

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

DISSERTAÇÃO

ESTUDOS EXPERIMENTAIS DE *Plasmodium juxtannucleare*
VERSIANI E GOMES, 1941 EM *Gallus gallus* UTILIZANDO AS
TÉCNICAS MICROSCÓPICAS E MOLECULARES COM
ÊNFASE NA PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL
PARA O DIAGNÓSTICO

Thamyris Sampaio Vilela

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ESTUDOS EXPERIMENTAIS DE *Plasmodium juxtannucleare*
VERSIANI E GOMES, 1941 EM *Gallus gallus* UTILIZANDO AS
TÉCNICAS MICROSCÓPICAS E MOLECULARES COM
ÊNFASE NA PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL
PARA O DIAGNÓSTICO**

THAMYRIS SAMPAIO VILELA

Sob a orientação do Professor

Huarrisson Azevedo Santos

Co-orientação

Carlos Luiz Massard

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ.

Fevereiro de 2015

636.50896

Vilela, Thamyris Sampaio, 1988-

V699e

T

Estudos experimentais de Plasmodium juxtannucleare Versiani e Gomes, 1941 em Gallus gallus utilizando as técnicas microscópicas e moleculares com ênfase na padronização de PCR em tempo real para o diagnóstico / Thamyris Sampaio Vilela. - 2015.

52 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2015.

Bibliografia: f. 33-40

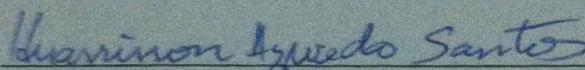
1. Galinha - Doenças - Teses. 2. Galinha - Parasito - Teses. 3. Malária aviária - Diagnóstico - Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase - Teses. 5. Plasmodium juxtannucleare - Teses. I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

THAMYRIS SAMPAIO VILELA

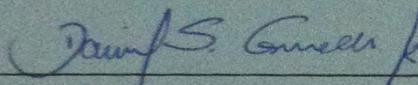
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2015

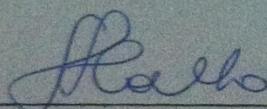


Huarrisson Azevedo Santos, DSc, UFRRJ

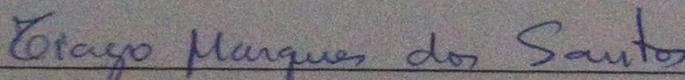
(Orientador)



Daniel da Silva Guedes Junior, DSc, FIOCRUZ-RJ



Irene da Silva Coelho, DSc, UFRRJ



Tiago Marques dos Santos, Dsc, UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus, por me guiar e me fortalecer durante toda vida pessoal e acadêmica.

Aos meus pais Edir e Nilda pelo incentivo, apoio, dedicação e amor.

Ao meu orientador pela confiança e aos meus amigos de laboratório por todo ensinamento e paciência.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos primeiro a Deus que possibilitou que esse momento se concretizasse com muito trabalho, esforço, dedicação e fé.

À meus pais, Edir e Nilda que sempre me apoiaram em todas as decisões tomadas por mim, me dando a base, o conforto, o carinho e a força que me mantém.

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o Mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo financiamento deste projeto.

Ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e ao professor Leandro Azevedo Santos que possibilitou que parte do experimento fosse realizado em seu laboratório compartilhando conhecimentos.

Ao Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), A professora Marta Tavares D'agosto da UFJF, por ceder controles positivos de *Plasmodium sp* para realização de mais uma etapa de nosso estudo.

Ao meu orientador Huarrisson Azevedo Santos e ao meu co-orientador Carlos Luiz Massard por todo conhecimento, paciência e disponibilidade de acompanhar de perto cada etapa desenvolvida no trabalho.

Aos companheiros e amigos de laboratório Marcus Sandes Pires, Maristela Peckle Peixoto, Claudia Bezerra da Silva, Renata Lins, Gabriela Vivas Vitari e Larissa Amorim por todos os ensinamentos profissionais e por estarem sempre atentos e dispostos a ajudar além dos ótimos momentos de descontração.

À amiga e companheira de laboratório Débora Martins por toda ajuda nas coletas e pelo apoio pessoal.

Ao meu namorado, Otávio Augusto Vieira pela paciência e ajuda nas coletas.

Aos bolsistas de iniciação científica, Thais Camilo, Monique Davel e Elizabeth Mureb por toda ajuda e incentivo.

À técnica de Laboratório e amiga Daniela Coelho, por todo apoio, descontração e sua disposição em ajudar sempre.

A toda equipe do Laboratório de Controle Microbiano, Isabele, Patricia, Mariana, Caio, Michel, Simone, Alan por todos os momentos de descontração.

Obrigada a todos.

BIOGRAFIA

Thamyris Sampaio Vilela, filha de Nilda Machado Sampaio e Edir Francisco Vilela, nasceu em 13 de janeiro de 1988, no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro.

Cursou o ensino fundamental e ensino médio no Colégio Nossa Senhora do Rosário em Campo Grande, Rio de Janeiro, concluindo em 2005.

No ano de 2007 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Medicina Veterinária. Durante a graduação realizou estágios na área de clínica de grandes animais do Hospital Veterinário de Grandes animais de março de 2007 a dezembro de 2007. Estagiou na clínica de pequenos animais na Clínica West Care em Campo Grande, Rio de Janeiro de janeiro de 2008 a dezembro de 2009. Estágio no Hospital de Pequenos animais no período de 2010 a 2012, nas áreas de clínica e oftalmologia veterinária.

Atuou como monitora bolsista da disciplina de Doenças Infeciosas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro de 2010 a 2012. No ano de 2012, concluiu o curso de Medicina Veterinária. Em 2013 ingressou no Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível de Mestrado em Parasitologia Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação do professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos e co-orientação do professor Dr. Carlos Luiz Massard, sendo contemplada com bolsa CAPES.

Ao longo do curso de mestrado, entre os anos de 2013 e 2014, desenvolveu trabalhos, juntamente com seus orientadores e a equipe de trabalho, e participou de alguns projetos do laboratório de Hemoparasitos e Vetores, localizado na Estação de Pesquisas Parasitológicas W.O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

VILELA, Thamyris Sampaio. **Estudos experimentais de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani e Gomes, 1941 em *Gallus gallus* utilizando as técnicas microscópicas e moleculares com ênfase na padronização de PCR em tempo real para o diagnóstico** 2015. 40p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Este estudo teve como objetivo desenvolver um ensaio de PCR em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de *Plasmodium spp.* utilizando os genes 18S *rDNA* e *cyt b*. Foram coletadas 101 amostras de sangue de aves da espécie *Gallus gallus* de criação rústica ou orgânica no município de Seropédica, Rio de Janeiro. Os sangues coletados foram utilizados na preparação de esfregaços de sangue e para extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) destas amostras. Protocolos de ensaios moleculares foram testados, tal como o PCR convencional (cPCR), *nested*PCR (*nPCR*) e qPCR para *Plasmodium spp.* Neste estudo dois protocolos de qPCR foram desenvolvidos utilizando oligoiniciadores desenhados com alvo no *citocromo b* e 18S *rDNA*. O limite de detecção para os dois genes qPCR foi de 10 cópias do alvo de DNA, que foram maiores do que o limite de detecção observado em *nPCR* e cPCR. Em qPCR, 69,30% (n = 70/101) amostras foram positivas com alvo no gene 18S *rDNA* e 59,40% (n = 60/101) amostras positivas com alvo no gene *cyt b*. Em *nPCR* e cPCR, 54,45% (n = 55/101) e 52,47% (n = 53/101) amostras foram positivas, respectivamente. Em microscopia de esfregaço de sangue, 31 (30,69%) amostras foram positivas. Não houve discordância entre os resultados ($p > 0,05$) de qPCR para os genes 18S *rDNA* e *cyt b*. Além disso, qPCR foi mais sensível do que as outras técnicas discutidas, principalmente relacionado com a microscopia óptica ($p < 0,05$). Portanto, os dois ensaios de qPCR desenvolvidos neste estudo mostraram mais sensibilidade do que outras técnicas e permitiu a detecção de *Plasmodium spp.* em aves de criação rústica mesmo com baixa parasitemia.

Palavras chave: Malária aviária; *Plasmodium juxtannucleare*; PCR em tempo real.

ABSTRACT

VILELA, Thamyris Sampaio. **Experimental studies *Plasmodium juxtannucleare* Versiani and Gomes, 1941 *Gallus gallus* using microscopic and molecular techniques with emphasis on standardization of real-time PCR for the diagnosis.** 2015 40p. Dissertation (Master in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

This study aimed to develop a real-time PCR (qPCR) assay for diagnosis of *Plasmodium* spp. using as target the *18S rDNA* and *Cyt b* genes. A range of 101 blood samples were collected from *Gallus gallus* in poultry rustic breeds of in Rio de Janeiro, Brazil. The collected bloods were used to prepare blood smears and to extract the deoxyribonucleic acid (DNA) of these samples. There with, molecular protocols were tested, such as the already published conventional PCR (cPCR) and nested PCR (nPCR), designed for *Plasmodium* spp. In this study two qPCR protocols were developed using primers targeting the *Cyt b* and *18S rDNA* genes. The qPCR detection limit for both genes was 10 copies of the target DNA, which were higher than the detection limit observed in nPCR and cPCR. In qPCR, 69.30% (n = 70/101) samples were positive targeting *18S rDNA* gene and 59.40% (n = 60/101) samples were positive targeting *Cyt b* gene. In nPCR and cPCR, 54.45% (n = 55/101) and 52.47% (n= 53/101) samples were positive, respectively. In blood smear microscopy, 31 (30.69%) samples were positive. There was no disagreement between the results ($p > 0.05$) of qPCR for *18S rDNA* and *Cyt b* genes. Additionally, qPCR was more sensitive than the other techniques discussed, mostly related to blood smear microscopy ($p < 0.05$). Therefore, the two qPCR developed in the study showed more sensitivity than other techniques and enabled the detection of *Plasmodium* spp. in poultry even in low parasitemia.

Keywords: Avian malaria; *Plasmodium juxtannucleare*; Real time PCR

Lista de Abreviaturas

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

DNA: Ácido desoxirribonucleico

*n*PCR: *nested* PCR

cPCR: Reação em cadeia de polimerase convencional

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

Cq: *cycle quantification*

T_m: *temperatura de dissociação*

COMEP/UFRRJ: Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ

Δ Rn: *Reporter* normalizado

DP: desvio padrão

Cyt b: Citocromo b

dUTP: desoxiuridina trifosfato

dTTP: desoxitiamina trifosfato

E.E.P.P. W.O. Neitz: Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica W.O. Neitz

SFM: Sistema fagocítico mononuclear

Pb: pares de bases

°C: Celsius

M.O: Microscopia óptica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Teste de otimização da concentração dos oligoiniciadores.....	15
Tabela 2.	Determinação do valor médio de Cq e ΔRn em relação as diferentes concentrações dos oligoiniciadores (Cyt b: CYTBPJF e CYTBPJR; sensu e anti-sensu) avaliadas durante a padronização da qPCR.....	18
Tabela 3.	Determinação do valor médio de Cq e ΔRn em relação as diferentes concentrações dos oligoiniciadores (18S: 18SPJF e 18SPJR; sensu e anti-sensu) avaliadas durante a padronização da qPCR.....	19
Tabela 4.	Limite de detecção das técnicas de PCR em tempo real comparadas com a nPCR e cPCR, calculado a partir de parasitemia estimada através de esfregaço sanguíneo de uma galinha naturalmente infectada por <i>Plasmodium juxtannucleare</i>	24
Tabela 5.	Análise dos pares discordantes dos resultados obtidos no diagnóstico de <i>Plasmodium</i> sp. utilizando a PCR em tempo real (qPCR) com alvo no gene <i>18SrDNA</i> , em relação a <i>Nested</i> PCR (nPCR), a PCR convencional (cPCR) e esfregaço sanguíneo, em amostras de DNA total de <i>Gallus gallus</i>	26
Tabela 6.	Análise dos pares discordantes dos resultados obtidos no diagnóstico de <i>Plasmodium</i> sp utilizando a PCR em tempo real (qPCR) com alvo no gene <i>citocromo b</i> , em relação a <i>Nested</i> PCR (nPCR), a PCR convencional (cPCR) e esfregaço sanguíneo, em amostras de <i>Gallus gallus</i>	26

LISTA DE TABELAS (Continuação)

- Tabela 7.** Análise dos pares discordantes dos resultados obtidos no diagnóstico de *Plasmodium* sp. utilizando a qPCR com alvo no gene *citocromo b*, em relação a qPCR para o gene *18S rDNA*, em amostras de DNA total obtido do sangue de *Gallus gallus*..... 26
- Tabela 8.** Análise do Cq obtido no ensaio de qPCR do gene *18S rDNA* das amostras que apresentaram-se negativas na nPCR..... 27
- Tabela 9.** Análise do Cq obtido no ensaio de qPCR do gene Citocromo b das amostras que apresentaram-se negativas na nPCR..... 27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico de <i>P. juxtannucleare</i> em <i>Gallus gallus</i>	08
Figura 2.	Coleta de sangue através da venopunção periférica da veia alar em <i>Gallus gallus</i>	12
Figura 3.	Ave doadora positiva para <i>Plasmodium juxtannucleare</i>	14
Figura 4.	Curva de dissociação a partir da amplificação de um fragmento de 62pb do gene <i>18S</i> no controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 300nM/300nM (vermelho), 600nM/600nM (amarelo) e de 900nM/900nM (verde).....	20
Figura 5.	Curva padrão plotada a partir de diluições seriadas decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do gene <i>18SrDNA</i> de <i>Plasmodium</i> spp. O valor de <i>Cq</i> obtido pela qPCR foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios.....	21
Figura 6.	Sensibilidade analítica da qPCR mostrando as curvas de amplificação do DNA plasmidial contendo o gene <i>18SrDNA</i> de <i>Plasmodium</i> spp, em diluições seriadas.....	21
Figura 7.	Curva padrão plotada a partir de diluições seriadas decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do citocromo b de <i>Plasmodium</i> spp. O valor de <i>Cq</i> obtido pela qPCR foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios.....	22
Figura 8.	Sensibilidade analítica da qPCR mostrando as curvas de amplificação do DNA plasmidial contendo o fragmento do citocromo b de <i>Plasmodium</i> spp, em diluições seriadas.....	22

Figura 9.	Limite de detecção cPCR com primers 213F e 372R em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio.	23
Figura 10.	Limite de detecção <i>nested</i> PCR com primers HaemFNI e HaemNR3 em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio.....	23
Figura 11.	Curva de dissociação do DNA alvo (<i>18SrDNA</i>) a partir do controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 300nM/300nM.....	25
Figura 12.	Curva de dissociação do DNA alvo (<i>Cyt b</i>) a partir do controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 600/600nM.....	25
Figura 13.	Esfregaços sanguíneos de <i>Gallus gallus</i> contendo diferentes formas de desenvolvimento de <i>P. juxtannucleare</i>	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 Distribuição geográfica.....	4
2.3 Morfologia e Taxonomia.....	5
2.4 Ciclo biológico.....	7
2.5 Hospedeiros definitivo e hospedeiro intermediário.....	8
2.6 Patogenia e sintomatologia.....	9
2.7 Tratamento.....	9
2.8 Diagnóstico.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Local de execução dos experimentos.....	12
3.2 Extração do DNA total.....	13
3.3 Padronização da PCR em tempo real qPCR	13
3.3.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores	13
3.3.2 Obtenção do controle positivo de <i>Plasmodium juxtannucleare</i>	13
3.3.3 Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores	15
3.3.4 Otimização da concentração de DNA total de <i>Gallus gallus</i> nas reações de qPCR.....	15
3.3.5 Limite de Detecção do Ensaio qPCR e Especificidade	15
3.4 Desempenho da qPCR com alvo nos genes 18S rDNA Citocromo b.....	16
3.4.1 O ensaio de PCR em Tempo Real para <i>Plasmodium sp</i>	16
3.5 Amplificação de <i>Plasmodium sp</i> por Nested PCR	16
3.6 Amplificação de <i>Plasmodium sp</i> por PCR Convencional.....	17
3.7 Avaliação Microscopia.....	17
3.7 Análise Estatística	17

3.8 Considerações éticas.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Sensibilidade e especificidade da qPCR para o gene <i>18SrDNA Cyt b</i>	18
4.2 Comparação entre as técnicas de diagnóstico de <i>Plasmodium spp</i>	24
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
8. ANEXOS.....	41

1. INTRODUÇÃO

A malária aviária que acomete indivíduos da ordem Galliformes, é causada por hemoprotozoários das espécies *Plasmodium* (*Haemamoeba*) *gallinaceum* e *Plasmodium* (*Bennettinia*) *juxtannucleare*. Até o presente momento, *P. juxtannucleare* é o único causador da malária aviária em *Gallus gallus* no Brasil (VERSIANI, GOMES 1941). Sua distribuição geográfica engloba a Ásia (BENNETT, WARREN, 1966; GARNHAM 1966, 1969; MANWELL 1966; LAIRD 1998), as Américas (VERSIANI, GOMES 1941; KRETTLI 1972; LAIRD, 1998) e a África (POUSEN et al., 2000). Já a espécie *P. gallinaceum* está restrita ao continente asiático. *Plasmodium juxtannucleare* possui como vetores mosquitos do gênero *Culex*, e *P. gallinaceum*, dípteros das tribos Culicini e Anophelini (GARNHAM, 1966). A doença causada por *P. juxtannucleare* é considerada secundária e de caráter assintomático, contudo, em alguns casos, pode ser observado em aves doentes um quadro de anemia, febre, inapetência, letargia, distúrbios digestivos e neurológicos, dentre outros sintomas e em alta parasitemia, a ocorrência de óbito (PARAENSE, 1947; AL DABAGH 1961; ATKINSON et al., 1995; SOARES et al., 1995; SOUZA, 1998, MOTA, 1998). Sob o aspecto de produção animal, as aves infectadas podem apresentar uma queda na produção de ovos (MASSARD, 1982).

