, n. 11, p. 843-848, 1993.

KIERNAN, J. A. Silver Staining for Spirochetes in Tissues: Rationale, Difficulties, and Troubleshooting. **Laboratory medicine**. V. 33, n. 9, p: 705-708, 2002.

KOHL, G. M.; HOOGSTRAAL, H.; CLIFFORD, C. M.; KAISER, M. N. The subgenus *Persicargas* (Ixodoidea) *sanchesii* (Dugés) and *A. (P.) miniatus* (Koch), new world tick misidentified as *A. (P.) persicus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 63, n. 1, p. 590-606, 1970.

KONEMAN, E. W. Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. In: KONEMAN, E. W. **Infecciones producidas por espiroquetas**. Buenos Aires: Médica Panamericana, p. 1085-1097, 2008.

KNOWLES, R.; GUPTA, B. M.; BASU, B.C. Studies in avian spirochetosis. **Indian Medical Research**. Memories, v. 22, p. 1-122, 1932.

KRIEG N.R.; HOLT J.G. **Bergeys Manual of Systematic Bacteriology**. Vol.1. 8th Edition, Williams & Wilkins, London, p.57-62. 1984.

LABRUNA, M. B.; RESENDE, J. S.; MARTINS, N. R. S.; JORGE, M. A. Cryopreservation of an avian spirochete strain in liquid nitrogen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 6, p. 551–553, 1999.

LE FLECHE, A.; POSTIC, D.; GIRARDET, K.; PETER, O.; BARANTON, G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 921-925, 1997.

LEVADITI, C: Sur la coloration du Spirochaete pallida Schaudinn dans leus coupes. **Comptes Rendus des Séances de La Société de Biologie et de ses Filiales**. 59(2): 326, 1905.

LEWANDOWSKI, A.H.; CAMPBELL, T.W.; HARRISON, G.J. Clinical Chemistries. In: HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Clinical Avian Medicine**, Philadelphia, W. B. Saunders,. 717p.,1986.

LEVINE, J. F.; DYKISTRA, W. L.; NICHOLSON, R.L.; WALKER, R.L.; MASSEY, G. Attenuation of *Borrelia anserina* by serial passage in liquid medium. **Research in Veterinary Science**, v. 48, n. 1, p. 64-69, 1990.

LIERZ, M. Avian renal disease: pathogenesis, diagnosis and therapy. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 6, p. 29-55, 2003.

LISBÔA, R. S. **Estudo da transmissão experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff,1891) por *Argas (Persicargas) miniatus* Kock, 1844 e avaliação comparativa de parâmetros clínicos e hematológicos em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758**. 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2006.

LISBÔA, R. S.; GUEDES, D. S.; SILVA, F. J. M.; CUNHA, N. C.; MACHADO, C. H.; FONSECA, A. H. Alterações nos parâmetros hematológicos de *Gallus gallus domesticus* experimentalmente infectados por *Borrelia anserina*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n.10, p.527-532, 2008.

LISBÔA, R. S.; TEIXEIRA, R. C.; RANGEL, C. P.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Avian Spirochetosis in Chickens Following Experimental Transmission of *Borrelia anserina* by *Argas (Persicargas) miniatus*. **Avian Diseases**, 53:166–168, 2009.

LUMEIJ, J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5th edition. San Diego, Academic Press, 932p, 1997

LYRA, W. S.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U; FRAGOSO, W. D. Classificação periódica: Um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. *Química Nova*. Vol. 33, No. 7, 1594-1597, 2010.

MAGALHÃES, F. E. P. **Novos Aspectos Morfológicos, Biológicos e Tóxicos de *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 (Ixodoidea, Argasidae) no Estado do Rio de Janeiro**. 1979. 95f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 1979.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; APPERSON, C. S.; FISH, D.; JOHNSON, R. C.; CHAPPELL, W. A. Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white tailed deer from Connecticut, New York state, and north Caroline. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 178-188, 1986.

