

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

DISSERTAÇÃO

**ESTUDO HEMATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
HEMOSPORÍDEOS E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE
EM ARARA-CANINDÉ (*Ara ararauna*) E PAPAGAIO-VERDADEIRO
(*Amazona aestiva*) MANTIDOS NO CENTRO DE TRIAGEM DE
ANIMAIS SILVESTRES (CETAS-RJ)**

Naiara Vidal Stocco

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**ESTUDO HEMATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR
HEMOSPORÍDEOS E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE
EM ARARA-CANINDÉ (*Ara ararauna*) E PAPAGAIO-VERDADEIRO
(*Amazona aestiva*) MANTIDOS NO CENTRO DE TRIAGEM DE
ANIMAIS SILVESTRES (CETAS-RJ)**

NAIARA VIDAL STOCCO

Sob a Orientação da Professora:
CRISTIANE DIVAN BALDANI

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas).

Seropédica, RJ
Novembro de 2021

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

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

S864e Stocco, Naiara Vidal, 14/08/1993-
Estudo Hematológico e Molecular da Infecção por
Hemosporídeos e Agentes da Família Anaplasmataceae em
Arara-canindé (*Ara ararauna*) e Papagaio-verdadeiro
(*Amazona aestiva*) Mantidos no Centro de Triagem de
Animais Silvestres (CETAS-RJ) / Naiara Vidal Stocco.
Seropédica, 2021.
79 f.: il.

Orientadora: Cristiane Divan Baldani.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS, 2021.

1. Estudo hematológico e molecular. 2.
Psittaciformes. 3. Haemosporida. 4. Anaplasmataceae.
I. Baldani, Cristiane Divan, 17/12/1978-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA PATOLOGIA E
CIÊNCIAS CLÍNICAS III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE VETERINÁRIA. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

NAIARA VIDAL STOCCO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas

TESE APROVADA EM 29/11/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC.

Identificar membros da banca:

Dra. CRISTIANE DIVAN BALDANI, UFRRJ
(Orientador / Presidente da Banca)

Dr. MARCOS ROGERIO ANDRE, UNESP

Dr. DANIEL DE ALMEIDA BALTHAZAR, UFRRJ

Dra. ANDRESA GUIMARÃES, INMA



Emitido em 2022

TERMO Nº 150/2022 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 21/02/2022 09:26)

CRISTIANE DIVAN BALDANI

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

Dept.MCV (12.28.01.00.00.00.53)

Matricula: 2572430

(Assinado digitalmente em 23/02/2022 06:48)

DANIEL DE ALMEIDA BALTHAZAR

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

Dept.MCV (12.28.01.00.00.00.53)

Matricula: 2318733

(Assinado digitalmente em 21/02/2022 11:20)

MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 302.435.148-59

(Assinado digitalmente em 21/02/2022 09:06)

ANDRESA GUIMARÃES

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 116.295.977-08

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
150, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **20/02/2022** e o código de verificação: **f9b4abbaa7**

AGRADECIMENTOS

À Deus por me sustentar até aqui, me mantendo forte, com saúde e esperançosa, apesar do cenário em que vivemos dentro destes dois anos pandêmicos. Por cuidar da minha família e amigos e mantê-los saudáveis.

À minha família, vocês são minha força, apesar da distância, sempre fizeram-se presentes. À minha mãe, guerreira que sempre me incentivou ir atrás dos meus sonhos e não desistir diante das adversidades. Meu pai, por todo apoio. À minha irmã gêmea, Anieli, pelo companheirismo, por ter me aguentado nesses últimos meses de estresse, sempre me apoiando e incentivando a continuar forte e otimista, sem contar que auxiliou na colheita sanguínea de todas as aves envolvidas no projeto. Agradeço também aos meus outros irmãos, Lucas e Alice. Amo vocês...

À professora Cristiane Divan Baldani, minha orientadora, pela força e exemplo profissional, sempre incentivando e me apoiando. Agradeço pela amizade, preocupação, oportunidade de evoluir e aprender durante esses 4 anos (residência e mestrado).

Equipe LABVET, minha segunda família... Ágatha, Andresa (melhor preceptora), Lex e Beth sou muito grata por saber que posso contar com todos vocês, saibam que sempre poderão contar comigo para o que precisarem.

Ao professor Daniel de Almeida Balthazar e residentes, que se propuseram em ajudar na colheita sanguínea das aves. Vocês foram parte fundamental para que meu projeto acontecesse. Agradeço Também ao CETAS, que autorizou a utilização dos animais.