Para o diagnóstico destes hemoparasitos, utiliza-se o exame de esfregaço sanguíneo corados com Giemsa e visualização morfológica das formas parasitárias por microscopia óptica (MO) (GARNHAM 1966, VALKIŪNAS 2005, MARTINSEN et al. 2006). Esta técnica é de fácil realização e baixo custo, porém diagnóstico pouco sensível, pois não é capaz de detectar a infecção em animais com baixa parasitemia (VAN RIPER III et al., 1986; ATKINSON, VAN RIPER III, 1991). Além disso, a visualização dos parasitas em microscopia óptica requer capacitação e experiência do profissional responsável pela análise dos esfregaços (BARKER et al., 1992). Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível tornar o diagnóstico destes hemoprotozoários mais sensível, quando comparada a técnica de esfregaço sanguíneo (FELDMAN et al., 1995; PERKINS et al., 1998; RIBEIRO et al., 2005). Atualmente, algumas técnicas moleculares desenvolvidas para o diagnóstico do gênero *Plasmodium* spp. em aves, também detectam simultaneamente a infecção das aves por outros Haemosporidas, como o gênero *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* utilizando apenas um único par de oligoiniciadores (BEADELL, FLEISHER, 2005). Através da técnica de *nested* PCR desenvolvida por Hellgren e colaboradores (2004) na qual se utiliza o produto de amplificação da primeira reação como molde para a segunda. Possibilitando detectar e diferenciar cada um destes Haemosporidas, utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subsequentes específicos para cada gênero que ampliam ainda mais a sensibilidade para a detecção de um destes parasitos em amostras de DNA extraídos do sangue. Entretanto, deve-se levar em consideração que, através da *nested* PCR, pode ocorrer amplificação seletiva do fragmento de DNA específico para um dos gêneros testados, diminuindo desta forma a sensibilidade da técnica em amostras com infecções mistas (VALKIUNAS et al., 2006). Logo, o desenvolvimento de oligoiniciadores específicos para cada gênero destes agentes se faz necessário (VALKIUNAS et al., 2006).

As técnicas moleculares que visam a detecção de *Plasmodium* spp. em aves utilizam oligoiniciadores que flanqueiam uma região do gene codificador do RNA ribossomal do parasito, especificamente *18S rRNA* (FELDMAN et al., 1995). Porém a maioria dos estudos utiliza oligoiniciadores que codificam regiões mais conservadas do genoma, como o gene *cyt b* (BENSCH et al., 2000). Muitos protocolos baseados em PCR em

tempo real foram desenvolvidos para as espécies de *Plasmodium* de humanos (MENS et al., 2006; ROCKETT et al., 2011; FARRUGIA et al., 2011; LAMIKANRA et al., 2012; TAJEBE et al., 2014; TRAN et al., 2014), porém não há registro na literatura do desenvolvimento desta técnica para plasmódios aviários. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica de PCR em tempo real (qPCR) para o diagnóstico de *Plasmodium* spp em *Gallus gallus* com alvo nos genes 18S *rDNA* e *cyt b*, comparando o desempenho dos dois genes entre si e também com as técnicas de *n*PCR, cPCR e esfregaços sanguíneos utilizadas para o diagnóstico de *Plasmodium* spp. em *Gallus gallus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os plasmódios aviários são considerados parasitos de grande importância por serem utilizados como modelos ecológicos de sistemas hospedeiros- parasito, pois permitem comparar a infecção aguda e crônica causada por diferentes espécies (HAMILTON, ZUK, 1982; ATKINSON, VAN RIPER III, 1991).

Os principais parasitos causadores da malária aviária em *Gallus gallus* são as espécies *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani e Gomes, 1941 e *Plasmodium (Haemamoeba) gallinaceum* Brumpt, 1935.

2.1 Histórico

Em 1935, Émile Brumpt ao estudar esfregaços sanguíneos de aves da espécie *G. gallus* descreveu um novo plasmódio denominado *P. gallinaceum*, a partir de então realizou estudos para verificar os possíveis hospedeiros aviários. Em meados da década de 30, Brumpt comprovou que a transmissão era realizada pelo díptero *Aedes aegypti* (BRUMPT, 1935; 1936a). Mas os estudos sobre a malária aviária começaram a ganhar maior enfoque após a descoberta da semelhança dos parasitos causadores da malária aviária com os parasitos da malária humana (LUCENA, 1939). Diante disso se intensificaram as investigações sobre possíveis antimaláricos humanos tendo como base o estudo nos plasmódios aviários, utilizando *P. gallinaceum* como principal modelo de estudo. Atualmente, estudos da malária humana são realizados com outro enfoque, já que alguns plasmódios já foram identificados parasitando hospedeiros como roedores, o que facilita a utilização deste modelo animal pelo fácil manejo e pela proximidade entre as espécies devido a ambos serem mamíferos.

Plasmodium juxtannucleare foi identificado e caracterizado primeiramente no estado de Minas Gerais, sendo o único causador da malária aviária no Brasil. Até este momento o único plasmódio aviário conhecido parasitando *Gallus gallus* no mundo era *P. gallinaceum* (VERSIANI, GOMES 1941). *Plasmodium juxtannucleare* tem sido negligenciado em estudos experimentais, em função do pequeno tamanho das formas parasitárias, desenvolvimento de baixa parasitemia e por causar patogenicidade irregular nos hospedeiros. Contudo, as informações sobre este hemoprotozoário são importantes, considerando que a prevalência em galinhas naturalmente infectadas pode alcançar 100% em determinadas regiões do Brasil (SANTOS-PREZOTO et al., 2004).

A malária aviária causada por *P. juxtannucleare* já foi relatada em vários países como no México, onde observou-se através de técnicas citológicas a semelhança entre a cepa mexicana e a cepa brasileira, a partir daí deu-se início aos estudos voltados aos possíveis vetores do plasmódio aviário (BELTRAN, 1941; BELTRAN, 1943). Em 1943 Barreto e colaboradores examinaram cérebro, baço, fígado, pulmões e medula óssea de frangos inoculados com esse parasito, e identificou formas exoeritrocitárias em células endoteliais dos capilares do cérebro de dois desses animais. Em Minas Gerais, estudos indicaram que aves adultas infectadas naturalmente poderiam sobreviver por meses à infecção, já aves inoculadas experimentalmente possuíam alta mortalidade nos dois primeiros meses da infecção (VERSIANI, GOMES, 1943).

Em 1944, Paraense e colaboradores em condições experimentais identificaram que o díptero *Culex quiquefasciatus* possuía capacidade de vetoração de *P. juxtannucleare*, porém não se pode afirmar que este fosse o vetor do parasito no ambiente visto que houve baixo índice de infecção dos dípteros neste estudo. Em 1947, estes mesmos autores identificaram formas exoeritrocíticas nos mesmos órgãos antes avaliados por Barreto em 1943, porém encontrou resultados distintos. O maior número

de parasitos na forma exoeritrocítica encontrava-se no baço, e não no cérebro. Observou-se também que a intensidade da infecção é seguida pela medula óssea, fígado, pulmões e cérebro, sendo este o último órgão a apresentar a infecção e com tendência a desaparecer mais tardiamente que nos demais órgãos. Estudos indicam que quando a infecção é frequente no endotélio nos capilares cerebrais, o parasita causador da malária é o *P. gallinaceum*, podendo chegar a 90% dos casos, justificando a maior severidade da doença quando causada por essa espécie de plasmódio, enquanto que quando comparado a *P. juxtannucleare* a taxa de infecção nos endotélios cerebrais chega a 15%, possuindo predileção por células retículo endoteliais do baço. Paraense e colaboradores também afirmaram que a infecção exoritrocitária do *P. juxtannucleare* é capaz de causar óbito em aves jovens (PARAENSE et al., 1947). Em 1947, no Uruguai Cassamagnaghi isolou uma cepa de *P. juxtannucleare* em *Gallus gallus* considerando-a idêntica a cepa isolada por Versiani e Gomes, 1941.

Plasmodium juxtannucleare foi identificado no Japão quando Ishiguro em 1957 acreditou ter descoberto uma nova espécie de plasmódio e denominou-o como *P. japonicum*, o que posteriormente foi contestado por Akiba (1959), que estudando este ‘novo’ parasito concluiu que tal espécie era a mesma descrita por Versiani e Gomes (1941). O parasito também já foi encontrado no Sri Lanka onde observou-se sintomatologia grave em pintos esplenectomizados com infecção crônica e que aqueles que adquiriram a infecção posteriormente a esplenectomia não possuíam alterações ao nível da parasitemia, isso deve-se ao fato de que em aves jovens o principal órgão responsável pela resposta imunológica não é o baço, mas o timo. Ainda no Sri Lanka, estudos comprovaram a presença de formas eritrocíticas do parasito em células de Sertoli e presença de paralisia parcial dos membros das aves infectadas experimentalmente (DHANAPALA, 1962 DINASSANAIKE, 1963). Em 1961 Al Dabagh, afirmou que a coinfeção de *Eimeria acervulina* Tizzer, 1929 e *Eimeria mitis* Tizzer, 1929 favorecem ao aparecimento dos sintomas causados em infecções por *P. juxtannucleare* e *P. gallinaceum* (AL DABAGH, 1961). A primeira citação do gênero *Plasmodium* na África ocorreu na Tanzânia, quando identificou-se a presença de *P. juxtannucleare* em perdizes (*Francolinus africanus*) (MOHANR, 1966). Em 1974, Barns e colaboradores isolaram *Plasmodium* sp em perus na Nigéria, que posteriormente foi identificado por Laird, 1978 como *P. juxtannucleare*. Na Argentina o parasito foi identificado por Boero (1968).

Massard e colaboradores em 1979 observaram a ocorrência de transmissão vertical com uma cepa de *P. juxtannucleare* e evidenciaram a presença de formas exoeritrocíticas em animais jovens, além de associar a ocorrência de malária em animais com leucose aviária. Serra Freire no Mato Grosso do Sul identificou *P. juxtannucleare* (SERRA FREIRE, 1979).

2.2 Distribuição Geográfica

Plasmodium gallinaceum possui distribuição na Ásia, enquanto que *P. juxtannucleare* possui distribuição pela Ásia (BENNETT, WARREN, 1966; GARNHAM 1966, 1969; MANWELL 1966; LAIRD 1998), América (VERSIANI, GOMES 1941; KRETTLI 1972; LAIRD, 1998) e África (POUSEN et al., 2000). Essa distribuição limitada de *P. gallinaceum* não se deve somente a diferença nos vetores dos parasitos causadores da malária aviária (KNIGHT, STONE, 1977), mas sim devido ao fato de *P. gallinaceum* possuir alta taxa de crescimento assexuado (16-20 merozoítos), possuindo infecção aguda breve 4-5 dias seguido por uma infecção crônica (PAULL, 2002). Enquanto que *P. juxtannucleare* multiplica-se lentamente (2-6 merozoítos) e

possui concentração baixa de gametócitos (da ordem de 0,01%), que permanecem infecciosos para mosquitos durante o repasto sanguíneo (BENNETT, WARREN, 1966). Paull (2002) observou que *P. gallinaceum* multiplica-se intensamente durante as fases iniciais da infecção, resultando numa elevada taxa de transmissão. No entanto, sua sobrevivência a longo prazo depende do repasto sanguíneo infectando-se a partir de estágios do parasito nos tecidos, mas a parasitemia é mantida em níveis muito baixos, desenvolvendo uma forte resposta imune do hospedeiro. Porém por *P. juxtannucleare* multiplicar-se lentamente, o equilíbrio do sistema imune do hospedeiro em relação ao parasita é mantido ao longo da infecção. Logo, ainda que *P. gallinaceum* possua altos índices de infecção na fase inicial, *P. juxtannucleare* mantém a transmissão por um maior período de tempo uma vez que produz mais gametócitos do que *P. gallinaceum* durante a fase crônica da infecção (PAULL, 2002).

Estudos em Minas Gerais demonstram alta prevalência do parasito em diversos municípios do estado. Paraense e colaboradores (1949) obteve uma prevalência de 21,3% na região de Bambuí, MG. Krettli (1971) em várias regiões do Estado de Minas Gerais obteve prevalência de 18% em Bambuí, 33% em Belo Horizonte, 8% Betim, 4% Igarapé e 9% em Peçanha, Sabinópolis e Governador Valadares. Em 1971, em Minas Gerais foi demonstrado o ciclo esporogônico até a fase de oocisto na parede do estômago do vetor *Culex fatigans*. Em estudo realizado em Santa Bárbara do Tugúrio/MG, encontrou-se prevalência de 100% de infecção por *P. juxtannucleare* em aves de criação rústica (MAIA, 1999.)

No Rio de Janeiro, Ferraz-Franco e colaboradores em 1954 verificaram prevalência de 2,34% em aves procedentes do Rio de Janeiro e 1,38% de Minas Gerais. Em 1976, em Valença no Rio de Janeiro foi evidenciado pela primeira vez a presença de esquizogonia exoeritrocítica no cérebro de uma ave adulta parasitada naturalmente e identificou-se a infecção em 4 faisões em cativeiro (MASSARD, 1976). Observou-se a prevalência de 39,7% da infecção causada pelo parasito no estado, dado este superior aos encontrados por Ferraz Franco e colaboradores para outros municípios da mesma região. Em 1976, em Valença no Rio de Janeiro foi evidenciado pela primeira vez a presença de esquizogonia exoeritrocítica no cérebro de uma ave adulta parasitada naturalmente e identificou-se a infecção em 4 faisões em cativeiro. No Espírito Santo, encontrou-se a prevalência de 39,2% do parasito aviário (MASSARD, 1976).

Em criações industriais foi diagnosticado prevalência de 79,5% em galinhas da raça Leghorn Branca (MASSARD, 1992). No ano de 1998 no Rio de Janeiro obteve-se 100% de prevalência em quatro criações do Estado do Rio de Janeiro, sendo uma na Mesorregião do Vale do Paraíba, duas no Norte Fluminense e uma na periferia do Rio de Janeiro (SOUZA, 1998).

Em Belém-PA observou-se a prevalência de 40% de *P. juxtannucleare* (SERRA FREIRE, 1976), Em Pernambuco analisou-se 250 aves da região metropolitana do Recife e obtiveram índice de 28,4% (MOTA, 1997) e em 1998 obteve prevalência de 1,4% em aves do mesmo estado (MOTA, 1998).

2.3 Morfologia e taxonomia

Os plasmódios aviários são taxonomicamente classificados na seguinte forma (VALKIUNAS, 2005):

Reino Protista (Haeckel, 1866)
Filo Apicomplexa (Levine, 1970)

Ordem *Haemosporida* (Danilewsky, 1885)
Família *Plasmodiidae* (Mesnil, 1903)
Gênero *Plasmodium* (Marchiafava, Celli, 1885)
Subgênero *Haemamoeba* (Grassi, Feletti, 1890)
P. gallinaceum (Brumpt, 1935)
Subgênero *Bennettinia* (Valkiūnas, 1997)
P. juxtannucleare (Versiani, Gomes, 1941)

Inicialmente quatro subgêneros de *Plasmodium* eram descritos por Garnham (1960): *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella* e *Huffia*. O subgênero *Haemamoeba* compreende espécies com esquizontes eritrocíticos grandes e arredondados, gametócitos arredondados e esquizogonia exoeritrocítica no sistema fagocítico mononuclear, é representado pelas espécies *P. relictum*, *P. matutinum*, *P. cathemerium* e *P. giovannolaia* que infectam passeriformes e as espécies *P. gallinaceum*, *P. durae* e *P. griffithsi*, que são parasitos de aves galliformes (GARNHAM, 1960). O subgênero *Giovannolaia* compreende parasitos com esquizontes eritrocíticos de tamanhos moderados a grandes, gametócitos alongados e a esquizogonia exoeritrocítica que no sistema fagocítico mononuclear (SFM). A forma alongada de seus gametócitos permite a diferenciação entre este subgênero e o *Haemamoeba*, as principais espécies representantes deste subgênero são: *P. circumflexum* e *P. polare* que infectam passeriformes e *P. lophurae*, *P. gundersi*, *P. durae*, *P. fallax*, *P. garnhami* em galliformes. O subgênero *Novyella* inclui espécies com esquizontes pequenos com no máximo oito merozoítos e gametócitos alongados, as espécies encontradas são *P. vaughani*, *P. rouxi*, *P. nucleophilum* e *P. hexamerium*. O subgênero *Huffia* é facilmente reconhecido por suas diferenças na esquizogonia exoeritrocítica, por possuírem esquizontes eritrocíticos pequenos (dez ou menos merozoítos), gametócitos alongados e esquizogonia exoeritrocítica contínua nas células do sistema hematopoética incluem as espécies *P. elongatum* e *P. huffia* parasita de tucanos (GARNHAM, 1960).

A classificação dos plasmódios em subgêneros facilita a identificação das espécies através da análise morfológica em esfregaços sanguíneos realizado por microscopia óptica. Atualmente acredita-se que 32 espécies de *Plasmodium* de aves sejam válidas (VAN RIPER III et al., 1994). Porém a classificação das espécies de *Plasmodium* nos subgêneros proposto por Garnham (1960) foi questionada por alguns pesquisadores que destacaram a necessidade de maior compreensão sobre os ciclos de vida, hospedeiros e vetores para determinar quais dos subgêneros propostos são válidos. (GREINER et al., 1975; BENNETT et al., 1982; VALKIUNAS, 2005).

Atualmente, os parasitos de aves do gênero *Plasmodium*, estão distribuídos em cinco subgêneros de acordo com a morfologia dos parasitos durante a fase eritrocítica são eles: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennettinia*. *Plasmodium juxtannucleare* por possuir características morfológicas distintas durante a fase eritrocítica foi incluído nessa nova classificação, no subgênero *Bennettinia* (VALKIUNAS, 2005) sendo este parasito principal causador de malária aviária em galliformes (GARNHAM, 1960).

Sabe-se da necessidade de uma maior investigação a respeito da classificação, além disso conhecer as principais linhagens de *Plasmodium* circulantes no Brasil fornecerá melhores compreensões a respeito da biologia e ecologia das principais espécies causadoras de malária aviária, em um estudo experimental Elisei (2007) encontrou diferenças morfológicas entre três isolados diferentes provenientes de MG, RJ e SP. A morfometria revelou diferenças significativas na forma entre os isolados do trofozoíto e macrogametócito, podendo ser indicativo de isolados diferentes.

2.4 Ciclo Biológico

O ciclo biológico do *Plasmodium* é heteroxeno, composto por um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado. É constituído por três fases: exoeritrocítica, eritrocítica e esporogônica.

Os dípteros infectados inoculam esporozoítas que penetram nas células do SFM presentes no local da picada e nas células do SFM presentes na camada endotelial dos capilares sanguíneos dando origem aos esquizontes pré-eritrocíticos contendo diversos criptozoítas. Estes criptozoítas penetram em outras células do SFM, principalmente em células endoteliais do fígado, baço, cérebro e medula óssea realizando a segunda esquizogonia e originando os esquizontes contendo metacriptozoítas. Esta fase caracteriza-se por ser a etapa exoeritrocítica. Em 1950 em Minas Gerais, Paraense e colaboradores relacionaram o ciclo exoeritrocítico com a patogenicidade da cepa do parasito. (PARAENSE et al., 1950). Os metacriptozoítas penetram nas hemácias e se desenvolvem e por merogonia dividem-se novamente e originando os fanerozoítos que penetram nos eritrócitos da circulação sanguínea. Parte dos fanerozoítos, também pode penetrar nas células reticulares e dar origem a outras gerações de fanerozoítos. No interior dos eritrócitos se diferenciam em trofozoítas, que já foram identificados parasitando também leucócitos e trombócitos (SOARES, 1999). Estes trofozoítas se diferenciam posteriormente em esquizontes contendo de 2 a 8 merozoítas. Estes merozoítas rompem os esquizontes liberando-se da hemácia e penetram em novas hemácias onde se reproduzem assexuadamente dando prosseguimento ao ciclo esquizogônico da fase eritrocítica (SOUZA, 1998; VALKIUNAS, 2005). Alguns merozoítas se diferenciam sexuadamente formando micro e macrogametócitos (BENNETT, WARREN, 1966; GARNHAN, 1966).