MANS, B. J.; GOTHE, R.; NEITZ, W. H. Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. **Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 95-111, 2004.

MARCHOUX, E.; SALIMBENI, A. La spirillose des poules. **Annales de l'Institut Pasteur Lille**, v. 17, n. 1, p. 569-580, 1903.

MARCONI R.T., LIVERIS D. & SCHWARTZ I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 33(4):2427-2434. 1995.

MATHEY, W. J. Jr, SIDDLE, P. J: Spirochetosis in pheasants. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 126: 123-126, 1955.

McKERCHER, D. G. The propagation of *Borrelia anserina* in embryonated eggs employing the yolk sac technique. **Department of Veterinary Science**, University of California, Davis, California, v. 59, 1949.

McNEIL, E.; HINSHAW, W. R.; KISSLING, R. E. A study of *Borrelia anserina* infection (spirochetosis) in turkeys. **Journal of Bacteriology**, v. 5, n. 2, p. 191-206, 1949.

MELILLO, A. Applications of serum protein electrophoresis in exotic pet medicine. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 16, n. 1, p. 211–225, 2013.

MERCHANT, L. A.; PACKER, R. A. **Bacteriologia y virologia veterinarias** 2.ed. Zaragoza: Acribia, 864p, 1965.

MICHEL, C.; GARCIA, C.. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. **Veterinary Research**. 34:127-132, 2003.

NASRI, I. M. E.; SHIGIDI; MOHAMMED, M. T. A. M. Pathology of Domestic Fowl Spirochetosis in Different Age Groups of Chicken Experimentally Infected with *Borrelia anserina*. **The Sudan Journal Veterinary Research**. v. 25, p. 23-28. 2010

NAKAYAMA Y.; SPIELMAN A.; JAMES A. A. Protein synthesis induced by heat in an Ixodes tick. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 19:731-736, 1989.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information: banco de dados**, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=138>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

NEITZ, W. O. A consolidation of our knowledge of the transmission of tick-borne diseases. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 27, n. 2, p. 115-163, 1956.

PÊSSOA, S. B. **Parasitologia Médica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 894p, 1963.

PAVLOVSKY, E. N. **Natural Nidality of Transmissible Diseases**. Peace Publishers, Moscow. 250p, 1965.

PETNEY, T. N.; ANDREWS, R. H. McDIARMID, L. A., DIXON, B. R. *Argas persicus* sensu stricto does occur in Australia. **Parasitology Research**. 93: 296-299, 2004.

PFISTER, H. W.; WILSKE, B.; WEBER, K. **Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects**. Lancenet, v. 343, p. 1013-1016, 1994.

POSTIC, D.; BELFAZIA, J.; ISOGAI, E.; GIRON, I. S.; GRIMONT, P. A. D.; BARANTON, G. A new genomic species in *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolated from Japanese ticks. **Research in Microbiology**. v. 44, n. 6, p. 467-473, 1993.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. First Edition. Wolfe Publishing, London, p.292-303, 1994.

RANDOLPH, S. E.; GERN, L.; NUTTALL, P. A. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. **Parasitology Today**, v. 12, n. 12, p. 472-479, 1996.

REECE, W.O. **Fisiologia dos Animais Domésticos**, 12^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan. 926p, 2006.

RESTREPO, B. I.; CARTER, C. J.; BARBOUR, A. G. Activations of a vmp pseudogene in *Borrelia hermsii*: na alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. **Molecular Microbiology**. v. 13, n. 2, p. 287-299, 1994.

RIBEIRO, J.M.C.; MATHER, T. N.; PEISMAN, J.; SPIELMAN, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**. 24(2):201-205,1987.

RIVETZ , B.; BOGIN , E.; HORNSTEIN , K.; MERDINGER, M. Biochemical changes in fowl serum during infection with strains of Newcastle disease virus of differing virulence. Changes in serum proteins, uric acid, lipids and electrolytes. **Research in Veterinary Science**, v. 22, p. 285-291, 1977a.