Ao professor Marcos Rogério André e Professora Ronsagela Zacarias Machado, que nos receberam com todo carinho junto à sua equipe maravilhosa (Ana Calchi, Ana Carol, Ana Claudia, Ricardo, Laryssa, Victoria, Clara, Amir e todos os demais) no Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Campus de Jaboticabal, onde realizei o diagnóstico molecular das minhas amostras e aprendi muito com os doutorandos, Ana Calchi e Amir. Ana Calchi mesmo sem nos conhecer, não mediu esforços para nos ensinar a fazer as reações, dividindo suas experiências e protocolos utilizados.

Aos professores membros da Banca de Defesa: Prof. Dr. Marcos Rogério André; Prof. Dr. Daniel de Almeida Balthazar; Profa. Andresa Guimarães e Profa. Maristela Peckle Peixoto. Agradeço pela disponibilidade, por aceitarem participar da banca, assim como auxílio na correção deste trabalho e sugestões.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 001.

RESUMO

STOCCO, Naiara Vidal. **Estudo Hematológico e Molecular da Infecção por Hemosporídeos e Agentes da Família Anaplasmataceae em Arara-canindé (*Ara ararauna*) e Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) Mantidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ)**, 2021. 79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Agentes da ordem Haemosporida e Rickettsiales são importantes patógenos transmitidos por artrópodes capazes de acometerem diversos grupos de animais, incluindo as aves. Os Centros de Triagens do IBAMA albergam considerável número de aves de diversas espécies, que chegam constantemente debilitadas nestas instituições, propensas a doenças e a disseminação de patógenos. O presente estudo teve como objetivo realizar avaliação hematológica, pesquisa de hemosporídeos (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp.) e agentes da família Anaplasmataceae (*Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp.) em araras-canindé (*Ara ararauna*) e Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), amostrados do Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro. Foram colhidas amostras sanguíneas de 44 aves mantidas nesta instituição, sendo 19 aves da espécie *Ara ararauna* (arara-canindé) e 25 indivíduos da espécie *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro). As amostras sanguíneas foram submetidas a métodos diagnósticos, a fim de avaliar o perfil hematológico destes indivíduos e detectar a presença de tais agentes etiológicos, através de técnicas moleculares, detecção direta em esfregaço sanguíneo e sequenciamento genético. Apenas as araras (*Ara ararauna*) mostraram-se positivas para os agentes pesquisados. Na avaliação de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, foram encontradas estruturas compatíveis com hemoparasitos em 2 (4,54%; 2/44) aves, sugestivas de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. No diagnóstico molecular 6,81% (3/44) dos indivíduos testados foram positivos. Uma (2,27%; 1/44) arara foi positiva para o gene 16SrRNA (família Anaplasmataceae), e duas (4,54%; 2/44) apresentaram positividade para o gene citocromo b (ordem Haemosporida). Apenas uma amostra referente ao gene citocromo b (arara 17) foi sequenciada e realizada a análise dos alinhamentos e inferência filogenética, demonstrando positividade para *Plasmodium* intimamente relacionado a linhagem *nucleophilum*, não registrada até o momento na espécie *Ara ararauna*. Quanto aos resultados dos hemogramas dos indivíduos positivos, duas aves apresentaram alterações no hemograma. Uma (33,33%; 1/3) apresentou leucocitose, enquanto outra, desenvolveu anemia associado a leucopenia (33,33%; 1/3). Os demais parâmetros não diferiram da literatura. Os resultados salientam que as aves do CETAS/RJ estão expostas aos agentes e evidencia a importância diagnóstica antes da realocação destes indivíduos, a fim de evitar a transmissão destes patógenos e impactos à fauna.