A fase esporogônica ocorre quando o vetor ao realizar o repasto sanguíneo em uma ave infectada ingere os gametócitos, que ao chegarem ao estômago do vetor por meio de movimentos de contração rompem a membrana da hemácia, liberando os gametas (GARNHAN, 1966). No intestino do vetor ocorre a fusão do microgametócito e macrogametócito dando origem ao zigoto que diferencia-se em oocineto e por fim oocisto de formato peduncular (BENNETT et al., 1966) contendo esporozoítas que rompem a parede do oocisto ficando livres na cavidade celomática do vetor. Estes esporozoítas livres migram para as glândulas salivares onde completam sua maturação (GARNHAN, 1966) e iniciam um novo ciclo ao serem inoculados pelo vetor em um hospedeiro sadio.

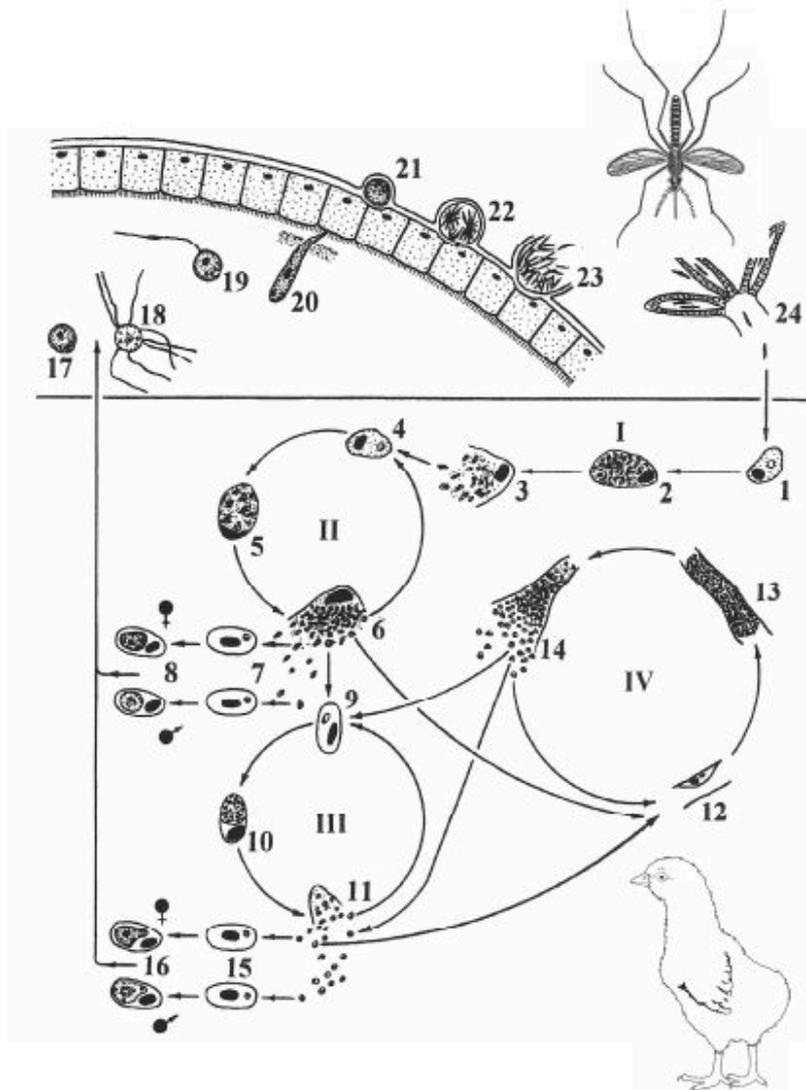


Figura 1: Ciclo biológico de *P. juxtannucleare* em *Gallus gallus*. Fonte: Valkiunas (2008)

2.5 Hospedeiros definitivo e hospedeiro intermediário

A malária aviária causada por *P. gallinaceum* possui como vetores os dípteros das tribos Culicini e Anophelini enquanto *P. juxtannucleare* possui como vetores os mosquitos do gênero *Culex* (GARNHAN, 1966).

Plasmodium juxtannucleare foi identificado pela primeira vez em infecção natural nos dípteros do gênero *Culex sitiens* e *C. annulus*, na Malásia (BENNET et al., 1967) onde determinou-se que o período pré-patente da infecção nos dípteros é de 14 dias e do ciclo esporogônico em média de 13,5 dias isolando-se esporozoítas de *Plasmodium juxtannucleare* do díptero *Culex sitiens* e aves naturalmente parasitadas (BENNETT et al., 1963). Em 1969, Niles & Kulasiri isolou o parasito de *Mansonia crassipes*. E no Brasil, oocistos maduros pedunculados foram observados em uma infecção natural de *C. saltanensis* (LOURENÇO, CASTRO, 1991). Experimentalmente, foi assinalado a ocorrência do parasito em *C. quiquenfasciatus* (PARAENSE, 1944; KRETTLI, 1972b) *C. gelidus*, *C. tritaeniorhynchus* e *C. pseudovishnui* (BENNET et al., 1966).

Plasmódios aviários possuem uma ampla variedade de hospedeiros (VAN RIPER III et al., 1994 IEZHOVA et al. 2005, VALKIUNAS et al. 2006). Estudos filogenéticos demonstram que estes parasitos alternam de hospedeiros durante a evolução. Assim, uma única linhagem de parasito pode infectar múltiplas espécies de hospedeiros (WALDENSTROM et al., 2002). Essa falta de especificidade e diferenças de susceptibilidade dos hospedeiros podem levar o parasito a desenvolver adaptações morfofisiológicas ao seu hospedeiro ou a modificações relacionadas à intensidade de parasitemia. Em casos de alta parasitemia, já foi observado que os parasitos podem alterar sua preferência por infectar hemácias maduras ou imaturas e favorecer o parasitismo (GARNHAM 1966, LAIRD 1998, VALKIUNAS 2005). Porém *P. juxtannucleare* e *P. gallinaceum* possuem predileção por *Gallus gallus* apresentando alta prevalência em criações rústicas (VERSIANI, GOMES, 1941). Já foram relatados causando patogenicidade em canários, pingüins, galinhas domésticas, patos, pombas e falcões, sendo os passeriformes freqüentes portadores assintomáticos, servindo como fonte de infecção para outras aves (CAMPBELL, 1995). Sabe-se que o peru é altamente suscetível em contrair a infecção (VERSIANI & GOMES, 1941; BELTRAN, 1943). No ano de 1966, foi diagnosticado em Taiwan , *P. juxtannucleare* em perdizes do bambu com base em características morfológicas dos estágios intraeritrocíticos (MANWELL, 1966).

2.6 Patogenia e sintomatologia

A patogenicidade da malária aviária difere durante as fases aguda e crônica da doença e o aparecimento de sinais clínicos está associada com a fase aguda da infecção, que pode progredir rapidamente. A fase crônica, causada por *P. juxtannucleare* é subclínica, na maioria dos casos (BELTRAN, 1943; KRETTLI, 1972; MOTA et al., 1998; SANTOS-PREZOTO et al., 2004), porém quando submetidos ao estresse ou presença de co-infecções isto pode favorecer a infecção pelo parasito causador malária aviária (AL-DABAGH, 1961; GRACZYK et al., 1994a; WALDENSTROM et al., 2002). A sintomatologia inclui depressão, anemia, febre, inapetência, megalia dos órgãos, fezes esverdeadas, letargia, dor, penas eriçadas, cabeça decaída, distúrbios digestivos e neurológicos (sonolência, paralisia das patas, balançar de cabeça, tremores, prostração) e em casos de alta parasitemia, pode ocorrer palidez das mucosas, dispnéia, regurgitação, prostração e morte (PARAENSE, 1947; AL DABAGH 1961; ATKINSON et al., 1995; SOARES et al., 1995; SOUZA, 1998, MOTA 1998).

Estudo realizado avaliando a produção de ovos de galinhas mostrou que aves infectadas por *P. juxtannucleare* diminuem a postura quando comparadas as aves não infectadas (MASSARD, 1982).

Além disso, outras variáveis relacionadas à patogenicidade de diferentes espécies de *Plasmodium* devem ser consideradas, como as diferenças de virulência entre linhagens e a suscetibilidade entre as diferentes espécies de aves hospedeiras e até indivíduos da mesma espécie (BRAGA, 2011).

2.7 Tratamento

Algumas drogas possuem alta eficácia para o tratamento da malária aviária agindo no ciclo eritrocitário, especialmente contra *P. gallinaceum* e *P. juxtannucleare*, porém o período de monitoramento para as aves que receberam o tratamento não foi suficiente para observar possíveis recidivas de infecção. (KRETTLI et al., 2001, VASHIST et al., 2009).

A utilização de trimetoprim e sulfaquinoxalina tem sido eficaz contra *P. gallinaceum* (WILLIAMS, 2005). Outros estudos sobre a eficiência das drogas cloroquina (SILVEIRA et al. 2009b) e quercetina como antimaláricos na infecção por *P. juxtannucleare* concluíram que aves tratadas com cloroquina e quercetina possuíram eficiência semelhante das duas drogas contra espécies de plasmódios (PETERS, 1980), além de possuir ação malaricida contra *P. juxtannucleare* (VASHIST et al., 2008).

A administração de cloroquina também foi eficaz na redução da parasitemia causada por *P. elongatum* e *P. relictum* em pingüins naturalmente infectados (CRANFIELD et al., 1994).

Os métodos utilizados para tratar a malária aviária não são bem elucidados possivelmente por causa dos baixos níveis de patogenicidade durante as fases crônicas de infecção (BRAGA, 2011).

2.8 Diagnóstico

O principal método de diagnóstico de malária aviária ainda tem como base a microscopia óptica com avaliação e identificação das formas parasitárias em lâmina. É uma técnica rápida e barata, mas pouco sensível (SOUZA, 1998).

Estudos comparativos entre vários ensaios de PCR e microscopia para detecção de haemosporídios aviários concluíram que a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é mais confiável do que a microscopia para determinar a prevalência das infecções no sangue de aves (RICHARDS et al., 2002; JARVI et al., 2002; DURRANT, 2006). Valkiunas e colaboradores (2008) não encontraram significantes diferenças nas duas técnicas de diagnóstico. Esta discordância de resultados encontrados por Jarvi e os resultados de Valkiunas, é justificado por Valkiunas (2008) pelo uso de materiais e protocolos inadequados que comprometeram a confecção das lâminas para diagnóstico, comprometendo a eficácia da técnica.

É importante notar que os esfregaços de sangue utilizados para exame microscópico, devem ser de boa qualidade (COOPER; ANWAR, 2001). Alguns estudos recomendam a utilização de exames microscópicos combinado com outros métodos de diagnóstico para parasitas do sangue de vertebrados, especialmente em animais selvagens (VALKIUNAS et al., 2001; JARVI et al., 2002). Entretanto, autores demonstram que, mesmo com técnicos experientes, o erro diagnóstico ocorre, principalmente em casos de infecção mista ou baixa parasitemia (HANSCHEID, 2003)

Tanto a microscopia quanto o diagnóstico molecular são insensíveis na detecção de infecções latentes, quando os parasitas estão ausentes da circulação periférica, (JARVI et al., 2002) fornecendo resultados melhores em infecções patentes que ocorrem em diferentes latitudes normalmente coincidindo com o período máximo de reprodução de aves (VALKIUNAS, 2005).

Atualmente, diferentes protocolos moleculares têm sido utilizados para a detecção de parasitas pertencentes a diferentes gêneros, e até mesmo algumas espécies diferentes dentro do mesmo gênero (VALKIUNAS et al., 2006). Com isso métodos moleculares tornaram-se comuns na detecção de plasmódios aviários (FELDMAN, FREED, 1995; BENSCH et al., 2000; PERKINS, SCHALL, 2002; RICKLEFS et al. 2005; DURRANT et al., 2006; MERINO et al. 2008). Assim outros estudos vem sendo realizados afim de otimizar esses métodos de detecção molecular (RICHARD et al 2002; FALLON et al., 2003; WALDENSTROM et al. 2004; FREED, CANN, 2006) com a padronização da extração e da protocolo utilizado pelo instrumentador; afim de que diminuam os erros de manipulação da técnica e consequentemente a ocorrência de diagnósticos equivocados. Entretanto, a semelhança entre parasitas do gênero

Plasmodium e *Haemoproteus* (BEADELL, 2005; FLEICHER, 2005) dificultam a elaboração de oligoiniciadores específicos para amplificação de apenas um deles (PERKINS; SCHALL, 2002; PERES-TRIS et al., 2005).

Métodos baseados na PCR são interessantes também por fornecerem o acesso a seqüência de DNA do parasito possibilitando estudos filogenéticos, epidemiológicos, diferenciação entre as espécies e identificação das linhagens circulantes, o que torna a técnica de extrema relevância principalmente pela associação do tipo de linhagem com a virulência e patogenicidade. (JARVI et al., 2002; PERKINS, SCHALL, 2002; BENSCH et al., 2004; RICKLEFS et al., 2004; KIMURA et al., 2006; VALKIUNAS et al., 2006; PERKINS et al., 2007).

Richard e colaboradores (2002) concluíram que oligoiniciadores desenhados dentro do gene *cyt b* possuem maior eficiência quando comparados com oligoiniciadores desenhados para genes menos conservados, apesar de possuírem determinadas bases nitrogenadas que dificultam o anelamento dos oligoiniciadores. Além disso, oligoiniciadores desenhados para regiões menos conservadas como rDNA apresentaram-se ineficazes quando aplicadas em alguns ensaios de PCR (BENSCH, 2000).

O diagnóstico de *Plasmodium* através da detecção molecular por PCR resultou no aumento da sensibilidade e discriminação espécies em comparação com a microscopia (MOODY, 2002). No entanto, a maioria dos ensaios moleculares publicados é com base na eletroforese em gel de agarose (CICERON, 1999) o que diminui a viabilidade da técnica, por aumentar o tempo de diagnóstico, tornando-se inviável para a rotina de diagnóstico em locais endêmicos ou com alta prevalência da doença. A técnica de qPCR além de apresentar maior sensibilidade que os demais métodos de diagnóstico de malária aviária, possibilita o diagnóstico de maior número de amostras em um curto período de tempo quando comparado com as demais técnicas moleculares. A qPCR também possibilita a quantificação do parasito, indicando a intensidade da infecção inclusive em amostras com baixa parasitemia, e por ser uma técnica em sistema tubular fechado, diminui o risco da ocorrência de contaminações aumentando a confiabilidade do diagnóstico, o que o torna mais eficiente diante da *nPCR*. Permite ainda a utilização de alvos com fragmentos mais curtos para regiões mais conservadas do gene, o que pode promover o aumento da sensibilidade em ensaios de PCR em tempo real (RICKLEFS et al., 2003), em contraste com a PCR convencional que necessita oligoiniciadores para alvos de tamanhos consideravelmente maiores para que ocorra a amplificação, o que pode comprometer o diagnóstico em amostras que não possuam o DNA conservado.

Métodos de diagnóstico indireto também são utilizados para a detecção de *Plasmodium*. Estudos da malária humana indicam que métodos sorológicos apresentam-se mais sensíveis quando comparados aos métodos moleculares em cadeia de polimerase (JARVI et al., 2002), porém a utilização destes métodos indiretos de diagnóstico como sorologia não detectam diretamente o parasito (FALLON, 2003) indicando pouca precisão do momento da ocorrência da infecção, pois detecta anticorpos que podem estar circulantes no hospedeiro que não possua mais a infecção, além disso métodos baseados em sorologia podem gerar a ocorrência de reações cruzadas com outros parasitos da mesma ordem por possuírem grande semelhança entre si.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

O estudo foi realizado nas instalações localizadas na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. NEITZ do Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio Janeiro. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, coordenado pelo professor Titular Dr. Carlos Luiz Massard.

Foram visitadas 15 propriedades com criações rústicas e/ou orgânicas de aves da espécie *Gallus gallus* no município de Seropédica no estado do Rio de Janeiro, das quais foram coletadas 101 amostras de sangue no período de janeiro a março de 2014, através da técnica de venopunção periférica da veia alar (Figura 2), e alocadas em tubos estéreis contendo ácido etileno-amino-tetracético (EDTA). As amostras foram armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL e mantidas a -20°C até o momento da extração do DNA total. Essas amostras foram utilizadas a fim de padronizar a técnica de qPCR além de determinar o seu desempenho em comparação a outras técnicas de diagnóstico da malária aviária como a análise de esfregaço sanguíneo (padrão ouro), a *nested* PCR e o PCR convencional.

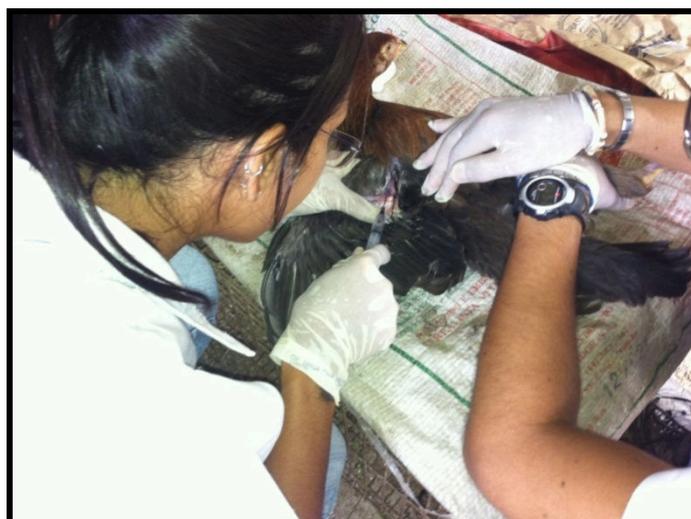


Figura 2. Coleta de sangue através da venopunção periférica da veia alar. Fonte: Arquivo Pessoal.

3.2 Extração do DNA total

O DNA genômico foi extraído a partir de 20µl de cada amostra sanguínea de *Gallus gallus* utilizando o kit Genomic DNA Purification (Promega ®) com adaptações no protocolo do fabricante (Anexo I). Após a extração do DNA total, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), e todas as alíquotas foram diluídas e padronizadas a 100ng/µL para sua posterior utilização nas técnicas moleculares que serão avaliadas neste estudo.