RIVETZ, B.; BOGIN, E.; WEISMAN, Y.; AVIDAR, J.; HADANI, A.; Changes in the biochemical composition of blood in chickens infected with *Borrelia anserina*. **Avian Pathology**, 6: 343-351, 1977b.

ROSA, F.; CRESPO, M. V.; ESTEVES, L.; MENDES, L. Distribuição de *Argas* (*Argas reflexus reflexus* (Fabricius, 1974) no Norte e Centro de Portugal. **Acta Parasitológica Portuguesa**. 11 (1-2): 33-35, 2004.

ROHR, C. **Estudo s6bre ix6didas do Brasil**. Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz, p. 220, 1909.

ROKEY, N. W.; SNELL, V. N. Avian spirochetosis (*Borrelia anserina*) epizootics in Arizona poultry, **Journal of the American Veterinary Medical Association**.138: 648-652, 1961

SANTOS, H. A. **Ciclo Biol6gico Comparado de *Argas* (*Persicargas*) *miniatus* Koch, 1844 (Acari: Argasidae) alimentados em *Gallus gallus***. 2009, 52f. Disserta76o (Mestrado em Parasitologia Veterin6ria) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

SAKHAROFF, M.N. Spirochaeta anserina et la septicemie des oies. **Annales de l'Institut Pasteur** . 5, 564–566, 1891.

SCHWAN, T.G. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infectious agents and disease**, v. 5, n. 3, p. 167-181, 1996.

SCHMIDT, E; LOCATELLI -DITTRICH, R; SANTIN, E; PAULILLO, A. Patologia cl6nica em aves de produ76o – Uma ferramenta para monitorar a sanidade av6cola – revis6o. **Archives of Veterinary Science**, v 12, n.3. p.9-20, 2007.

SCHUMAKER, T.T.S.; OBA, M.S.P. Aspectos Morfo-biol6gicos de *Argas* (*Persicargas*) *miniatus* Koch,1844(Ixodoidea, Argasidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 32, n. 2, p. 161-173, 1988.

SHOMMEIN, A. M.; KHOGALI, A. Fowl spirochetosis haematological and histopathological studies. **Bulletin of Epizootic Diseases of Africa**, v. 22, n. 3, p. 255-261, 1974.

SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.

SONENSHINE, D.E. **Biology of Ticks**. Oxford University Press, New York, Vol. 2. 464p. 1991.

SOUZA, P. C. A. **Malaria Aviária: Parasitismo por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criações rústicas nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos clínicos e patológicos de sua infecção experimental**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 137p, 1998.

SRINIVASAN, V. V.; RAO, S. B. V. Studies on the histopathology of avian spirochaetosis. Poultry Pathology Section. **Indian Veterinary Research Institute**, Izatnagar, U. P. V. 43, n.10, p. 916-919, 1966.

THRALL, M.A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins. 518p, 2004.

TIMM, L.L. **Técnicas Rotineiras de Preparação e Análise de Lâminas Histológicas**. Caderno La Salle XI, Canoas, v.2, n.1, 231-239, 2005.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**. 6 24-27, 1969.

URIESTE, S., HALL L.R., TELFORD S.R.; TITUS R.G. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2- dependent mechanism. **Journal of Experimental Medicine**. 180:1077-1085, 1994.

VAIL, K. F: The Warthin-Starry impregnation technique with the microwave oven. **Histo-Logic**. 17: 235-236, 1987.

VAINIO, O.; IMHOF, B. A. The immunology and developmental biology of the chicken. **Immunology Today**, v. 6, n. 8, p. 365-370, 1995.

VASHIST, USHA. **Avaliação biológica, bioquímica e histopatológica das infecções experimentais causadas por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* L. 1758. 2011**. 114p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.