Palavras-chave: Haemosporida, Anaplasmataceae, Psittaciformes

ABSTRACT

STOCCO, Naiara Vidal. **Hematological and Molecular Study of Infection by Haemoporphids and Anaplasmatocae Agents in blue-and-white Macaw (*Ara ararauna*) and white-lined Parrot (*Amazona aestiva*) Kept at the Wild Animal Screening Center (CETAS-RJ)**, 2021. 79f. Dissertation (Masters in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Department of Veterinary Medicine and Surgery, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Agents of the order Haemosporida and Rickettsiales are important pathogens transmitted by arthropods capable of affecting different groups of animals, including birds. The IBAMA Screening Centers house a considerable number of birds of different species, which arrive are constantly debilitated in these institutions, prone to diseases and spread of pathogens. The objective of this work was to carry out hematological evaluation, research of hemosporidia (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp.) and agents of the Anaplasmatocae family (*Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp.) in canindé macaws (*Ara ararauna*) and blue-fronted parrot (*Amazona aestiva*), sampled at the Wild Animal Screening Center in Rio de Janeiro. Blood samples were collected from 44 birds kept in this institution, being 19 birds of the *Ara ararauna* species (canindé macaw) and 25 individuals of the *Amazona aestiva* species (blue-fronted parrot). Diagnostic methods were performed to assess the hematological profile of these individuals and detect the presence of such etiological agents, through molecular techniques, direct detection in blood smears and genetic sequencing. Only macaws (*Ara ararauna*) were positive for the agents surveyed. In the evaluation of blood smears stained by Giemsa, structures compatible with hemoparasites were found in 2 (4.54%; 2/44) birds, suggestive of *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. In molecular diagnosis, 6.81% (3/44) of the individuals tested were positive. One (2.27%; 1/44) macaw was positive for the 16SrRNA gene (family Anaplasmatocae), and two (4.54%; 2/44) were positive for the cytochrome b gene (order Haemosporida). Only one sample related to the cytochrome b gene (macaw 17) was sequenced and analyzes of alignments and phylogenetic inference were performed, demonstrating positivity for *Plasmodium* closely related to the *nucleophilum* lineage, not recorded so far in the *Ara ararauna* species. As for the results of the blood counts of the positive individuals, two birds showed changes in the blood count. One (33.33%; 1/3) had leukocytosis, while another developed anemia associated with leukopenia (33.33%; 1/3). The other parameters did not differ from the literature. The results emphasize that the birds of CETAS/RJ are exposed to the agents and evidence the importance of diagnosis before the relocation of these individuals, in order to avoid the transmission of these pathogens and impacts to the fauna.

Keywords: Haemosporida, Anaplasmatocae, Psittaciformes

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores nas reações de PCR e nested PCR. Controle da extração de DNA (gene endógeno) e detecção molecular de *Plasmodium* spp. /*Haemoproteus* spp. (citocromo b), família Anaplasmataceae (16SrRNA) e *Anaplasma* spp (gene rrs).....21
- Tabela 2.** Identificação das aves positivas, indicando a espécie acometida e a positividade/negatividade para os testes realizados no estudo. 28
- Tabela 3.** Análise Estatística Descritiva dos parâmetros hematológicos das araras-canindé (*Ara ararauna*) negativas e positivas. LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro... .. 29
- Tabela 4.** Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de Aves (*Ara ararauna*) positivas para *Plasmodium/ Haemoproteus* e/ou agente da família Anaplasmataceae. 300
- Tabela 5.** Análise Estatística Descritiva dos valores do Hemograma de *Amazona aestiva* LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 2021..... 311