3.3 Padronização da PCR em tempo real qPCR

3.3.1 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores

Dois pares de oligonucleotídeos foram desenhados para o diagnóstico por qPCR baseado nos genes *cyt b* e 18S *rDNA* de *Plasmodium* spp. Os iniciadores foram criados usando software Primer Express 3.0 baseado em alinhamento de sequências de genes alvo de *P. juxtannucleare* disponível em Genbank (ID: AF463507 [18S rDNA], AB250415 [Cytb]). Outras sequências de organismos geneticamente semelhantes, como *P. gallinaceum* (ID: M61723 [18S rDNA], AB250690 [Cytb]), *Plasmodium elongatum* (ID: AF463506 [18S rDNA], AF069611 [Cytb]), *Plasmodium relictum* (ID: AF145397 [18S rDNA], HM031937 [Cytb]) e *Plasmodium falciparum* (ID: JQ627151 [18S rDNA], AF069605 [Cytb]) foram alinhados juntos para selecionar uma região específica de cada gene de plasmódios aviária mencionado. O Software Primer Express 3.0 foi configurado de modo a selecionar os iniciadores com temperatura de 60 ° C de dissociação, admitindo dois graus entre eles. As características dos iniciadores foram testados usando o software 1.2 e o Oligo Analyse especificidade foi testado inicialmente por ferramenta primerBLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer- / index.cgi?LINK_LOC = BlastHome). Os oligoiniciadores selecionados para amplificar fragmentos para os genes *cyt b* foram denominados CYTBPJF (5'- GGATATCTTGTA AGTGACCCAACATTAA-3') e CYTBPIR (5'-AAAGGATTTGTGCTACCT GTAAATGTA-3') e para o gene 18S *rDNA*, 18SPJF (5'- CACAAGGAAGTTTGAGGCAACA-3') e 18SPIR (5'- CGCGTGCAGCCTAG TTTATCT-3'), amplificando produtos de 128bp e 62bp, respectivamente.

3.3.2 Obtenção do controle positivo de *Plasmodium juxtannucleare* e amostra padrão.

Uma ave naturalmente infectada com *P. juxtannucleare* (Figura 3) foi mantida em biotério na estação para pesquisas parasitológicas W.O.Neitz (EPPWON). A parasitemia desta ave foi estimada em 0,1% dos eritrócitos infectados com trofozoítos, esquizontes e gametócitos como descrito por Souza (1998) e o DNA de sangue total foi extraído. Partindo do princípio de que o processo de extração do DNA teve 100% de eficiência, o DNA obtido foi diluído até 0,0017% de parasitemia, que correspondeu a 10 ng/mL de concentração de DNA total. Ele foi usado como controle positivo para padronizar o ensaio de qPCR .



Figura 3. Ave doadora positiva para *Plasmodium juxtannucleare* obtida de uma criação rústica localizada no município de Seropédica, RJ. Fonte: Arquivo pessoal.

A amostra padrão para a construção da curva padrão, determinação do limite de detecção e a eficiência das qPCR para os genes *18S rDNA* e *Cyt b* foi obtida seguindo o procedimento descrito abaixo.

Um novo conjunto de oligoiniciadores para os genes *18SrDNA* e *Cyt b* foram desenhados obedecendo aos mesmos critérios anteriores, porém gerando produtos de 738 e 987 pb respectivamente. As sequências amplificadas possuem os sítios de anelamento dos oligoiniciadores da qPCR.

O sangue da ave utilizada como controle positivo para *P.juxtannucleare* foi amplificado utilizando os oligoiniciadores CYTBR (TGGAGCGGATGGTGTTTTAG) e CYTBF (TTCTCTAACACCAAAGGCGAA) para *Cyt b* e 18SF (TGGAGACGAACAACACTGCGAA) e 18SR (TTCAATCGGTAGGAGCGACG) para o gene *18SrDNA*. A reação foi realizada em volume final de 50 μ L contendo: 1x PCR buffer (10 mM Tris-Cl; pH=8,3), 50 mM KCl (Invitrogen®), 4mM de cloreto de Magnésio (MgCl₂ 50 mM, Invitrogen®), 0,4 mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP- Invitrogen®), 0,5 μ M dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5U de *Platinum* Taq DNA Polimerase (Invitrogen®) e 3 μ L de DNA total a 100 ng/ μ L. Água livre de Nuclease (Ambion®) e o DNA genômico de uma ave *Specific pathogenic free* foram utilizadas como controle negativo. As condições de termociclagem foram as seguintes: 94°C por 7 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto; 58°C por 1 minuto; 72°C por 1,5 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

A purificação do produto amplificado foi feita com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®, Madison, WI, USA), para a clonagem. A clonagem foi realizada em vetor pGEM-T® Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA plasmidial dos clones positivos foram isolados pelo kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A confirmação da clonagem foi realizada com a utilização das endonucleases de Restrição Hind III (Promega®) (Anexo VI) de acordo com o fabricante. A reação de restrição para linearização do Plasmídeo contendo a inserção foi realizada com endonuclease SacI (Promega®)(AnexoVII). Por

fim, os produtos de genes clonados de *P. juxtannucleare* foram quantificados por espectrofotometria Nanodrop® ND-2000, a fim de se obter a concentração que permite estimar a concentração de plasmídeo por microlitro seguindo a fórmula descrita abaixo:

$$\text{N}^\circ \text{ de cópias/ } \mu\text{L} = \frac{[\text{DNA}(\text{g/ } \mu\text{L})] \times 6,022 \times 10^{23} \text{ (Moléculas/moles)}}{[\text{Comprimento do fragmento}] \times 660 \text{ daltons}}$$

3.3.3 Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores

Com a amostra padrão correspondente a 100 cópias dos genes *18S rDNA* e *Cyt b* de *P. juxtannucleare* clonados em plasmídeo foi realizada a otimização das concentrações de oligoiniciadores. Este ensaio foi realizado usando o sistema SYBR Green em diferentes concentrações para os genes testados. As concentrações avaliadas foram: 300nM, 600nM e 900nM para os genes *18S rDNA* e *citocromo b*. A concentração ótima dos oligonucleotídeos iniciadores serão as concentrações mínimas que obtiverem o menor Cq (Ciclo de Quantificação) e o máximo ΔRn (*Normalized Reporter*).

A reação com volume final de 20 μL foi realizada utilizando 1X de SYBR Green® PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 300ng do DNA controle positivo clonado em 9 (nove) combinações das concentrações citadas abaixo e demonstradas na Tabela 1. As condições de termociclagem foram: 94°C por 10 minutos, 94°C por 20 segundos e 60°C por 60 segundos, durante 40 ciclos. A curva de dissociação foi adicionada no final da reação para verificar a formação de dímeros dos oligoiniciadores.

Tabela 1. Teste de otimização da concentração dos oligoiniciadores.

Oligoiniciador		Anti sensu		
		300 nM	600 nM	900 nM
Sensu	300 nM	300/300 nM	300/600 nM	300/900 nM
	600 nM	600/300 nM	600/600 nM	600/900 nM
	900 nM	900/300 nM	900/600 nM	900/900 nM

3.3.4 Otimização da concentração de DNA total de *Gallus gallus* nas reações de qPCR

Diferentes concentrações de DNA genômico de *Gallus gallus* foram testadas nas reações de qPCR. Uma amostra padrão corresponde a 100 cópias dos genes *18S rDNA* e *Cyt b* de *P. juxtannucleare* foi diluída em DNA total extraído de uma ave “SPF” nas concentrações de 100 ng/uL, 200 ng/uL e 300 ng/uL. Nas reações de qPCR foi pipetado 1uL de DNA total em triplicata. As reações foram realizadas nas mesmas condições descritas no item 3.3.6.

3.3.5 Limite de Detecção dos Ensaio de qPCR e Especificidade

A sensibilidade analítica/limite de detecção dos ensaios da qPCR foi determinada pela avaliação de diluições decimais seriadas em triplicata dos genes alvos clonado em plasmídeo utilizada para confeccionar uma curva padrão plotando o número

de cópias do plasmídeo pelos valores de C_q . O número de cópias variou de 10^6 a apenas uma e sete diluições separadas foram realizadas para cada ponto na curva.

O DNA plasmidial, contendo o inserto dos genes *18S rDNA* e *Cyt b* de espécies de plasmódios aviários, foi diluído em uma solução de DNA genômico de uma ave *Specific Patogenic Free* a $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Isso foi realizado para testar a influência do DNA genômico das aves na eficiência de amplificação de parasitos do gênero *Plasmodium* por PCR em tempo real.

O limite de detecção das técnicas de qPCR foram avaliadas também a partir de diluições decimais seriadas do DNA controle obtido conforme descrito no 3.3.2. Este procedimento foi realizado com a finalidade de obter uma comparação mais fiel com as técnicas de nPCR e cPCR.

A especificidade do ensaio foi testada em uma reação de qPCR utilizando DNA de organismos relacionados como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium lutzi*, *Plasmodium gallinaceum*, *Haemoproteus sp.*

As espécies de *P. falciparum* e *P. gallinaceum* mantidas em cultivos foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A espécie *P. lutzi* foi generosamente cedida pela professora Marta Tavares D'agosto da UFJF. Essa espécie foi obtida a partir de infecção natural da ave *Arremonse mitorquatus* Swainson. *Haemoproteus sp* foi obtido a partir de uma infecção natural em *Columba livia* na cidade de Seropédica, Rio de Janeiro. Em todos os casos a quantidade de parasitos nas amostras de sangue e cultivo eram indeterminadas e o DNA extraído possuía tanto DNA de parasitos de gênero *Plasmodium* quanto de aves ou mamíferos.

3.4 Desempenho da qPCR com alvo nos genes *18S rDNA* e *Cyt b*

3.4.1 O ensaio de PCR em Tempo Real para *Plasmodium sp.*

As reações foram realizadas em triplicata no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando os oligoiniciadores *18SPJF* (5'-CACAAGGAAGTTTGAGGCAACA-3') e *18SPJR* (5'-CGCGTGCAGCCTAGTTTATCT-3'), para o gene *18SrDNA* e *CYTBPJF* (5'-GGATATCTTGTAAGTGACCCAACATTAA-3') e *CYTBPJR* (5'-AAAGGATTTGTGCTACCTGTAAATGTA-3') que amplificam produtos de 62 e 128pb, respectivamente. O volume final da reação foi de $20\mu\text{L}$, contendo: 1X de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 300 nM de cada oligoiniciador do *18S rDNA* e 600 nM para a reação do *Cyt b*, e 300 ng das amostras de DNA total.

As condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final dos 40 ciclos foi adicionada uma curva de dissociação dos produtos amplificados com a finalidade de verificar a especificidade de amplificação.

3.5 Amplificação de *Plasmodium sp* por Nested PCR (nPCR)

As mesmas amostras testadas pelo ensaio de qPCR também foram submetidas a *nested*PCR, usando oligoiniciadores com alvo no gene *Cyt b*. Na primeira reação da nPCR foram utilizados os primers HaemFNI (5' CATATATT AAGAGAAITATGGAG 3') e HaemNR3 (5' ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC 3') e na segunda reação HAEMF (5' ATGGTGCTTTCGATATATGCATG 3') e HAEMR2 (5' GCATTATCTGGATGTGATAATGGT 3') (HELLGREN, 2004). Ambas as reações foram realizadas com volume final de $25\mu\text{l}$, contendo 1x PCR buffer, 1.5mM MgCl_2 , 1.25 mM de cada desoxinucleosídeo, 0.6 mM de cada oligoiniciador, 0.5 U *Taq*

platinum. As condições de termociclagem foram de 94°C por 3 minutos para temperatura inicial de desnaturação, 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e 72°C por 10 minutos por 35 ciclos a primeira reação e 30 ciclos a segunda reação. O volume de DNA utilizado na primeira reação foi de 300ng e o da segunda reação 100ng. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi de 60 minutos a 80 volts (5V/cm), em seguida os géis foram corados com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia). O limite de detecção da *n*PCR foi determinada a partir de diluições decimais seriadas de DNA com parasitemia de 0,0017%, como já foi descrito no item 3.3.2.

3.6 Amplificação de *Plasmodium* spp. por PCR Convencional

As 101 amostras submetidas ao ensaio de qPCR e *n*PCR também foram submetidas ao ensaio de PCR convencional com os primers 213F (5'-GAGCTATGACGCTATCGA-3') e 372R (5'-GGAATGAGAGTTCACCGTTA-3') segundo Beadell & Fleisher (2005) que amplificam produto de 160 pb com alvo no gene *cyt b*. O volume final da reação foi de 25 µl contendo 1x PCR buffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada desoxinucleotídeo, 0,4mM de cada oligoiniciador, 1U *Taq*platinum e 300 ng de DNA genômico. As condições de termociclagem foram as seguintes: temperatura inicial de desnaturação 94°C por 8 minutos, 92°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 72°C por 7 minutos durante 35 ciclos segundo Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% a 80 V (5 V/cm) durante 1 hora e 20 minutos. Logo após, os géis foram corados em solução de brometo de etídio e em seguida visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia). O limite de detecção dessa técnica foi estabelecido conforme item 3.4.2.

3.7 Avaliação Microscópica

No momento da coleta foram elaborados esfregaços sanguíneos do sangue coletado para realização do exame microscópico. Estes foram fixados no local da coleta com metanol durante 10 minutos e corados com GIEMSA (etil azul eosina -Merck®) no laboratório. A infecção foi avaliada em 100 campos por animal, em microscopia fotônica, com objetiva de imersão (1000x).

3.8 Análises Estatística

A concordância entre os testes moleculares de diagnóstico e a análise citológica em esfregaços sanguíneos de espécies de plasmódios aviários será comparada através do teste de McNemar em nível de 5% de significância. As análises foram executadas no software BioEstat 5.0 (AYRES et al, 2007).

3.9 Considerações éticas

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ (COMEP/UFRRJ), número de protocolo 007905, número de processo 23083.007905/2013-66 (Anexo V).

4. RESULTADOS

4.1 Sensibilidade e especificidade da qPCR para o gene 18S *rDNA* e *Cyt b*

Os oligoiniciadores desenhados a partir do banco de dados do GenBank, apresentaram alinhamento específico para a sequência complementar do alvo desejado, *P. juxtannucleare* e não possuem complementariedade com outros organismos semelhantes que não são interessantes nesse estudo.

Observou-se que a concentração ideal dos oligonucleotídeos iniciadores da qPCR (sensu e anti-sensu) tendo como gene-alvo *cyt b*, foi de 600 nM x 600 nM, respectivamente, alcançando um *Cq* médio de 24,14 e o ΔRn de 2,3927, em uma amostra sabidamente positiva (Tabela 2). Foi utilizada a concentração de 300 nM x 300 nM para os oligonucleotídeos iniciadores testados para o gene-alvo 18S *rDNA*, alcançando um *Cq* médio de 21,45 e ΔRn de 3,6930 (Tabela 3). Vale destacar que o melhor desempenho neste segundo par de oligonucleotídeos iniciadores foi observado na concentração de 900 nM x 900 nM, apresentando *Cq* de 20,99 e ΔRn de 4,5594, contudo, descartou-se sua utilização nesta concentração devido a ocorrência de dimerização (Figura 4).

Tabela 2. Determinação dos valores médios de *Cq* e ΔRn em relação as diferentes concentrações dos oligoiniciadores que amplificam o gene *Cyt b* (CYTBPJF e CYTBPJR; sensu e anti-sensu) avaliado durante a padronização da qPCR.

Oligoiniciadores	SENSU					
	300 nM		600 nM		900 nM	
	<i>Cq</i>	ΔRn	<i>Cq</i>	ΔRn	<i>Cq</i>	ΔRn
	24,53	2,2493	34,83	0,1845	25,91	1,7094
300 nM	24,27	2,2704	36,04	0,1381	25,59	1,7070
	24,05	2,5150	34,92	0,0957	25,22	1,6727
Média	24,28	2,3449	35,26	0,4183	25,57	1,6963
	36,27	0,1373	24,54	2,5122	24,54	2,2635
600 nM	26,72	0,1587	24,21	2,2870	24,63	2,3116
	27,61	0,9892	23,69	2,3789	24,44	2,0335
Média	30,2	0,4284	24,14	2,3927	24,53	2,2028
	27,33	0,9999	23,97	2,5896	24,20	0,0066
900Nm	26,75	1,2518	23,88	2,6347	24,36	2,4271
	24,95	1,5830	23,98	2,4563	24,51	2,0099
Média	26,34	1,2782	23,94	2,5602	24,35	1,4812

ANTI-SENSU

Cq: Ciclos de quantificação; ΔRn : Fluorescência normalizada.

Tabela 3. Determinação do valor médio de Cq e ΔRn em relação as diferentes concentrações dos oligoiniciadores (18S *rDNA*: 18SPJF e 18SPJR; sensu e anti-sensu) avaliadas durante a padronização da qPCR.