- WANG, G.; VAN DAM, A. P.; LE FLECHE, A.; POSTIC, D.; PETER, O.; BARANTON, G.; BOER, R.; SPANJAARD, L.; DANKERT, J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (Borrelia genomic groups VS116 and M19). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 927-932, 1997.
- WARTHIN, A. S.; STARRY, A. C: A more rapid and improved method for demonstrating spirochetes in tissue. **American Journal of Syphilis, Gonorrhea, and Venereal diseases**. 4: 97-102, 1920.
- WELKER, J. S.; ROSA, A. P.; MOURA, D. J.; MACHADO, P. M.; CATELAN, F.; UTPATEL, R. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.8, p.1463-1467, 2008.
- WENYON, C. M. **Protozoology**. Vol.II. London. 1563p, 1926.
- WOUDA W.; VEEN T.W.S.V.; BARNES H.J. *Borrelia anserina* in chickens previously exposed to *Borrelia theileri*. **Avian Diseases**. 19(1):209-210, 1975.
- ZIMAITY, H. M. T. E; WU, J.; GRAHAM, D. Y. Modified Genta triple stain for identifying *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Pathology**. 52: 693-694, 1999.
- ZINGG, B.C.; LEFEBVRE, R.B. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia coriaceae*, putative agent of epizootic bovine abortion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 11, p. 1509-1515, 1994.
- ZUNG, J. L.; LEWENGRUB, S.; RUDZINSKA, M. A.; SPIELMAN, A.; TELFORD, A. R.; PIESMAN, J. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 1, p. 1737-1748, 1989.

ANEXOS

ANEXO I

Certificado de Guia de trânsito animal e de vacinação dos pintos para Doença de Marek e Boubá Aviária no incubatório

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E AGRONEGÓCIO
DEPARTAMENTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA
DIVISÃO DE FISCALIZAÇÃO E DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

GUIA DE TRÂNSITO ANIMAL (GTA)
(VÁLIDA EM TODO O TERRITÓRIO NACIONAL)

UF
RS

SÉRIE
K

NÚMERO
698379

1. BOVÍDEOS Bovinos Bubalinos

até 12 meses		13 a 24 meses		25 a 36 meses		+ de 36 meses		total	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F

2. MARCA DO REBANHO
(PARA BOVINOS E BUBALINOS)

OP: _____

3. AVES

<input checked="" type="checkbox"/> Galinhas	<input type="checkbox"/> Ovos Férteis	<input type="checkbox"/> Bisavós	<input checked="" type="checkbox"/> Corte	Macho	Fêmea	Total
<input type="checkbox"/> Perus	<input checked="" type="checkbox"/> Pintos de 1 dia	<input type="checkbox"/> Avós	<input type="checkbox"/> Postura	0	0	0
<input type="checkbox"/> Avestruzes	<input type="checkbox"/> Adultos	<input type="checkbox"/> Matrizes	<input checked="" type="checkbox"/> Comercial			

4. SUÍDEOS **5. OUTRAS ESPÉCIES**

Macho	Fêmea	Total	Peso (KG)	Unidades

6. CAPRINOS **7. OVINOS** **8. EQUÍDEOS**

até 6 meses		Acima de 6 meses		TOTAL	<input type="checkbox"/> Equínos
M	F	M	F		<input type="checkbox"/> Asíninos
					<input type="checkbox"/> Muares

9. ANIMAIS AQUÁTICOS

<input type="checkbox"/> Peixes	<input type="checkbox"/> Adultos	<input type="checkbox"/> Ovos embrionados	<input type="checkbox"/> Peso(KG)	Total	As espécies devem ser nominalmente identificadas no campo de observação
<input type="checkbox"/> Crustáceos	<input type="checkbox"/> Alevinos	<input type="checkbox"/> Cistos	<input type="checkbox"/> Volume(n.)		
<input type="checkbox"/> Moluscos	<input type="checkbox"/> Larvas	<input type="checkbox"/> Pós-Larvas	<input type="checkbox"/> Unidades		