CAPITULO I

- Tabela 1.** Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e condições de termociclagem utilizadas nas reações de PCR e nested PCR e detecção molecular de *Plasmodium* spp. /*Haemoproteus* spp. (citocromo b), e família Anaplasmataceae (16SrRNA).....39
- Tabela 2.** Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de Aves (*Ara ararauna*) positivas para *Plasmodium/ Haemoproteus* e/ou agente da família Anaplasmataceae.....43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (A): Bico de arara-canindé. Formato característico da ordem Psittaciformes, apresentando a extremidade superior arqueada e base larga. (B): Ilustração do pé zigodáctilo de Psittaciformes com o segundo e terceiro dedo voltado para frente e o primeiro e quarto para trás. O dedo 1 é medial e o dedo 4, lateral. Fonte: Modificada de Grespan; Raso (2014)..... 3
- Figura 2.** Ciclo de vida do parasito do gênero *Plasmodium* spp. que infectam aves. Painel direito, representando o ciclo no hospedeiro vertebrado. Painel esquerdo, ciclo no hospedeiro invertebrado. Fonte: modificado de Vanstreels; Parsons (2014)..... 100
- Figura 3.** Representação esquemática sobre avaliação da condição corporal através do sistema de pontuação da musculatura peitoral com relação sua projeção a quilha (escore 1 a 5). Fonte: Grespan; Raso (2014)..... 188
- Figura 4.** Aferição de temperatura em papagaio-verdadeiro, durante exame clínico, CETAS – Seropédica – RJ. 19
- Figura 5.** (A): Colheita de sangue em Papagaio-verdadeiro. (B): Colheita de sangue em Arara-canindé. Ambos, via acesso veia jugular direita, CETAS – Seropédica – RJ..... 19
- Figura 6.** Câmara de Neubauer: retículo de eritrócitos (quadrante central), destacado em vermelho a região de contagem de eritrócitos; Quadrantes laterais, destacado em azul, região de contagem de leucócitos. LABVET, Seropédica, 2021..... 200
- Figura 7.** Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de meronte (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*). (Corante Giemsa, 1000x). 25
- Figura 8.** Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de gametócito (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp./ *Haemoproteus* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*). (Corante Giemsa, 1000x)..... 266
- Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 410 pb, na PCR para agentes da família Anaplasmataceae (gene 16SrRNA). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaleta 1 e 2: controles positivos (410 pb); Canaleta 25: controle negativo; Canaleta 20: amostra positiva. 266
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 516 pb, na PCR para *Anaplasma* spp. (gene rrs). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaleta 1, 2 e 3: controles positivos (516 pb); Canaleta 29: controle negativo. 277
- Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, de amostras de aves espécie *Ara ararauna* (arara-canindé), evidenciando bandas na altura de 480 pb, na PCR para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. (gene citocromo B). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Techonologies®); Canaleta 1 e 2: controle positivo; Canaleta 22: controle negativo; Canaletas 12 e 19: amostras positivas. 277

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, de amostras de aves espécie *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro), evidenciando bandas na altura de 480 pb, na PCR para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. (gene citocromo B). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaleta 1 e 2: controle positivo; Canaleta 28: controle negativo; algumas canaletas com formação de bandas fracas na altura do controle positivo..... 288

Figura 13. Posição filogenética de sequências de *Plasmodium* spp. detectadas em espécies de aves, com base no gene mitocondrial citocromo b. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, modelo Kimura-3-parâmetros. As espécies de aves acometidas estão descritas após as espécies dos agentes sequenciados e os números de acesso do GenBank das estão fornecidos entre parênteses. A linhagem apresentada neste trabalho está destacada em vermelho..... 322

CAPÍTULO I

Figura 1. Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de meronte (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*). (Corante Giemsa, 1000x). 400

Figura 2. Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de gametócito (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*). (Corante Giemsa, 1000x)..... 411

Figura 3. Posição filogenética de sequências de *Plasmodium* spp. detectadas em espécies de aves, com base no gene mitocondrial citocromo b. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, modelo Kimura-3-parâmetros. As espécies de aves acometidas estão descritas após as espécies dos agentes sequenciados. Os números de acesso do GenBank estão fornecidos entre parênteses. A linhagem apresentada neste trabalho está destacada em vermelho.....42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Centros de Triagens do IBAMA	2
2.2 Psittaciformes.....	2
2.3 Coleta e Processamento das Amostras Sanguíneas.....	3
2.4 Interpretação das Análises Laboratoriais.....	4
2.5 Hemosporídeos Aviários	6
2.5.1 Gênero <i>Plasmodium</i> spp.....	7
2.5.2 Gênero <i>Haemoproteus</i> spp.	8
2.5.3 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp. e <i>Haemoproteus</i> spp.	9
2.5.4 Patogenia	11
2.5.5 Alterações laboratoriais e métodos diagnósticos dos hemosporídeos.....	12
2.5.6 Diagnóstico molecular.....	14
2.6 Infecções por Agentes da Família Anaplasmataceae	14
2.6.1 Agentes Anaplasmataceae em aves silvestres	15
2.6.2 Diagnóstico	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Autorização para Pesquisa com Animais Silvestres	18
3.2 Animais.....	18
3.3 Exame Clínico das Aves.....	18
3.4 Colheita de Sangue.....	19
3.6 Extração de DNA	20
3.7 PCR Convencional.....	21
3.7.1 Reações de amplificação para Hemosporídeos baseado no gene citocromo b.....	22
3.7.2 Reações de amplificação para Família Anaplasmataceae baseado no gene 16SrRNA...	22
3.7.3 Reações de amplificação para <i>Anaplasma</i> spp. gene rrs	22
3.7.4 Controle de qualidade das reações	22
3.7.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose	23
3.7.6 Sequenciamento de nucleotídeos	23
3.7.7 Análise das sequências e construção da árvore filogenética	23
3.8 Análise Estatística.....	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Avaliação dos Esfregaços Sanguíneos	25