Oligoiniciadores	SENSU						
	300 nM		600 nM		900 nM		
	Cq	ΔRn	Cq	ΔRn	Cq	ΔRn	
ANTI-SENSU		21,45	3,5909	21,34	2,9895	24,94	0,9840
	300 nM	21,50	3,6165	21,40	3,5759	23,61	1,6992
		21,42	3,8717	20,96	4,4796	24,08	1,3276
	Média	21,45	3,6930	21, 23	3,6816	24,21	1,3369
		26,63	0,3498	22,87	2,0888	21,06	4,0421
	600 nM	25,94	0,4189	22,83	1,8312	21,61	3,5138
		26,57	0,3186	27,36	0,5655	21,56	3,5309
	Média	26,38	0,3624	24,35	1,4951	21,41	3,6956
		21,25	3,6050	21,09	4,4446	21,46	4,1076
	900 nM	21,70	2,5282	20,94	4,8035	20,97	4,4692
		21,30	3,9499	20,68	5,5828	20,56	5,1045
	Média	21,41	3,3610	20,90	4,9436	20,99	4,5594

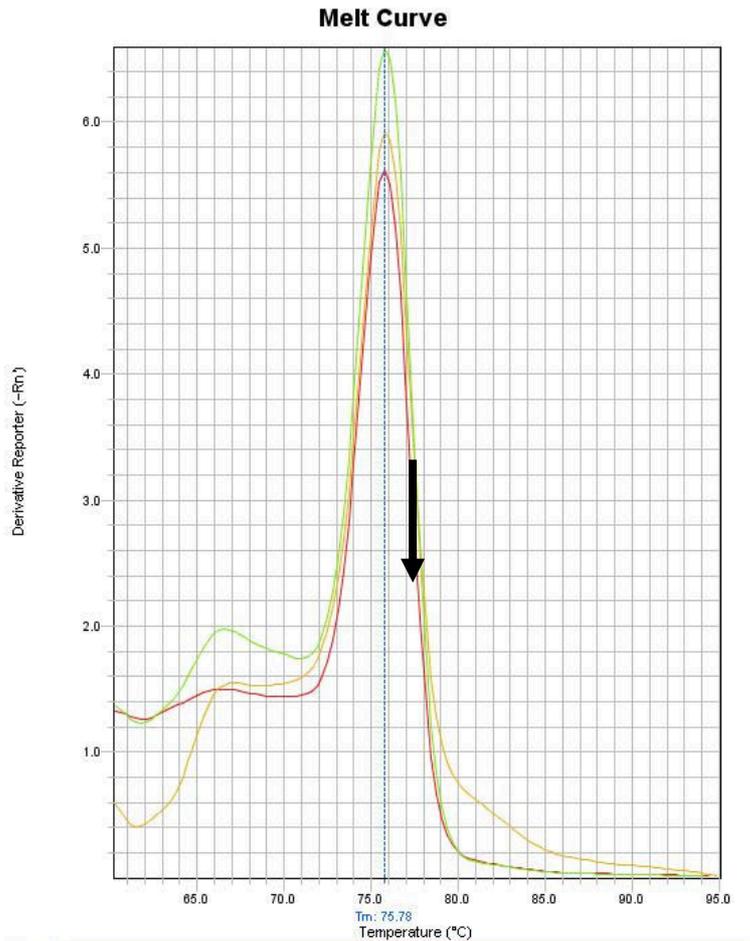


Figura 4 . Curva de dissociação a partir da amplificação de um fragmento de 62pb do gene 18S *rDNA* no controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 300 nM/300 nM (vermelho), 600 nM/600 nM (amarelo) e de 900 nM/900 nM (verde). Pico de dimerização (seta).

O limite de detecção de *qPCR* para o gene 18S *rDNA* foi de 10 cópias de DNA plasmidial contendo o fragmento de 62 pb de *Plasmodium* spp. O coeficiente de correlação das sete diluições testadas na curva padrão foi de 98%, com *Cq* variando de $16,51 \pm 0,02$ ciclos na primeira diluição (10^6 cópias de plasmídeo) a $34,85 \pm 0,32$ ciclos na última diluição (10 cópia de plasmídeo) (Figura 5). As curvas tiveram o mesmo desempenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi de 85,47%, demonstrando reprodutibilidade mesmo em pontos com poucos alvos (Figura 6).

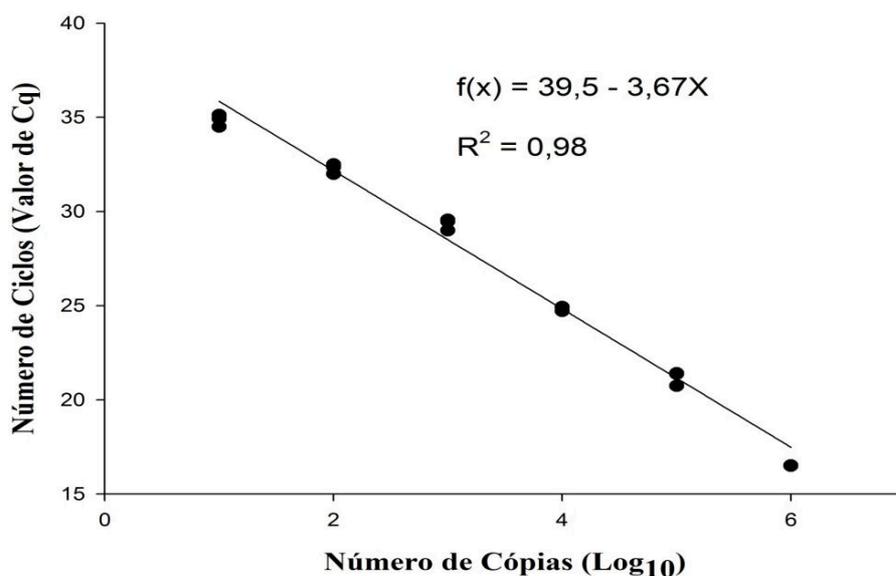


Figura 5. Curva padrão plotada a partir de diluições seriadas decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do gene 18S *rDNA* de *Plasmodium* spp. O valor de *Cq* obtido pela *qPCR* foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios.

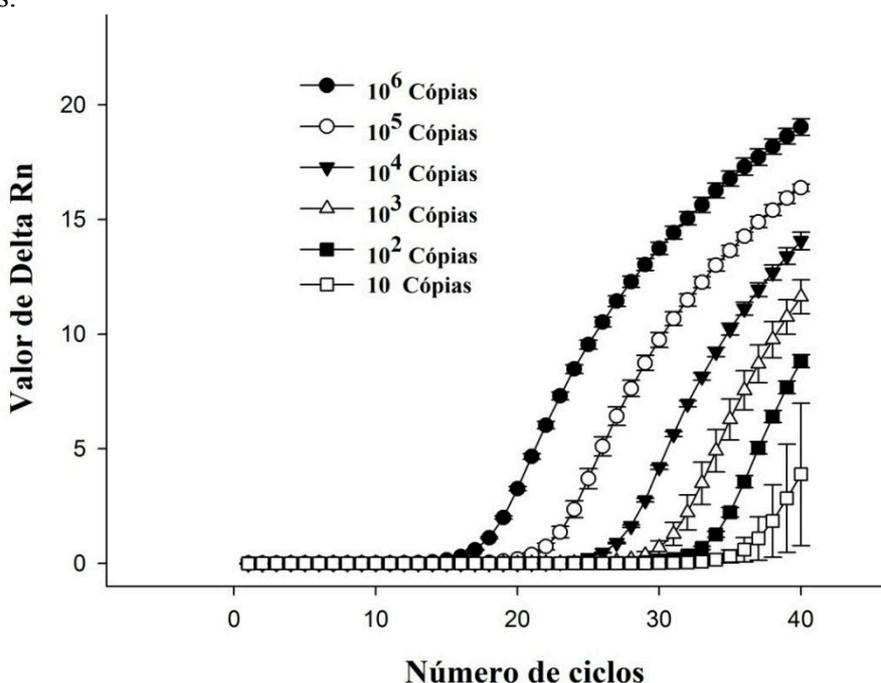


Figura 6. Sensibilidade analítica da *qPCR* mostrando as curvas de amplificação do DNA plasmidial contendo o gene 18S *rDNA* de *Plasmodium* spp, em diluições seriadas (1-1.000.000 cópias).

A partir da análise regressão linear formada a partir das sete diluições testadas na curva padrão e o número de ciclos (*Cq*) da *qPCR* para o gene *cyt b*, obteve-se o coeficiente de determinação da regressão de 0,99 ($R^2 = 99\%$), com *Cq* médio variando de $20,10 \pm 0,07$ ciclos na primeira diluição (10^6 cópias de plasmídio) a $37,30 \pm 0,43$ ciclos na última diluição (10 cópias de plasmídeo) (Figura 7). As curvas tiveram o mesmo desenho durante a fase exponencial de amplificação, e a eficiência da reação foi

de 101,45%, demonstrando reprodutibilidade satisfatória mesmo em pontos com poucos alvos (Figura 8). Foi possível observar através da *qPCR* para o gene *cyt b* que o limite de detecção foi de até 10 cópias do DNA plasmidial contendo o fragmento clonado do gene-alvo de *Plasmodium sp.*

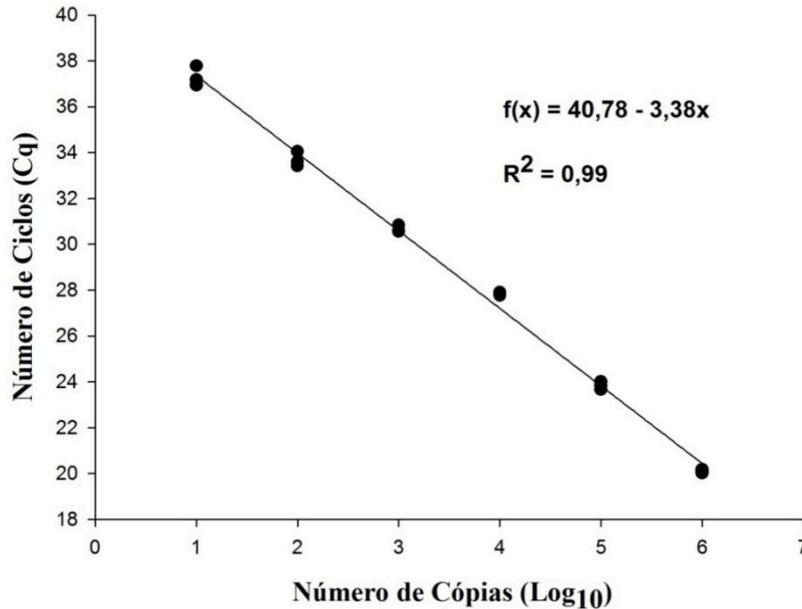


Figura 7. Curva padrão plotada a partir de diluições seriadas decimais de DNA plasmidial, contendo o fragmento do *cyt b* de *Plasmodium spp.* O valor de *Cq* obtido pela *qPCR* foi plotado como uma função de número inicial de cópias de plasmídios.

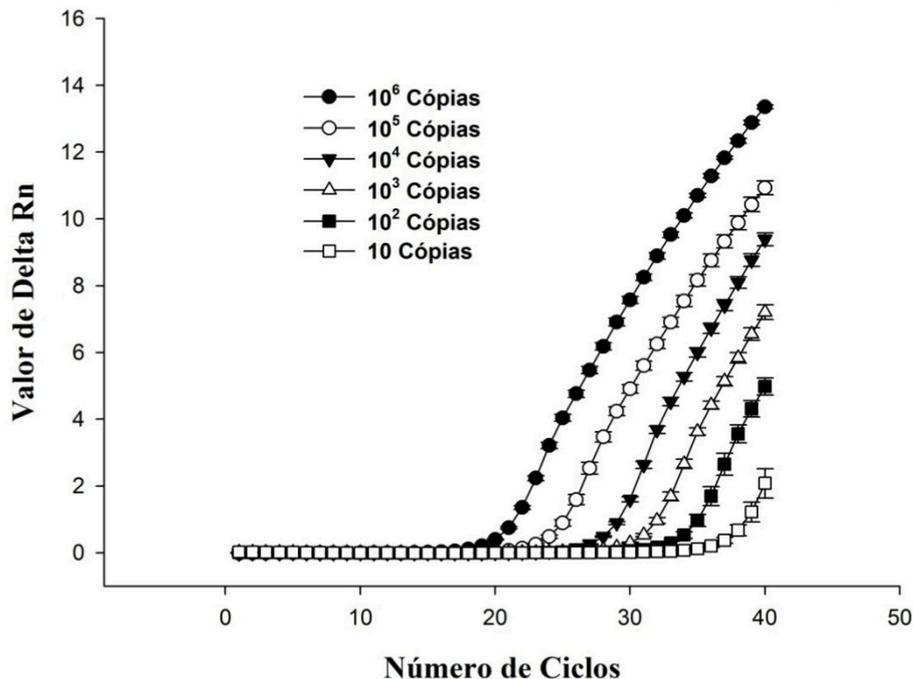


Figura 8. Sensibilidade analítica da *qPCR* mostrando as curvas de amplificação do DNA plasmidial contendo o fragmento do *cyt b* de *Plasmodium spp.*, em diluições seriadas (1-1.000.000 cópias).

O limite de detecção das técnicas de *nPCR* e *cPCR* foi determinado a partir do

DNA extraído do sangue total de uma ave naturalmente parasitada por *P. juxtannucleare* com parasitemia de 0,1%. A concentração do DNA total obtido a partir desse sangue foi de 600 ng/uL, admitindo 100% de eficiência no processo de extração do DNA, essa amostra possui 0,1% dos eritrócitos parasitados por *P. juxtannucleare*. Esse DNA foi diluído para uma concentração de 10 ng/uL, o que corresponde a uma parasitemia de $1,7 \times 10^{-3}$. O DNA na concentração de 10 ng/uL foi utilizado com ponto de partida para determinar os limites de detecção.

Foi possível observar através da *n*PCR que o limite de detecção foi relativo a uma parasitemia (número de eritrócitos parasitados/ 100 células examinadas) de $1,7 \times 10^{-6}\%$, o que correspondeu a uma concentração de DNA total de 10 pg/uL (Figura 9). A *c*PCR apresentou limite de detecção relativo a uma parasitemia de $1,7 \times 10^{-5}\%$, correspondente a uma concentração de DNA total de 100pg/uL (Figura 10). O limite de detecção da *q*PCR para os genes 18S *rDNA* e *cyt b* foi também determinado a partir do DNA extraído do sangue total de uma ave naturalmente parasitada por *P. juxtannucleare* com o objetivo de estabelecer uma comparação mais fiel com as técnicas de *n*PCR e *c*PCR. O limite de detecção das técnicas de *q*PCR com alvo nos genes 18S *rDNA* e *cyt b* foi de 1,00 pg/uL de DNA total, o que corresponde a uma parasitemia de $1,7 \times 10^{-7}\%$.

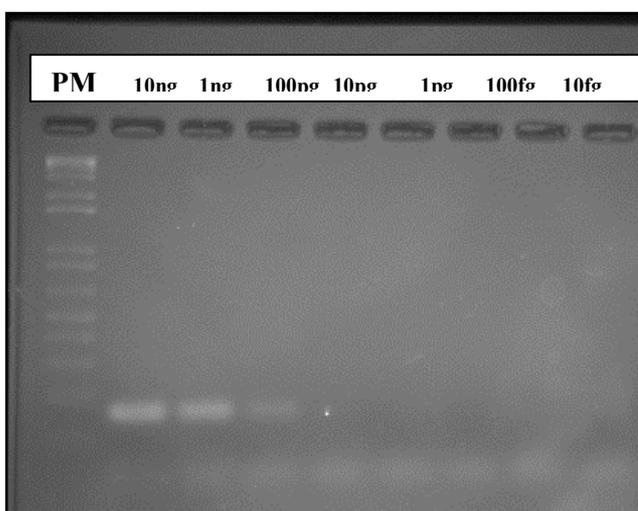


Figura 9. Limite de detecção *c*PCR com primers 213F e 372R em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio. Coluna 1: marcador molecular de 1Kb (Invitrogen®) e nas demais, DNA nas diluições de 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 100 fg e 10 fg

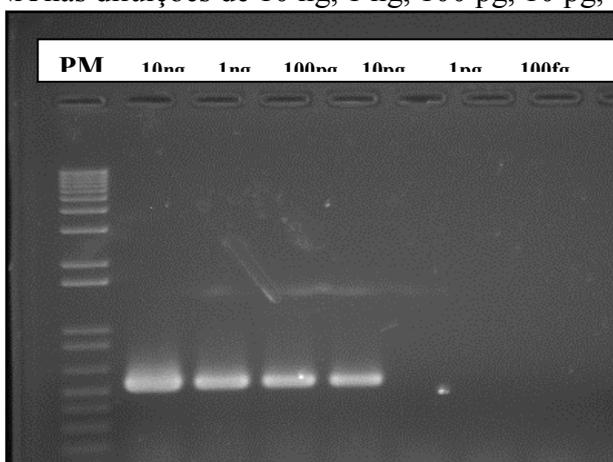


Figura 10. Limite de detecção *nested* PCR com primers HaemFNI e HaemNR3 em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio. Coluna 1: marcador molecular de 1Kb

(Invitrogen®) e nas demais, DNA nas diluições de 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 100 fg e 10 fg.

Tabela 4. Limite de detecção das técnicas de qPCR comparadas com a nPCR e cPCR, calculado a partir de parasitemia estimada através de esfregaço sanguíneo de uma galinha naturalmente infectada por *P. juxtannucleare*.

Técnicas	Limite de Detecção (em ng/uL de DNA)	Parasitemia (%)*	Valor Médio de Cq**
qPCR 18S <i>rDNA</i>	1,00 pg/uL	$1,7 \times 10^{-7}$	35,25
qPCR <i>cyt b</i>	1,00 pg/uL	$1,7 \times 10^{-7}$	35,35
nPCR	10 pg/uL	$1,7 \times 10^{-6}$	-
cPCR	100 pg/uL	$1,7 \times 10^{-5}$	-

A especificidade da qPCR foi avaliada em relação a outras espécies de *Plasmodium* sp e *Haemoproteus* para ambos os genes. No teste de especificidade para o gene 18S *rDNA* foi observado a amplificação de todos os Plasmódios aviários testados, incluindo o plasmódio parasito da malária humana *P. falciparum*, mantendo-se negativo apenas para *Haemoproteus* sp.

A técnica de qPCR utilizando o gene *cyt b* apresentou-se específica para os plasmódios aviários somente, apresentando amplificação para *P. juxtannucleare*, *P. lutzi*, *P. gallinaceum* e negativo para *P. falciparum* e *Haemoproteus* sp.

Não houve variação no Cq das amostras padrão de *P. juxtannucleare* quando diferentes concentrações de DNA genômico de *Gallus gallus* foi adicionado a reação. Isso foi observado tanto para as reações com alvo no gene 18S *rDNA* quanto para o gene *Cyt b*.

4.2 Comparação entre as técnicas de diagnóstico de *Plasmodium* sp.

Após a padronização das concentrações dos oligoiniciadores com o produto clonado, e a escolha das concentrações com melhor desempenho de acordo com o Cq e o ΔR_n , foram realizados os testes das amostras coletadas das aves. Obtendo-se a amplificação e curva de dissociação de ambos os genes 18S *rDNA* (Figura 11) e *Cyt b* (Figura 12).

Entre as amostras testadas na qPCR para o gene 18S *rDNA*, 69,30% (n=70/101) foram positivas, e para o qPCR *Cyt b*, 59,40% (n= 60/101). Já na nPCR, 54,45% (n= 55/101) foram consideradas positivas e pela cPCR, 52,47% (n=53/101) amplificaram o fragmento de DNA alvo. Com relação a microscopia óptica, foram observadas em 31 (30,69%) amostras a presença de formas de desenvolvimento de *Plasmodium* spp. (Figura 13).

Todas as amostras positivas na qPCR foram também positivas na cPCR e Microscopia, e apenas uma amostra foi positiva na qPCR 18S *rDNA* e não foi detectada na nPCR, enquanto que 16 amostras positivas no qPCR para esse gene não foram detectadas na nPCR (p= 0,0003) (Tabela 5). Os resultados da qPCR comparados com os resultados da microscopia apresentou-se altamente significativo (p= 0,0001) e para cPCR (0,0001) dentro dos pares discordantes (Tabela 5).