10. TOTAL POR EXTENSO
Hum mil e seiscentos Pintos de 1 dia Galinha

11. PROCEDÊNCIA
CPF/CNPJ: 72.078.769/0002-14
Nome: GRAMADO AVICULTURA AGROPECUARIA LTDA
Estabelecimento: GRAMADO AVICULTURA AGROPECUARIA LTDA
Código do Estabelecimento: 43029002182
Município: CAXIAS DO SUL UF: RS

12. DESTINO
CPF/CNPJ: 11773416707
Nome: CLEIDEMAR DA SILVA MUNIZ PAES
Estabelecimento: CLEIDEMAR DA SILVA MUNIZ PAES
Código do Estabelecimento: _____
Município: SEROPEDICA UF: RJ

13. FINALIDADE Abate Engorda Reprodução Exposição Leilão Esporte

14. Meio de Transporte A pé Rodoviário Ferroviário Aéreo Marítimo/Fluvial Lacre nº _____

15. VACINAÇÕES FEBRE AFTOSA BRUCELOSE MAREK 29/11/2013 BOUBA AVIARIA 29/11/2013

16. ATESTADO DE EXAMES Brucelose Tuberculose AIE Certificação nº: 050/2013

17. OBSERVAÇÃO
Nota Fiscal: 000.057.268. ORIGINÁRIOS DOS ESTAB. GRAMADO REGIST. MAPA RS-12655-1 E RS-11167-8, NÚCLEO ÚNICO, LOTE 29/12. ANEXO CERT. SANIT. DA GRANJA DE ORIGEM. VAC. NEWCASTLE MATR.: 15/10/13.

18. UNIDADE EXPEDIDORA
Inspet. Vet.: CAXIAS DO SUL
Município: CAXIAS DO SUL
Telefone: 5432211940
Email: ivz-caxiasdosul@agricultura.rs.gov.br

19. EMITENTE
 Federal Estadual Habilitado Funcionário Autorizado

20. EMISSÃO
Local: CAXIAS DO SUL RS
Data: 29/11/2013 Hora: 13:49
Validade: 04/12/2013
Fone: 5432211940

21. IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO EMITENTE

VANESSA CRISTINA BREUING
Médico Veterinário
Portaria: SFAMAPA-RS N 392/12
CRMV-RS: 9443

* Documento para o trânsito de animais de acordo com o Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006.
** A presente GTA será invalidada nos casos de alteração de procedência e o destino, com desembarque dos animais.

4311698379829112013060001600702900218205

30 NOV. 2013


ADR.: LAGES MUNIC.: CAPÃO ALTO
CREDENCIAL Nº _____
CARIMBO / ASSINATURA: Adriana Aparecida Peim

01.470.184

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

ANEXO II

Certificado sanitário da ausência de *Salmonella* spp e *Mycoplasma* spp nas matrizes



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA
SUPERINTENDÊNCIA FEDERAL DA AGRICULTURA NO RIO GRANDE DO SUL
SERVIÇO SAÚDE ANIMAL – SSA-RS

CERTIFICADO SANITÁRIO 050/2013/RS

Validade do Certificado: até 15 de Janeiro de 2014.

CERTIFICAMOS que o(s) núcleo(s) abaixo(s) relacionado(s), do estabelecimento avícola denominado **Granja Anau Miguel Cardoso**, de propriedade de **Anau Miguel Cardoso, Gramado Avicultura e Agropecuária Ltda.**, localizado em Vila Fazenda Souza 07, Cep 95.001-970, no município de **Caxias Do Sul**, classificado segundo a sua finalidade como **Granja de Matilhas de Galinha (*Gallus gallus domesticus*)** e registrado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento SFA-RS sob número **RS-11167-8**, atende às exigências estabelecidas nas normativas sanitárias vigentes, realizando o monitoramento sanitário segundo os critérios do PNBIA e apresentando a seguinte condição sanitária:

IDENTIFICAÇÃO DO NÚCLEO	<i>Salmonella</i> Pulitorum	<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>Salmonella</i> Enteritidis	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Mycoplasma</i> synoviae	<i>Mycoplasma</i> gallisepticum	<i>Mycoplasma</i> meleagridis
ÚNICO	LIVRE	LIVRE	VACINADA	LIVRE	LIVRE	LIVRE	NAO SE APLICA

Local e data. Porto Alegre, 15 de Janeiro de 2013.