4.2 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)	26
4.3 Análise Hematológica das Araras-canindé.....	28
4.4 Análise Hematológica de Papagaios-verdadeiros.....	30
4.4 Análise das Sequências	31
4.5 Árvore Filogenética.....	31
CAPÍTULO I.....	33
5 ESTUDO HEMATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR <i>Plasmodium</i> spp. E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE EM ARARAS-CANINDÉ (<i>Ararauna</i>) DO CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES (CETAS-RJ)	33
5.1 RESUMO.....	34
5.2 ABSTRACT	35
5.3 INTRODUÇÃO	36
5.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.4.1 Animais e local de coleta.....	36
5.4.2 Exame clínico das aves e colheita das amostras	37
5.4.3 Hemograma.....	37
5.4.4 Análise molecular.....	37
5.4.4.1 Extração de DNA	37
5.4.4.2 Ensaio cPCR e nPCR	38
5.4.4.3 Análises filogenéticas	39
5.5 RESULTADOS.....	39
5.5.1 Esfregaço sanguíneo.....	39
5.5.2 Ensaio de PCR (Agentes Anaplasmataceae e Hemosporídeos), BLAST e análises filogenéticas.....	41
5.5.3 Análises hematológicas	42
5.6 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES GERAIS	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXOS.....	63
A.....	63
B.....	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

Entender o curso das doenças em animais, detectar os agentes que os acometem, compreender as interações parasito-hospedeiro, não são atribuições simples, sobretudo, quando envolvem espécies silvestres, uma vez que ainda seja um cenário pouco explorado, de difícil acesso e burocrático. Entretanto, pesquisadores que decidiram demandar sua linha de pesquisa para e com tais espécies, tem encontrado resultados satisfatórios e inovadores.

As aves ainda são uma classe pouco estudada a respeito de alguns agentes etiológicos que as afligem, como aqueles pertencentes a ordem Haemosporida e Ricktsiales. Apesar de nos últimos anos terem aumentado estudos a respeito destes patógenos, ainda são considerados pouco explorados nesta classe, dado a diversidade de espécies de aves existentes e de linhagem destes agentes que sequer foram descritas.

Os Centros de Triagens do IBAMA, albergam considerável número de aves de diversas espécies. Estes indivíduos advêm de apreensão do tráfico, ou criação ilegal e chegam constantemente debilitados nestas instituições governamentais, estando propensos a doenças, demonstrando a relevância de realizar métodos diagnósticos a fim de diagnosticar e evitar transmissão de potenciais patógenos, dado o papel dos centros de triagens, de realocação destes indivíduos para ambientes de cativeiro ou reintrodução à natureza.

No Brasil, estudos detectaram o DNA dos patógenos *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em diversas espécies e em aves carnívoras e gansos. Através da filogenia apontaram agentes próximos da espécie *Ehrlichia chaffeensis* e *Anaplasma phagocytophilum*. Estes agentes são alfa-proteobactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias, transmitidas por vetores invertebrados, principalmente carrapatos, capazes de infectar várias células de seus hospedeiros, causando doenças nos animais e no homem, apresentando problemas de saúde pública, dado seu relevante potencial zoonótico.

Outro grupo muito importante e de distribuição cosmopolita é a Ordem Haemosporida, cujos agentes são transmitidos por dípteros hematófagos e podem acometer diversos animais, como anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Estudos com hemosporídeos em hospedeiros aviários passaram a ter relevância após a descoberta da similaridade destes parasitos com os agentes da malária humana. Estes agentes possuem importância epidemiológica, podendo acarretar grandes prejuízos econômicos, causando sérios agravos a saúde, incluindo até a morte do hospedeiro.

As transmissões destas patologias estão intimamente ligadas a vetores invertebrados, denotando a importância de compreender o papel desses vetores na disseminação de tais patógenos.

Identificar novas linhagens, entender o curso dessas afecções e sua relação parasito-hospedeiro, são fundamentais para evitar impactos consideráveis a essas populações, sendo capazes de acarretar até mesmo extinção de algumas espécies susceptíveis.