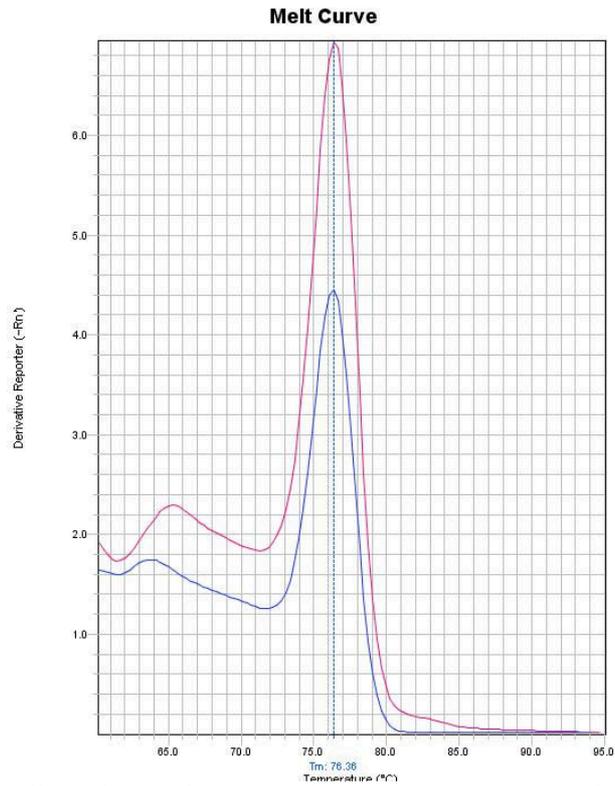


Figura 11. Curva de dissociação do DNA alvo (*18S rDNA*) a partir do controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 300 nM/300 nM

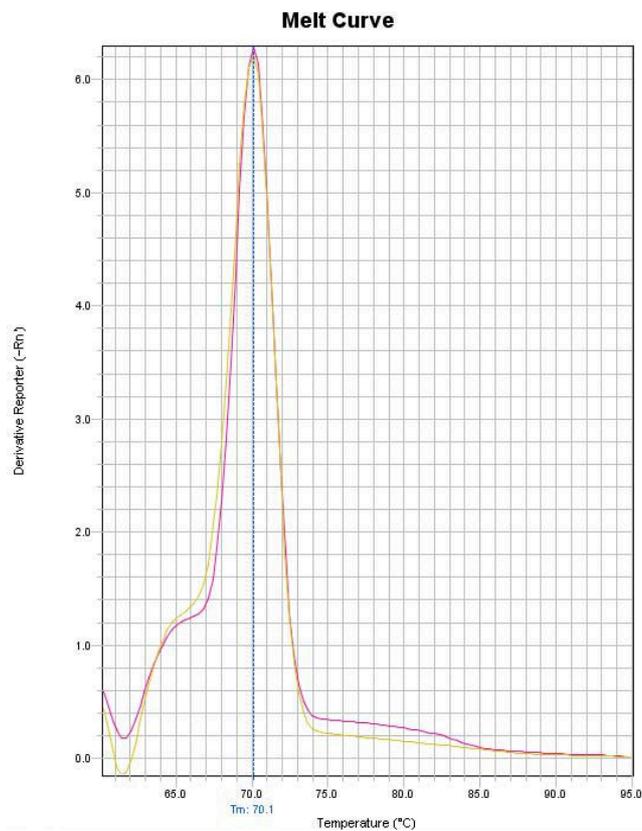


Figura 12. Curva de dissociação do DNA alvo (*Cyt b*) a partir do controle positivo, com as concentrações de oligoiniciadores (sensu/anti-sensu) sob a concentração de 60 nM 0/600 nM.

Tabela 5. Análise dos pares discordantes dos resultados obtidos no diagnóstico de *Plasmodium* sp. utilizando a PCR em tempo real (qPCR) com alvo no gene *18SrDNA*, em relação a *Nested* PCR (nPCR), a PCR convencional (cPCR) e esfregaço sanguíneo, em amostras de DNA total de *Gallus gallus*.

Testes diagnósticos	nPCR		cPCR		Microscopia	
	+	-	+	-	+	-
qPCR 18S rDNA	54	16	53	17	33	37
	1	30	0	31	0	34
Valor de P	P=0,0003*		P=0,0001*		P=0,0001*	

*p<0.05 = discordância significativa entre os testes (McNemar).

Todas as amostras positivas na qPCR para o *cyt b* foram também positivas na microscopia, porém a técnica de esfregaço sanguíneo não detectou a presença de *Plasmodium* sp em 30 amostras positivas na qPCR (p=0,0001). Cinco amostras foram positivas na nPCR e o DNA de *Plasmodium* sp não foi detectado pela qPCR, enquanto que 10 amostras foram positivas na qPCR e negativas na nPCR, porém houve diferença significativa (p= 0,3018) entre as duas técnicas. Quando a qPCR foi comparada com a técnica de cPCR, quatro amostras positiva na cPCR foram negativas para *Plasmodium* sp pela qPCR e 11 amostras positivas na qPCR foram negativas pela cPCR (p= 0,1185) (Tabela 6), porém a discordância entre essas duas técnicas não foi significativa.

Tabela 6. Análise dos pares discordantes dos resultados obtidos no diagnóstico de *Plasmodium* sp utilizando a PCR em tempo real (qPCR) com alvo no gene *cyt b*, em relação a *Nested* PCR (nPCR), a PCR convencional (cPCR) e esfregaço sanguíneo, em amostras de *Gallus gallus*.

Testes diagnósticos	nPCR		cPCR		Microscopia	
	+	-	+	-	+	-
qPCR <i>Cyt b</i>	50	10	49	11	30	30
	5	36	4	37	0	41
Valor de P	P=0,3018		P=0,1185		P=0,0001*	

Em relação aos resultados de obtidos nas qPCR desenvolvidas no presente estudo, observou-se que 52 amostras foram positivas para *Plasmodium* sp nos dois genes avaliados. Oito amostras foram positivas no diagnóstico pelo qPCR utilizando o gene *cyt b* e negativas quando o alvo foi o gene *18SrDNA*. Da mesma forma 18 amostras foram positivas para o gene *18S rDNA*, mas não foram detectadas pela qPCR com alvo no gene *cyt b* (Tabela 7).

Tabela 7. Análise dos pares discordantes dos resultados obtidos no diagnóstico de *Plasmodium* sp. utilizando a qPCR com alvo no gene *citocromo b*, em relação a qPCR para o gene *18S rDNA*, em amostras de DNA total obtido do sangue de *Gallus gallus*.

Testes diagnósticos	qPCR <i>Cyt b</i>	
	+	-
qPCR 18 S rDNA	52	18
	8	23
Valor de P	P=0,0776	

*p<0.05 = discordância significativa entre os testes (McNemar).

Avaliando-se o Cq dos pares discordantes entre as técnicas de *qPCR* e *nPCR*, pode-se observar que para o gene *18S rDNA*, a *nPCR* não foi capaz de detectar as amostras com Cq acima de 35,9, com exceção das amostras 1 e 91 que apresentaram Cq de 33,73 e 30,07, respectivamente (Tabela 8). O mesmo comportamento não foi observado entre o *qPCR* para o gene *cyt b* e a *nPCR*, onde pode-se observar amostra com Cq de 23,18 que foram negativas na *nPCR* (Tabela 9).

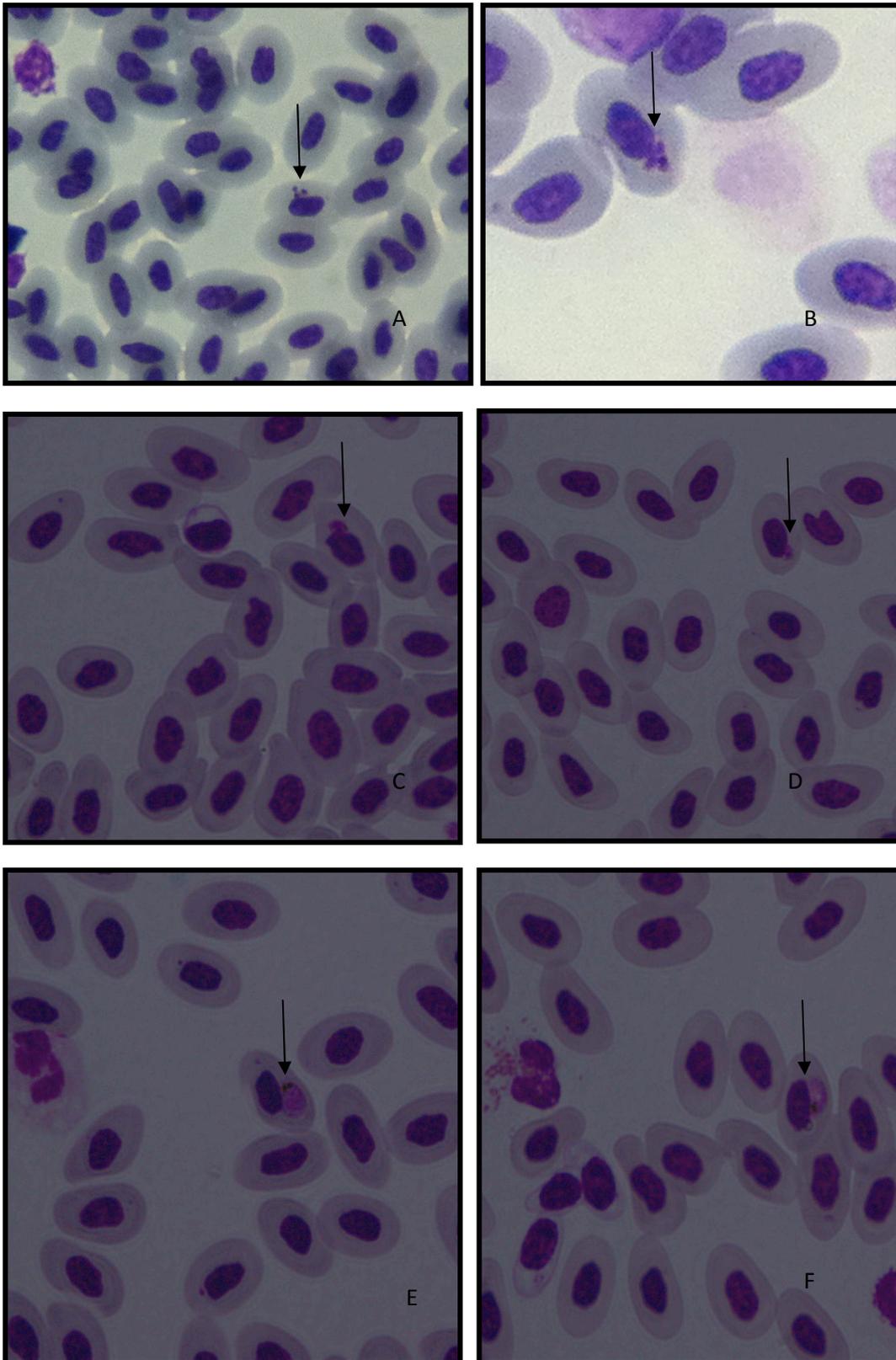
Tabela 8. Análise do Cq obtido no ensaio de *qPCR* do gene *18S rDNA* das amostras que apresentaram-se negativas na *nPCR*.

Amostra	Cq <i>qPCR</i> <i>18S rDNA</i>
1	33,73
2	36,68
3	37,25
5	38,00
6	36,06
7	36,36
8	38,13
11	38,29
35	37,07
44	37,21
46	37,55
86	38,71
90	39,72
91	30,07
94	35,92

Tabela 9. Análise do Cq obtido no ensaio de *qPCR* do gene *cyt b* das amostras que apresentaram-se negativas na *nPCR*.

Amostra	Cq <i>qPCR</i> <i>Cyt b</i>
3	28,02
32	28,45
33	25,54
36	37,85
54	30,02
56	33,01
59	23,18
80	23,83
91	24,49
94	35,90

Figura 13. Esfregaços sanguíneos de *Gallus gallus* contendo diferentes formas de desenvolvimento de *P. juxtannucleare*: **A e B:** esquizontes contendo 3 merozoítos; **C e D:** trofozoíta; **E e F:** gametócito.



7. DISCUSSÃO

A frequência de positividade encontrada nesse estudo foi de 30,69% utilizando a técnica de microscopia para diagnóstico de *Plasmodium* spp. no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, identificando-se trofozoítas em maior número, gametócitos, esquizontes e em menor quantidade microgametócitos. Outros estudos utilizando a microscopia óptica na avaliação de esfregaços sanguíneos no Estado do Rio de Janeiro detectaram alta prevalência em distintos municípios observando-se a prevalência de 39,7% da infecção causada pelo parasito no estado, dado este superior aos 2,34% encontrados por Ferraz Franco e colaboradores para outros municípios da mesma região (MASSARD, 1976). Em criações industriais foi diagnosticado prevalência de 79,5% em galinhas da raça Leghorn Branca (MASSARD, 1992). Em 1998 obteve-se 100% de prevalência em quatro criações do Estado do Rio de Janeiro (SOUZA, 1998; SOARES 1999).

Microscopia é o "padrão de ouro" para diagnóstico da malária aviária e que permanece sendo o método mais adequado para o diagnóstico da malária em regiões com recursos limitados, porém sabe-se que a microscopia pode não distinguir de forma confiável as co-infecções (BARBER et al., 2013), além de necessitar de experiência do examinador para diferenciar a variação morfológica entre as espécies (ZAKER et al., 2010). A preparação de esfregaços de sangue de qualidade é de fácil execução e baixo custo. No entanto, erros no protocolo da técnica podem gerar esfregaços inapropriados para a leitura, que possivelmente levariam a erros no diagnóstico, produzindo falsos negativos ou falsos positivos. (GARNHAM, 1966; COOPER e ANWAR, 2001; VALKIUNAS, 2005). Sabe-se também que infecções com baixa parasitemia podem não ser detectadas pela microscopia convencional (GOLASSA, 2013). Estudos comparativos entre a PCR e a microscopia para detecção de plasmódios aviários concluíram que a PCR é mais confiável do que o exame de esfregaço de sangue (RICHARDS et al., 2002, JARVI et al. 2002), indicando que os métodos moleculares possam ser até 10 vezes mais sensível que a microscopia (DURRANT et al, 2006) o que levantou uma questão sobre confiabilidade de estudos epidemiológicos com diagnósticos baseados apenas em resultados de análises microscópicas de esfregaços sanguíneos.

A qPCR é o melhor método para quantificar e detectar *Plasmodium* quando comparado a microscopia e demais métodos moleculares. Estudos utilizando qPCR baseados no sistema SYBR GREEN para detecção de espécies de *Plasmodium* são relativamente mais rápidos e precisos em comparação com outros métodos moleculares (SWAN et al., 2005, ROCKETT et al, 2011). Além disso, o método utilizando o sistema fechado permite a análise de dados em que se impede a contaminação pós-amplificação (TAJEBE et al., 2014). Logo a qPCR oferece maior confiabilidade na detecção de parasitas da malária, principalmente em casos de baixo nível de parasitemia e/ou infecções mistas (RANTALA et al., 2010). Contudo, a qPCR também apresenta limitações, e nelas se inclui o fato de que essa reação requer que o produto amplificado possua tamanho limitado (geralmente menor que 300 pb), para assegurar uma alta eficiência e reprodutibilidade (PENNINGGS et al., 2001), além do custo mais elevado e da necessidade de uma estrutura física adequada para realizá-la.

O diagnóstico utilizando a tecnologia SYBR Green possui também algumas limitações, pois por ser um corante intercalante que se liga a todo DNA de cadeia dupla produzido fluorescência, pode incluir amplificações não-específicas podendo indicar uma superestimação da quantificação levando a estimativa imprecisa de parasitemia, logo esta tecnologia é indicada apenas para detecção e diagnóstico não sendo indicada para quantificação do parasito. Quando utiliza-se sondas de hidrólise o sinal de detecção

só é produzido com o anelamento da sonda na sequência de DNA complementar indicando assim quantificações com maior confiabilidade. Porém estudos com finalidades de diagnóstico apresentaram limite de detecção semelhantes para as duas tecnologias utilizadas no qPCR (ROCKETT, 2011). O limite de detecção encontrado nesse estudo quando comparado a outras técnicas moleculares de diagnóstico apresentou-se muito mais sensível, permitindo a detecção de até 10 cópias do parasito para ambos os genes ou uma parasitemia de 1.7×10^{-7} . Enquanto que as demais técnicas testadas neste estudo apresentaram sensibilidade consideravelmente menor (nPCR 1.7×10^{-6} % e cPCR 1.7×10^{-5} % de parasitemia).

A tecnologia SYBR GREEN com alvos no gene 18S *rDNA* são sensíveis e específicos na detecção de algumas espécies de *Plasmodium* sp (MANGOLD et al., 2005), contudo ensaios com base em sequências de *rRNA* foram ineficazes em alguns estudos (RICHARD et al., 2002). Os resultados obtidos relacionados à especificidade de cada oligoiniciador corroboram com a literatura, e os desenhados para a região mais conservada no *Cyt b* apresentaram-se mais específicos que os oligoiniciadores desenhados para o gene ribossomal para os plasmódios aviários.

A especificidade da reação foi realizada em triplicata para organismos geneticamente relacionados a *P. juxtannucleare*, no presente estudo, tomou-se como referência essa espécie de plasmódio aviário, uma vez que no Brasil, a malária aviária em *Gallus gallus* é causada somente por este parasito, não havendo relatos de *P. gallinaceum* até o momento (VERSIANI, GOMES, 1941). Foram avaliados os parasitos da espécie *P. gallinaceum*; *P. lutzi*; *P. falciparum* e *Haemoproteus* sp. para ambos os genes testados na concentração ótima de oligoiniciadores escolhida em testes anteriores. Os oligoiniciadores cujo alvo está inserido no gene *18SrDNA*, detectou todos os plasmódios de origem aviária e o plasmódio causador da malária humana, mantendo-se negativo para *Haemoproteus* sp. O produto produzido com o anelamento do oligoiniciador do citocromo b apresentou positividade apenas para os plasmódios aviários, mantendo-se negativo para *P. falciparum* e *Haemoproteus* sp. o que indicaria uma maior especificidade dos oligoiniciadores desenhados com alvo no citocromo b novamente. (RICKLEFS et al., 2003).