[Signature]
Fátima Olimáia Barbasque
 Fiscal Federal Agropecuário
 Médica Veterinária CRMV/RS 0055
 Médica Veterinária responsável pela avaliação

[Signature]
Reneal Caporal Martins
 Fiscal Federal Agropecuário
 Médico Veterinário CRMV/RS 8428
 Chefe do Serviço de Saúde Animal

Este certificado tem sua validade condicionada à manutenção do estado sanitário do estabelecimento avícola, podendo ser suspenso a qualquer momento por motivo de ordem sanitária.

ANEXO III

Quadro da composição da ração, fabricada com a ausência de coccidiostáticos, antibióticos e promotores de crescimento, fornecida durante a fase inicial de criação das aves e quadro de Exigências Nutricionais da ração fabricada e fornecida às aves durante a fase inicial (1 a 28 dias de vida).

FASE INICIAL	
ALIMENTO	Quantidade (Kg)
Milho (Grão)	52,3171
Soja (Farelo)	40,9146
Óleo de Soja	3,3539
Fosfato Bicálcico	1,4573
Calcário	0,9233
Sal Comum	0,4820
DL – Metionina	0,2539
Min – Aves	0,1000
Vitini – Ave	0,1000
Cloreto de Colina	0,0500
L – Lisina HCL	0,0479
TOTAL	100,000 Kg

ATENDIMENTO DAS EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS – FASE INICIAL	
NUTRIENTE	Quantidade
Ácido Linoleico	3,1265
Cálcio	0,8190
Cloro	0,3391
Energia. Met. Aves	3,0000 Mcal/kg
Fósforo Disponível	0,3910
Glicina + Serina total	2,1649
Lisina Dig. Aves	1,1831
Lisina Total	1,2940
Met. + Cist. Dig. Aves	0,8549
Met. + Cistina Total	0,9320
Metionina Dig. Aves	0,5496
Metionina Total	0,5753
Potássio	0,9005
Proteína Bruta	22,0691
Sódio	0,2100
Treonina Dig. Aves	0,7679
Treonina total	0,8800
Triptofano Dig. aves	0,2635
Triptofano total	0,2865

ANEXO IV

Quadro da composição da ração, fabricada com a ausência de coccidiostáticos, antibióticos e promotores de crescimento, fornecida durante a fase de crescimento das aves e quadro de Exigências Nutricionais da ração fabricada e fornecida às aves durante a fase de crescimento (29 a 60 dias de vida).

FASE DE CRESCIMENTO	
ALIMENTO	Quantidade (Kg)
Milho (Grão)	56,6297
Soja (Farelo)	36,2233
Óleo de Soja	4,0362
Fosfato Bicálcico	1,2342
Calcário	0,8639
Sal Comum	0,4570
DL – Metionina	0,2368
Mín – Aves	0,1000
Vitini – Ave	0,1000
Cloreto de Colina	0,0690
L – Lisina HCL	0,0500
TOTAL	100,000 Kg

ATENDIMENTO DAS EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS	
NUTRIENTE	Quantidade
Ácido Linoleico	3,5258
Cálcio	0,7320
Cloro	0,3245
Energia. Met. Aves	3,1000 Mcal/kg
Fósforo Disponível	0,3420
Lisina Dig. Aves	1,0867
Lisina Total	1,1890
Met. + Cist. Dig. Aves	0,7967
Met. + Cistina Total	0,8680
Metionina Dig. Aves	0,5130
Metionina Total	0,5367
Potássio	0,8271
Proteína Bruta	20,3161
Sódio	0,2000
Treonina Dig. Aves	0,7046
Treonina total	0,8090
Triptofano Dig. aves	0,2384
Triptofano total	0,2594

ANEXO V

Composição da ração fabricada com ausência de coccidiostáticos, antibióticos e promotores de crescimento, fornecida durante a fase de acabamento das aves (61 a 91 dias de vida) e Tabela de Exigências Nutricionais da ração fornecida às aves durante a fase de acabamento (61 a 91 dias de vida).