A região do genoma mitocondrial dos parasitos da malária aviária podem detectar tanto *Haemoproteus* spp. quanto *Plasmodium* spp., porém estes diferem em até 12% na sequência do gene *cyt b* (RICKLEFS, FALLON, 2002), justificando a maior utilização dessa região para diagnóstico de *Plasmodium*, afim de aumentar a especificidade no diagnóstico diante de grande semelhança entre o grupo Haemosporida. Os oligoiniciadores da qPCR são desenhados para amplificar fragmentos mais curtos que podem estar localizadas em regiões mais conservadas do gene, essas características podem contribuir para aumentar a sensibilidade e especificidade do ensaio (RICKLEFS et al., 2003), porém em nosso estudo, os oligoiniciadores desenhados foram capazes de identificar os plasmódios aviários utilizados no teste de sensibilidade, não apresentando sensibilidade para outros plasmódios parasitas de mamíferos, assim como para o gênero *Haemoproteus*, apesar da significativa semelhança entre os gêneros. Os oligoiniciadores desenhados neste estudo são específicos para plasmódios aviários, considerando que as espécies encontradas em *Gallus gallus* restringe-se a *P. gallinaceum* e *P. juxtannucleare*, e que a ocorrência deste primeiro se restringe ao velho mundo, podemos afirmar que todas as amostras positivas encontradas neste estudo são positivas para *P. juxtannucleare*.

Métodos utilizando a nPCR como diagnóstico apesar de possuírem alta reprodutibilidade demonstram a variação entre ensaios associada à baixa parasitemia, provavelmente devido a deficiência de amplificação de alvos raros na primeira reação

(HELLGREN, 2004). Este fato justifica a diferença encontrada no presente estudo entre a *nPCR* e a *qPCR*, embora sem significância estatística. Além disso, o método de *nPCR* subestima as infecções mistas de haemosporídeos em aves naturalmente infectadas, uma vez que na primeira reação os oligoiniciadores possuem alta seletividade por determinados gêneros de Haemosporídeos no momento da amplificação (VALKIUNAS, 2006). Quando se avaliou as técnicas de *qPCR* e *nPCR*, utilizando-se os oligoiniciadores desenhados para o gene 18SrDNA, a técnica de *qPCR* apresentou-se mais sensível do que a *nPCR*, visto que os pares discordantes entre a *nPCR* e a *qPCR* apresentaram Cq elevados indicando uma maior sensibilidade da *qPCR* para detecção de amostras com baixa parasitemia, isto indica que algumas amostras com alvos raros amplificam um número baixo de cópias de DNA alvo o que dificultaria detecção do fragmento por *nPCR*. No entanto, quando comparada a técnica de *qPCR* para o gene *cyt b* não houve significância estatística na sensibilidade entre as técnicas.

Analisando os pares discordantes entre a *qPCR* para o gene *Cyt b* e a *nPCR* pode-se observar que amostras com baixo valor de Cq foram negativas na *nPCR*, este fato pode ser justificado pela amplificação de pequenos fragmentos ou de amostras com material genético fragmentado por erros no processo de extração do material genético, além disso pode-se relacionar a não detecção das amostras com baixo Cq com uma eficiência diminuída da técnica de *nPCR*, uma vez que esta técnica é considerada “*End Point*” em que não é possível a avaliação da eficiência durante a reação, como ocorre no *qPCR*. Outro fator que pode estar relacionado a não detecção destas amostras pela *nPCR* deve-se ao fato de que os oligoiniciadores utilizados neste estudo, bem como os demais utilizados em outros estudos para detecção de Haemosporídios e/ou plasmódios aviários não são espécie-específicos, como os oligoiniciadores utilizados neste estudos desenhados baseado no genoma de *P. juxtannucleare*, o poderia dificultar o anelamento neste parasito.

Estudos recentes mostram que a utilização das metodologias moleculares e morfológicas de forma complementar podem levar a uma melhor compreensão de fases do ciclo e das espécies de hemospórídeos aviários (VALKIUNAS et al., 2014a).

6. CONCLUSÃO

As técnicas de *qPCR* desenvolvidas neste estudo foram mais sensíveis quando comparada as técnicas de *nPCR*, *cPCR* e microscopia. As técnicas utilizadas neste estudo foram analisadas individualmente, e todas foram capazes de detectar o DNA de *Plasmodium* spp. em amostras de animais com alta parasitemia. Quando comparada a técnica de microscopia além de apresentar-se mais sensível que esta técnica, a *qPCR* possibilita a detecção do parasito mesmo em animais com baixa parasitemia e/ou assintomáticos além disso o *qPCR* testado para o gene *cyt b* apresentou-se mais específico quando comparado ao gene 18S *rDNA* no diagnóstico de plasmódios aviários.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DABAGH, M. A. Symptomatic partial paralysis in chicks with *Plasmodium juxtannucleare*. *Journal Comparative Pathology*, v. 71, n. 6, p. 217-221, 1961.
- AKIBA K. Studies on avian malaria. On the species of *Plasmodium* from chicken in Japan (*P. japonicum* Ishiguro, 1957 a synonym for *P. juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941). *Jap J Vet Sci*; 21: 18. 1959.
- AYRES M.; AYRES J.R.M.; AYRES D.L; SANTOS A.S. BioEstat 5.0- Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. CNPq, Brasília. 290p. 2007.
- ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leukocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye J.E. and Zuk M. (Eds.) *Blood-parasite interactions: Ecology, evolution, and behaviour*, Oxford University Press, Oxford, U.K., , p. 19- 47. 1991
- ATKINSON, K. L.; WOODS, R. J.; DUSEK, L. S. et al. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitol.*, v. 111, p. 59–69, 1995.
- ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; WOODS, K.L. et al. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wildl. Dis.*, v. 36, n. 2, p. 197-204, 2000.
- BARBER, B.; WILLIAM, T.; GRIGG, J.; YEO, T.; ANSTEY, N. Limitations of microscopy to differentiate Plasmodium species in a region co-endemic for Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi. *Malaria J*, 12:8. 2013.
- BARRETO, M. P.; Malária Aviária: III Sobre o encontro de formas exoeritrocíticas de *P.juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *O Hospital*, 24-683-645. 1943.
- BARKER, Jr. R. H.; BANCHONGAKSORN, T.; COURVAL, J. M. et al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood sample using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trp. Med. Hyg.*, v. 46, p. 416-426, 1992.
- BEADELL, J. S. and Fleischer, R. C. A restriction enzyme-based assay to distinguish between avian hemosporidians. *Journal of Parasitology* 91, 683–685. 2005
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D. et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, v. 267, p. 1583– 1589, 2000.
- BENSCH, S., J. PEREZ-TRIS, J. WALDENSRTOM, AND O. HELLGREN. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58: 1617–1621. 2004.
- BENNETT G F, EYLES D E, WARREN M C W, CHEONG W H. *Plasmodium juxtannucleare* a newly discovered parasite of domestic fowl in Malasya. *Singapore Med J*; 4: 172-3.-1963
- BENNETT G F, WARREN M C W. Biology of the malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. III- Life cycle of the erythrocytic parasite in the avian host. *J Parasitol*; 52: 653- 9. 1966
- BELTRAN E. Hallazgo de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Furtado em gallinas de Chiapas. *Rev Inst Salub Enferm Trop Mex*; 2: 353-4. 1941

- BELTRÁN E. Característica de una cepa mexicana (14B) de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Rev Inst Salub Enferm Trop Mex* 4:265-72. 1943.
- BOERO, J. J.; LED, J. E. El parasitismo de la fauna autóctona. III. Los parásitos de las aves argentinas. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata* 10:97–129. 1968.
- BRAGA, E.M; SILVEIRA, P.; BELO, N. O.; VALKIUNAS, G. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106 (Suppl. I): 3-11, 2011
- BRUMPT, E. Paludisme aviaire: *Plasmodium gallinaceum* n. sp. de la poule domestique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 200, 783–785. 1935
- BRUMPT, Émile. *Précis de parasitologie*. 5ème. ed. Paris: Masson. 1936b.
- CAMPBELL, T.W. Avian Haematology and cytology, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames, Iowa, Chen, DM, and Goldsmith, TH. (1986) Four spectral classes of cone in the retinas of bird. *J comp. Phylol. A.*; 159, 473-9. 1995
- CASSAMAGNAGHI A. Malária em las aves Del Uruguay. Montevideo, Fac. Vet., 93p. 1947.
- CICERON, L.; G. JAUREGUIBERRY, F.; DANIS M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J. Clin. Microbiol.* 37:35–38. 1999.
- CNOPS, L.; JACOBS, J.; VAN ESBROECK, M. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections. *Clin Microbiol Infect*, 17:1101–1107. 2010.
- CRANFIELD, M. R.; GRACZYK, T. K.; BEALL, F. B.; IALEGGIO, D. M.; SHAW, M. L.; SKJOLDAGER, M. L. Subclinical avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) and induction of parasite recrudescence. *J Wildl Dis* 30: 372-376. 1994.
- CRAWFORD, M. *Plasmodium gallinaceum*, a malarial parasite of the domestic fowl. *Veterinary Record*, 57, 395-396. 1945.
- COOPER, J. E., AND M. A. ANWAR. Blood parasites of birds: A plea for more cautious terminology. *Ibis* 143: 149–150. 2001.
- DHANAPALA S B. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fowls in Ceylon. *Rev Malar*; 41: 39-46. 1962.
- DANILEWSKY, Basil. Zur Parasitologie des Blutes. *Biologisches Zentralblatt*, Leipzig, n.5, p.529-537. 1886.
- DURRANT, K. L., J. S. BEADELL, F. ISHTIAQ, G. R. GRAVES, S. L. OLSON, E. GERING, M. A. PEIRCE, C. M. MILENSKY, B. K. SCHMIDT, C. GEBHARD, AND R. C. FLEISCHER.. Avian haematozoa in South America: A comparison of temperate and tropical zones. *Ornithological Monographs* 60: 98–111. 2006
- ELISEI, C. ; SOUZA, P. C. A. ; MASSARD, C. L. ; OLIVEIRA, C. S. Caracterización morfológica y morfométrica de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Boletín Chileno de Parasitología*, v. 25, n. 1-2, p. 12-18, 2001.
- FALLON, S. M., E. BERMINGHAM, AND R. E. RICKLEFS.. Island and taxon effects in parasitism revisited: Avian malaria in the Lesser Antilles. *Evolution* 57: 606–615. 2003

- FELDMAN, R. A.; FREED, L. A.; CANN, R. L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Mol. Ecol.*, v. 4, p. 663-673, 1995.
- FERRAZ-FRANCO H, VAITSMÁN J, MOUSSATCHÈ I. Hemoparasitos em aves domésticas. Observações em matadouro do Distrito Federal. *Ver Mil Rem Vet* 14: 29-37;1954.
- FREED, L. A., AND R. L. CANN. On polymerase chain reaction tests for estimating prevalence of malaria in birds. *Journal of Parasitology* **89**: 1261–1264. 2003.
- FREED, L. A., AND R. L. CANN. DNA quality and accuracy of avian malaria PCR diagnostics: A review. *Condor* **108**: 459–473. 2006
- GARAMSZEGI, L. Z. The sensitivity of microscopy and PCR-based detection methods affecting estimates of prevalence of blood parasites in birds. *J Parasitol* **96**: 1197-1203. 2010.
- GARNHAM, P. C. (Ed.). *Malaria parasites and other Haemosporidia*. Oxford: Blackwell, 1.114pp. 1960.
- GARNHAM, P. C. C. *Malaria parasites and other haemosporidia*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1966.
- GARNHAM, P. C. C. Malaria as a medical and veterinary zoonosis. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **62**, 325–332. 1969
- GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; MCCURCHAN, T. F.; BICKNESE, E.J. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol Res* **80**: 634-637. 1994.
- GOLASSA, L.; ENWEJI, N.; ERKO, B.; ASEFFA, A.; SWEDBERG, G. Detection of a substantial number of submicroscopic Plasmodium falciparum infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malar J* **12**:352. 2013.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; MCCUTCHAN, T.F. et al. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol. Res.*, v. 80, p. 634–637, 1994a.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; SHAW, M.L.; et al. Maternal antibodies against *Plasmodium* spp. in African blackfooted penguin (*Spheniscus demersus*) chicks. *J. Wildl. Dis.*, v. 30, p. 365-371, 1994b.
- HAMILTON, W. D.; ZUK, M. Heritable true fitness and bright birds. A role for parasites? *Science.*, v. 218, p. 384-387, 1982.
- HANSCH, T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:497–504. 2003.
- HELGREN J. WALDENSTROM, AND S. BENSCH.. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* **90**: 797–802. 2004
- HERMSEN, C.C.; TELGT, D.S.; LINDERS, E.H.; VAN DE LOCHT, L. A.; ELING, W.M.; MENSINK, E.J.; SAUERWEIN, R.W. Detection of Plasmodium falciparum malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Mol Biochem Parasitol* **2001**, **118**:247-251
- IEZHOVA, T. A.; VALKIUNAS, G. BAIRLEIN, F. Vertebrate host specificity of two avian malaria of the subgenus *Novyella*: *Plasmodium nucleophilum* and *Plasmodium vaughani*. *J Parasitol* **91**: 472-475. 2005
- IMOUKHUEDE, E.B.; VENTURA, R.; IMBAULT, N.; VAN SCHOOTEN, H.; LEROY, O. European Malaria Vaccine Initiative: portfolio and perspectives for the future. *Human Vaccines*, **6**:146-150. 2010.

- ISHIGURO H. *Plasmodium japonicum*, a new specie of malaria parasite pathogenic for the domestic fowl. Bull Fac Agri Yamaguti Univ; 8: 723-32. 20; 1957.
- JARVI, S. I, J. J. SCHULTZ, AND C. T. ATKINSON. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. Journal of Parasitology **88**: 153–158. 2002.
- KIMURA, M., A. A. DHONDT, AND I. J. LOVETTE.. Phylogeographic structuring of *Plasmodium* lineages across the North American range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). Journal of Parasitology **92**: 1043–1049. 2006
- KISSINGER, Jessica C. et al. Molecular phylogenetic analysis of the avian malarial parasite *Plasmodium* (*Novyella*) *juxtannucleare*. Journal of Parasitology, v. 88, n. 4, p. 769-773, 2002.
- KNIGHT, K. L. & STONE, A. *A catalogue of the mosquitoes of the world*, 2nd edn. College Park, MD: The Thomas Say Foundation. 1977
- KRETLI, A.U. *Estudos sobre a prevalência, biologia e transmissão do Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941*. 1971. 73p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1971.
- KRETLI, A.U. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.14, n. 1, p. 235-245. 1972
- KRETLI, A.U; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96 n. 8, p. 1033-1042. 2001
- LAIRD M. *Avian malaria in the asian tropical subregion*, Springer-Verlag, Singapore, 130 pp. 1998
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, CASTRO FA. *Culex saltanensis* Dyar, 1928 - Natural vetor of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz; 86: 87-94; 1991.
- LUCENA, D. T. Malaria aviária: Subsídios para sua sistemática e transmissão. Tese, Jornal do Commercio, Recife, , 126 p. MACHADO, P. A. R. 1939.
- MAIA M C, SIQUEIRA I C V, SANTOS H H, d'AGOSTO M. Ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em *Gallus gallus* L. de criação rústica no município de Santa Bárbara do Tugúrio-MG. Anais do XI Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 213p. 1999.
- MARTINSEN, E. S., I. PAPERNA, AND J. J. SCHALL. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: An exploration of three species concepts. Parasitology **133**: 279–288. 2006
- MANGOLD, K. A.; MANSON, R.U.; KOAY, E.S.; STEPHENS, L.; REGNER, M.; THOMSON, R. B.; PETERSON, L. R.; KAUL, K.L. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. J Clin Microbiol 43:2435–2440. 2005.
- MANWELL R A. *Plasmodium japonicum*, *Plasmodium juxtannucleare* and *Plasmodium nucleophilum* in the far east. J Protozool; 13: 8- 11. 1966.
- MERINO, S., MORENO, J., VASQUEZ, R. A., MARTINEZ, J., SANCHEZ MONSALVEZ, I., ESTADES, C. F., IPPI, S., SABAT, P., ROZZI, R. and MC GEHEE, S. Haematozoa in forest birds from southern Chile: latitudinal gradients in prevalence and parasite lineage richness. Austral Ecology 33, 329–340. 2008

- MOHAN RN, MANWELL RD. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Francolinus* sp.). J Parasitol; 55: 543. 1966.
- MASSARD C L. Aspectos biológicos de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves do Brasil. Tese de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, Rio de Janeiro, 53p. 1976.
- MASSARD C L. Significância das infecções causadas por *Plasmodium (Noyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Haemosporida: Plasmodiidae) em *Gallus gallus* L. de criação industrial no estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural, Rio de Janeiro, 57p. 1979.
- MASSARD C L. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidea: Plasmodiidae) em Criações de *Gallus gallus* da Raça Leghorn Branca. Arq Univ Fed Rur Rio de Janeiro Itaguaí; 5: 141-6. 1982.
- MENS, P. F; SHOONNE, G. J; KAGER, P.A; SCHALLIG, H. D. F. H. Detection and identification of human *Plasmodium* species with real time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. J Malar. 5:80. 2006
- MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin. Microbiol. Rev. 15:66–78. 2002.
- MOTA R A. Variações hematológicas em *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectados com o *Plasmodium (Noyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 58p. 1997.
- MOTA R A, CUNHA E L P, SOARES C O et al. Variáveis Hematológicas em *Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectados com *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941). Ciênc Vet Trop Recife; 1: 76-80. 1998.
- NILES, W. J. & KULASIRI, C. S. A note on the vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Ceylon. *Ceylon J. Med. Sci.* 16, 26–27. 1967.
- NILES, W. J., FERNANDO, M. A. & DISSANAIKE, A. S. *Mansonia crassipes* as the natural vector of . larioids, *Plasmodium gallinaceum* and other Plasmodia of fowls in Ceylon. *Nature* 205, 411–412. 1965.
- NWAKANMA, D.C.; GOMEZ-ESCOLAR, N.; WALTHER, M.; CROZIER, S.; DUBOVSKY, F.; MALKIN, E.; LOCKE, E.; CONWAY, D. J. Quantitative detection of *Plasmodium falciparum* DNA in saliva, blood, and urine. J Infect Dis, 199:1567-1574. 2009.
- OMAR, A.R. Haemoprotozoan infections of poultry in Malaysia. *Kajian Veterinar*, 1 , 109 _/124; 1968.
- PALINAUSKAS, V.; KOSAREV, V.; SHAPOVAL, A.; BENSCH, S.; VALKIUNAS, G. Comparison of mitochondrial cytochrome *b* lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). *Zootaxa* 1626: 39-50. 2007.
- PARAENSE W L. Infecção experimental de *C. quiquenfasciatus* pelo *Plasmodium juxtannucleare* Versiani e Gomes, 1941. Mem Inst Oswaldo Cruz. 41:435-440. 1944.
- PARAENSE W L. Observações preliminares sobre o ciclo exoeritrocitário do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani e Gomes, 1941. Mem Inst Oswaldo Cruz; 45: 813-23. 1947

- PARAENSE W L. Um inquérito sobre a ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambui (estado de Minas Gerais). Mem Inst Oswaldo Cruz; 47: 361-5; 1949.
- PAUL RICK E. L., VAN ANH TON NU, ANTONIANA U. KRETTLIAND PAUL T. BREY. Interspecific competition during transmission of two sympatric malaria parasite species to the mosquito vector. Proc. R. Soc. Lond. B 269, 2551–2557 2551 Ó 2002 The Royal Society . 2002.
- PERKINS, S. L.; OSGOOD, S. M.; SCHALL, J. J. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria. Implications for epizootiology. *Mol. Ecol.*, v. 7, p. 1587-1590, 1998.
- PERKINS, S. L. AND J. J. SCHALL.. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome *b* gene sequences. *Journal of Parasitology* **88**: 972–978. 2002
- PERKINS, S. L., I. N. SARKAR, AND R. CARTER.. The phylogeny of rodent malaria parasites: Simultaneous analysis across three genomes. *Infection, Genetics and Evolution* **7**: 74–83. 2007
- POULSEN, J., PERMIN, A., HINDSBO, O., YELIFARI, L., NANSEN, P. & BLOCH, P. Prevalence and distribution of gastrointestinal helminths and haemoparasites in young scavenging chickens in upper eastern region of Ghana, West Africa. *Prev. Vet. Med.* **45**, 237–245. 2000.
- RANTALA, A.M.; TAYLOR S.M.; TROTTMAN, P.A.; LUNTAMO, M; MBEWE, B.; MALETA, K.; KULMALA, T.; ASHOM, P.; MESHNICK, S.R. Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian Pregnant Women. *Malar J*, 9:269. 2010.
- ROCKETT et al. A real-time, quantitative PCR method using hydrolysis probes for the monitoring of *Plasmodium falciparum* load in experimentally infected human volunteers. *Malaria Journal* 10:48. 2011.
- RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S. et al. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitol.*, v. 130, p. 261-267, 2005.
- RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. R. Soc. Lond.*, v. 269, p. 885–892, 2002.
- RICKLEFS, R. E. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. *Evolution.*, v.57, p. 606–615, 2003
- RICKLEFS, R. E., S. M. FALLON, AND E. BERMINGHAM.. Evolutionary relationships, cospeciation, and host switching in avian malaria parasites. *Systematic Biology* **53**: 111–119. 2004
- RICKLEFS, R. E., Swanson, B. L., Fallon, S. M., Martinez-Abrain, A., Scheuerlein, A., Gray, J. and Latta, S. C. Community relationships of avian malaria parasites in southern Missouri. *Ecological Monographs* **75**, 543–559. 2005
- RICHARDS, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I. et al. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *J. Parasitol.*, v. 88, p. 819-822, 2002.
- SANTOS-PREZOTO, H.H.; D’AGOSTO, M.; DAEMON, E. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. *Parasitologia Latino americana* v.59, n.1 , p. 14-20. 2004.
- SILVEIRA, P.; VASHIST, U.; CABRAL, A.; AMARAL, K. B.; SOARES, G.L.G.; D’AGOSTO, M.; Effect of rutin and chloroquine on white Leghorn chickens infected

- with *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. *Trop Anim Health Prod* 41: 1319-1323. 2009b.
- SOARES C O, FONSECA A H, MASSARD C L, SOUZA P C A. Significância da Malária Aviária em *Gallus gallus* L. de criações rústicas. Anais do Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 201p. 1995.
- SOARES C O, MASSARD C L, FONSECA A H, SOUZA P C A. Esquizogonia exoeritrocitária plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Parasitol al Día*; 23: 87-90. 1999.
- SOUZA P C A. Malária 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 Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 137p. 1998.
- SERRA FREIRE N M, MASSARD C L. Ocorrência e incidência de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em Belém – Pará. Congresso Sociedade Brasileira Parasitol Anais Belém, SBP. 1976.
- SERRA FREIRE N M, MASSARD C L. *Plasmodium Plasmodium (Novyella) juxtannucleare em Gallus gallus - H. H. Santos-Prezoto et al. juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasita de *Gallus gallus* L., *Meleagris gallopavo* L. e *Crysolophus* spp. na região do Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul. Atas. Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro; 20: 45-8. 1979
- SWAN, H.; SLOAN, L.; MUYOBWE, A.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P.; KRUDSOOD, S.; LEOWATTANA, W.; WILAIRATANA, P.; LOOREESUWAN, S.; ROSENBLATT, J. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 73:850–854. 2005.
- TAJEBE et al. Detection of mixed infection level of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by SYBR Green I-based real-time PCR in North Gondar, north-west Ethiopia. *Malaria Journal* 13:411. 2014.
- VALKIUNAS AND T. A. IEZHOVA. A comparison of the blood parasites in three subspecies of the yellow wagtail *Motacilla flava*. *Journal of Parasitology* 87: 930–934. 2001.
- VALKIUNAS, G.. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p. 2005
- VALKIUNAS; S. BENSCH, T. A. IEZHOVA, A. KRIZ ANAUSKIENE, O. HELLGREN, BOLSHAKOV, C. Nested cytochrome *b* polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: Microscopy is still essential. *Journal of Parasitology* 92: 418–422. 2006.
- VALKIUNAS, G. IEZHOVA, T.A; KRIZANAUSKIENE, A.; PALINAUSKAS, V.; SEHGAL, R.N.M.; BENSCH, S. A comparative analyses of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology*. v.94, n.6, p 1395-1401, 2008.
- VAN RIPER III, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M. L. et al. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecol. Monogr.*, v. 56, p. 327–344, 1986.
- VAN RIPER III, C.; ATKINSON, C. T.; SEED, T. M. Plasmodia of birds. In: Kreier, J. P. (ed.), Parasitic protozoa San Diego, CA: *Academic Press*, , p. 73–140; 1994.

VASHIST, U. Atividade anti-malária da 4-(9H-purina-6-ylthio)-7-cloroquinolina em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 80p, 2007.

VASHIST, U. ; FALQUETO, A. ; LUSTRINO, D. ; TUNHOLI, V. M. ; TUNHOLI-ALVES, V. ; SANTOS, M.A.J. ; D'AGOSTO, M. ; MASSARD, C. L. ; PINHEIRO, J. Hepatic profile of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Veterinary Parasitology*, v.175, p. 207-211, 2011.

VERSIANI, V. & GOMES, B. F. Sobre um novo hematozoário da galinha: *Plasmodium juxtannucleare* n.sp. (Nota prévia). *Revista Brasileira de Biologia* 1, 231–233. 1941.

VERSIANI, V.; GOMES, B.F. *Plasmodium juxtannucleare*, parasita de galinha doméstica (notas adicionais). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 3, n.1 p.113-117. 1943.

WALDENSTROM, J.; BENSCH, S.; KIBOI, S. et al. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol. Ecol.*, v. 11, p. 1545-1554, 2002.

WILLIAMS, R. B. The efficacy of a mixture of trimethoprim and sulphaquinoxaline against *Plasmodium gallinaceum* malaria in the domesticated fowl *Gallus gallus*. *Vet Parasitol* 129: 193-207. 2005.

ZAKERI, S.; KAKAR, Q.; GHASEMI, F.; RAEISI, A.; BUTT, W.; SAFI, N.; AFSHARPAD, M.; MEMEON, M. S.; GHOLIZADEH, S.; SALEHI, M.; ATTA, H.; ZAMANI, G.; DJADID, N. D. Detection of mixed *P. falciparum* & *P. vivax* infections by nested-PCR in Pakistan, Iran & Afghanistan. *Indian J Med Res* 132:31–35. 2010.

ANEXOS

Anexo I. Protocolo do kit de extração de DNA – Adaptado para sangue de Ave-Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega

Anexo II. Tabela de concentrações de DNA total das aves após a extração.

Anexo III. Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado ao responsável pela propriedade e preenchido para autorização da realização das coletas.

Anexo IV. Diagnóstico final das técnicas utilizadas

Anexo V. Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP

Anexo VII. Protocolo da endonuclease de restrição SAC I utilizada para Linearização da dos fragmentos clonados.

Anexo VI. Protocolo da endonuclease de restrição HINDIII utilizada para confirmação da clonagem dos fragmentos testados.

Anexo I

PROTOCOLO DO KIT DE EXTRAÇÃO DE DNA – ADAPTADO PARA SANGUE DE AVE

Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega

Bateria com 12 amostras demora cerca de 3 horas.

Colocar etanol 100% e 70% no freezer antes de iniciar a bateria.

1. Separar 24 tubos eppendorffs de 1,5mL; identificar.
2. Pipetar 200µL da solução de lise celular nos primeiros 12 tubos;
3. Adicionar um a um, 20µL de sangue de ave, homogeneizando com a pipeta vagarosamente;
4. Incubar por 10 minutos, invertendo os tubos durante este tempo (HulaMixer);
5. Centrifugar na velocidade de 8000xg (centrífuga refrigerada) por 5 minutos.
6. Descartar o sobrenadante invertendo o tubo e sacudindo com cuidado (ou por pipetagem); o que ficará no fundo é um grumo um pouco mais claro que o sangue;
7. Adicionar 250µL de solução de lise nuclear; misturando com a ponteira de 1mL, até que o grumo passe por dentro da ponteira e saia sem entupir (pode ser realizado aqui movimentos de maceração com a ponteira e sucção ao mesmo tempo para facilitar a dissolução do grumo); vortexar por 20seg (ou mais, dependendo do comportamento da amostra – amostras com o grumo mais difícil de dissolver, deixar mais tempo no vortex).
8. Adicionar aos tubos 1µL de RNase, homogeneizando com a pipeta. Spin. Incubar por 15 minutos a 37°C
8. Adicionar 150µL da solução de precipitação protéica, um a um, misturando com a ponteira de 1mL, até dissolver o grumo que se formará (ele deve entrar e sair da ponteira de 1mL com facilidade, sem entupir); vortexar por mais 20seg.
9. Centrifugar a 16.000xg por 5 minutos; Se após centrifugação não houver nenhuma separação entre grumo e sobrenadante, adicionar mais 50µL de solução de precipitação proteica, vortexar um pouco e tentar novamente; ainda, se não houver separação, esquentar um pouco em TermoMixer (55°C) por 15min.
10. Transferir 250µL do sobrenadante para o tubo definitivo correspondente (1,5mL) – este volume pode ser variável, porém é importante não aspirar nenhum resquício do sedimentado ou a pureza do DNA estará comprometida;
11. Adicionar ao sobrenadante transferido, 150µL de isopropanol gelado (freezer);
12. Homogeneizar por inversão de tubo, verificando a formação da “nuvem” de DNA;
13. Centrifugar a 14.000xg por 4 minutos;
14. Descartar o sobrenadante com cuidado, invertendo o tubo de forma que o precipitado não desprenda e caia no descarte;
15. Adicionar 200µL de etanol 70% gelado (freezer), homogeneizando por inversão lenta;
16. Centrifugar a 14.000xg por 2 minutos;
17. Repetir etapa 15 e 16;
18. O etanol que sobrar ao redor do “pellet” no fundo do tubo deve ser aspirado com pipeta (100µL);
18. Deixar o “pellet” secar no ambiente com o tubo aberto por poucos minutos (10 min), sempre observando;
19. Adicionar 100µL de solução de rehidratação de DNA ao tubo contendo o “pellet” seco, misturando com “petelecos” (nesta etapa pode deixar 10min a 38°C no TermoMixer para facilitar a solubilização).

Anexo II. Tabela de concentrações de DNA total das aves após a extração.

Amostra	Concentração de DNA (ng/ μL)
1	414,9
2	926,5
3	852,2
4	688,5
5	420,5
6	229,3
7	427,7
8	361,8
9	453,7
10	373,8
11	380,2
12	372
13	245,3
14	111,5
15	158,9
16	86,5
17	111,7
18	88,3
19	561,2
20	131,7
21	74,3
22	104,2
23	166,9
24	338,3
25	190,6
26	126,8
27	294,8
28	293
29	696,5
30	86,7
31	74,8
32	103,3
33	115,1
34	237,7
35	85,9
36	280,7

Anexo II. Continuação.

Amostra	Concentração de DNA (ng/ μL)
37	249
39	306,3
38	520,6
40	769,9
41	248,2
42	196,9
43	532,3
44	338
45	270,9
46	456,3
47	542,9
48	547,9
49	95,7
50	525,5
51	199,6
52	146,1
53	263,8
54	410,3
55	118,8
56	272,6
57	294,8
58	195,7
59	393,3
60	329,2
61	341,3
62	148,4
63	246,4
64	382,9
65	432,5
66	417
67	668,4
68	774,5
69	825,7
70	1478,7
71	431,2
72	588,5
73	251,1
74	607,2
75	460,3
76	346,8
77	347,3
78	330,7
79	358,6
80	469,1
81	367

Amostras	Concentração de DNA (ng/ μL)
82	423,3
83	85,9
84	825,4
85	354,4
86	703
87	637,5
88	860,2
89	517,1
90	379,2
91	729,2
92	385,6
93	362,4
94	678,7
95	382,5
96	205,3
97	664,4
98	645
99	489
100	424,2
101	454

Anexo III– Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado ao responsável pela propriedade e preenchido para autorização da realização das coletas.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____

CPF/RG: _____ endereço: _____

_____, telefone: _____ recebi explicações sobre o projeto do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, visando estudos epidemiomoleculares de hemoparasitos em aves, autorizo a coleta de material biológico em minhas aves, estando ciente que minha identidade será preservada, que não haverá danos nos animais decorrentes da coleta do material e ausência de custos na realização dos exames.

Em ___ / ___ / ___

Assinatura: _____

Anexo IV - Diagnóstico final das técnicas utilizadas

Amostras	PCR convencional	nPCR	qPCR Cyt b	qPCR 18S	Microscopia
1	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
2	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo
3	negativo	negativo	positivo	positivo	Negativo
4	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
5	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
6	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
7	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
8	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
9	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
10	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
11	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
12	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
13	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
14	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
15	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
16	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
17	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
18	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
19	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
20	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
21	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
22	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
23	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
24	positivo	Positivo	positivo	positivo	Positivo
25	positivo	Positivo	positivo	positivo	Positivo
26	negativo	Negativo	negativo	negativo	Negativo
27	positivo	Positivo	positivo	positivo	Negativo
28	positivo	Positivo	positivo	positivo	Positivo
29	negativo	Positivo	negativo	positivo	Positivo
30	positivo	Positivo	positivo	positivo	Negativo
31	positivo	Positivo	positivo	positivo	Positivo
32	negativo	Negativo	positivo	negativo	Negativo
33	negativo	Negativo	positivo	negativo	Negativo
34	positivo	Positivo	positivo	positivo	Positivo

Anexo IV – Continuação.

Amostras	PCR convencional	nPCR	qPCR Cyt b	qPCR 18S	Microscopia
35	negativo	Negativo	negativo	positivo	negativo
36	negativo	Negativo	positivo	negativo	Negativo
37	positivo	Positivo	positivo	positivo	Negativo
38	positivo	Positivo	positivo	positivo	Negativo
39	positivo	Positivo	negativo	positivo	Negativo
40	positivo	Positivo	positivo	positivo	Positivo
41	negativo	Negativo	negativo	negativo	Negativo
42	positivo	Positivo	positivo	positivo	Positivo
43	negativo	Negativo	negativo	negativo	Negativo
44	negativo	Negativo	negativo	positivo	Negativo
45	positivo	Positivo	positivo	positivo	Negativo
46	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
47	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
48	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
49	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
50	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
51	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
52	positivo	positivo	negativo	positivo	Positivo
53	positivo	positivo	negativo	positivo	Negativo
54	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
55	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
56	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
57	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
58	negativo	positivo	positivo	negativo	Negativo
59	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
60	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
61	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
62	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
63	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
64	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
65	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
66	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
67	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo

Anexo IV – Continuação.

Amostras	PCR convencional	nPCR	qPCR Cyt b	qPCR 18S	Microscopia
68	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
69	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
70	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
71	positivo	positivo	negativo	positivo	Negativo
72	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
73	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
74	negativo	positivo	positivo	positivo	Positivo
75	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
76	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
77	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
78	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
79	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
80	negativo	negativo	positivo	negativo	Negativo
81	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
82	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
83	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
84	positivo	positivo	positivo	positivo	Negativo
85	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
86	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
87	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
88	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
89	positivo	positivo	positivo	positivo	Positivo
90	negativo	negativo	negativo	positivo	Negativo
91	positivo	negativo	positivo	positivo	Negativo
92	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
93	negativo	negativo	negativo	negativo	Negativo
94	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo
95	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
96	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
97	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
98	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
99	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
100	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
101	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

Anexo V- Parecer da Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NA PESQUISA DA UFRRJ / COMEP

Protocolo N° 388/2013

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado "*Padronização e validação do ensaio de PCR em tempo real para detecção e quantificação simultânea de Plasmodium juxtanucleare e Borrelia anserina em Gallus gallus*" sob a responsabilidade do Prof. Dr. Huarrison Azevedo Santos, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, processo 23083.007905/2013-66, atende aos princípios básicos para pesquisa envolvendo o uso de animais e está de acordo com os princípios éticos e do bem estar animal estando de acordo com a Resolução 714 de 20/06/2002 do CFMV.

UFRRJ, 14/10/2013.

Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa e Pós-graduação

Jairo Pinheiro da Silva
Pró-reitor Adjunto de
Pesquisa e Pós-Graduação
SIAPE n° 1109555

Anexo VI - Protocolo da endonuclease de restrição Hind III e Sac I utilizados para confirmação da clonagem dos fragmentos testados.

A confirmação da clonagem foi realizada com dupla digestão utilizando as endonucleases de restrição Hind III e Sac I. Foram utilizados 2 uL do Tampão E , 0,2 uL de BSA; 0,5 uL de SACI e 0,5 uL de HindIII; 3 uL do DNA a (300ng/ uL), 13,8 uL de água nuclease free, em uma reação com volume final de 20 uL. A reação foi incubada a 37°C por 3 horas. As enzimas foram inativadas de acordo com as recomendações do fabricante a 65°C durante 15 minutos. A visualização da confirmação da clonagem foi realizada em gel a 0,9%.

Anexo VII- Protocolo da endonuclease de restrição Sac I utilizada para linearização dos fragmentos clonados.

Após a confirmação de restrição foi realizada a linearização do fragmento clonado com a endonuclease de restrição SAC I utilizando 5 uL do Tampão; 0,5 uL do BSA; SACI 1,25 uL; 7 uL de DNA a 300ng/ uL; e 36,25 uL de água nuclease free em uma reação com volume final de 50 uL. A reação foi incubada a 37°C durante 3horas. A inativação da endonuclease foi realizada durante 15minutos a 65°C. A confirmação da linearização foi realizada com eletroforese em gel de agarose a 0,9%.