FASE DE ACABAMENTO	
ALIMENTO	Quantidade (Kg)
Milho (Grão)	61,5979
Soja (Farelo)	32,5487
Óleo de Soja	3,0711
Fosfato Bicálcico	1,0240
Calcário calcítico	0,7706
Sal Comum	0,4438
DL – Metionina	0,2137
Min – Aves	0,1000
Vitini – Ave	0,1000
Cloreto de Colina	0,0400
L – Lisina HCL	0,0902
TOTAL	100,000 Kg

ATENDIMENTO DAS EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS	
NUTRIENTE	Quantidade
Ácido Linoleico	3,0807
Cálcio	0,6380
Cloro	0,3177
Energia. Met. Aves	3,1000 Mcal/kg
Fósforo Disponível	0,2980
Lisina Dig. Aves	1,0178
Lisina Total	1,1140
Met. + Cist. Dig. Aves	0,7457
Met. + Cistina Total	0,8130
Metionina Dig. Aves	0,4768
Metionina Total	0,4993
Potássio	0,7743
Proteína Bruta	19,0567
Sódio	0,1950
Treonina Dig. Aves	0,6588
Treonina total	0,7580
Triptofano Dig. aves	0,2196
Triptofano total	0,2389

ANEXO VI

Quadro de Exigências Nutricionais do frango de corte Embrapa 041 por fase de criação

EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DO FRANGO DE CORTE EMBRAPA 041 POR FASE DA CRIAÇÃO.			
Nutrientes	Inicial 1-28 dias	Crescimento 29-60 dias	Terminação 61-91 dias
Energia metabolizável Kcal/kg	2800	2900	2900
Proteína bruta %	19,5	17,5	16,5
Cálcio %	1,0	1,0	0,95
Fósforo total %	0,71	0,67	0,61

ANEXO VII

Quadro de Sugestão de fórmulas de ração para frango de corte colonial

Ingrediente	Ração inicial	Ração de crescimento	Ração final
Milho grão	54,381	63,051	63,2125
Farelo de soja 45% PB	30,796	27,216	21,372
Calcáreo calcítico	1,299	1,373	12,00
Fosfato bicálcico	1,738	1,670	1,3285
Sal comum	0,403	0,411	0,4058
Dl-metionina	0,117	0,107	0,1211
Energia metabolizável Kcal/Kg	2800	2900	2900
Proteína bruta %	20,00	18,00	16,50
Cálcio %	1,00	1,00	0,95
Fósforo disponível	0,468	0,435	0,386
Sódio	0,1800	0,1800	0,1800
Met + Cistina	0,7981	0,758	0,6363
Triptofano	0,2825	0,2487	0,2225
Ácido linoleico	1,5272	1,5691	1,7405
Glicina+Serina	1,9167	1,7349	1,5798
Treonina	0,7697	0,6994	0,6267
Extrato etéreo	2,6528	2,6775	2,9829

ANEXO VIII

Medicamentos utilizados no experimento

Medicamento utilizado	Apresentação	Via de administração	Composição
Depo-medrol ® (Acetato de metilprednisolona)	Frasco-ampola com 2mL (80mg)	Intramuscular	40 mg de Acetato de metilprednisolona por mL, macrogol, cloreto de sódio, cloreto de miristil-gama-picolínio e água para injeção.
Thiopentax ® (Tiopental sódico)	Injetável – pó, 1 g.	Intravenosa	Água destilada, cloreto de sódio 0,9% ou glicose 5%