O objetivo do presente estudo foi realizar avaliação hematológica, pesquisa de hemosporídeos e agentes da família Anaplasmataceae em araras-canindé (*Ara ararauna*) e Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), através de observação direta em microscopia de luz, biologia molecular e, análises filogenéticas deste grupo de aves amostrados do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), Seropédica-RJ.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Centros de Triagens do IBAMA

No Brasil não é permitido a criação de espécies silvestres nativas em cativeiro. O Art. 1º determina que os animais de quaisquer espécies, em qualquer fase do seu desenvolvimento e que vivam naturalmente fora do cativeiro, constituindo a fauna silvestre, bem como seus ninhos, abrigos e criadouros naturais são propriedades do Estado, sendo proibida a sua utilização, perseguição, destruição, caça ou apanha (LEI N° 5.197, 1967), salvo os animais que são adquiridos em criatórios comercialmente reconhecidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Contudo devido ao alto valor de espécies silvestres legalizadas, seus detentores tendem a explorar meios alternativos de adquirirem esses indivíduos, favorecendo o tráfico de animais silvestres. Desse modo, o tráfico, posse ou comércio de animais silvestres não autorizados pelo estado é considerado crime ambiental, cabível de pena e/ou multa (LEI N° 9.605, 1998).

Os Centros de Triagens de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS), são unidades responsáveis pelo manejo de fauna silvestre com a finalidade de prestar serviço de recepção, identificação, marcação, triagem, avaliação, recuperação, reabilitação e destinação de animais silvestres provenientes de ação fiscalizatória, resgate ou entrega voluntária de particulares e, devolvê-los à natureza quando aptos, além de realizar e subsidiar pesquisas científicas, ensino e extensão (IN. N°23, 2014).

Os animais recebidos no CETAS, a depender de suas condições, poderão passar por procedimentos visando a reabilitação que poderá ser efetuada integralmente nos CETAS, ou ainda, por meio da utilização de estruturas existentes em Áreas de Soltura de Animais Silvestres (Asas) cadastradas. Estas propriedades são cadastradas pelo IBAMA, ou por órgão/entidade competentes, para fins de realização de soltura de animais (IN. N°23, 2014).

2.2 Psittaciformes

A ordem Psittaciformes é classificada em três famílias, Loridae, Cacatuidae e Psittacidae, que engloba os lóris, cacatuas, calopsitas, araras, papagaios, maritacas e periquitos (SICK, 1997; HARCOURT-BROWN, 2010).

As aves dessa ordem possuem distribuição cosmopolita, sobretudo nos neotrópicos (GRESPLAN; RASO, 2014), no qual, o maior número de espécies concentra-se na América do Sul e Austrália (FORSHAW, 2010).

São caracterizadas por apresentarem grande diversidade de tamanhos, formas e cores, e são facilmente reconhecidas por suas características anatômicas (FORSHAW, 2010; HARCOURT-BROWN, 2010), cujo bico apresenta a extremidade superior arqueada, de base larga (figura 1) que se encaixa sobre o bico inferior. A camada externa do bico possui uma dura queratina, chamada ranfoteca, que recobre uma estrutura de base óssea. Os pés são zigodáctilos (dois dedos voltados para frente e dois para trás) e o tarso-metatarso é curto. Estas particularidades fazem com que estas aves sejam excelentes escaladoras e tenham grande destreza na manipulação de alimentos (COLLAR, 1997).

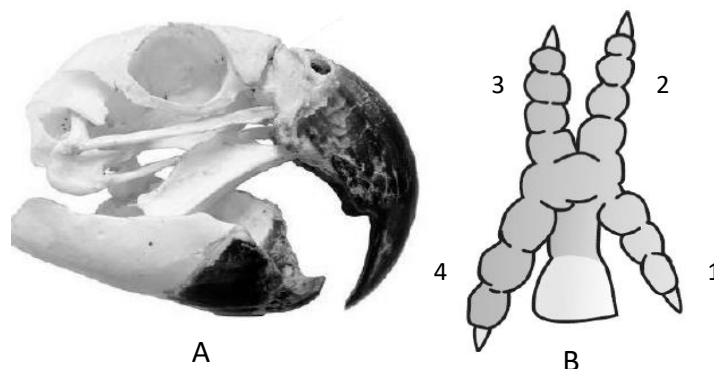


Figura 1. (A): Bico de arara-canindé. Formato característico da ordem Psittaciformes, apresentando a extremidade superior arqueada e base larga. (B): Ilustração do pé zigodáctilo de Psittaciformes com o segundo e terceiro dedo voltado para frente e o primeiro e quarto para trás. O dedo 1 é medial e o dedo 4, lateral. Fonte: Modificada de Grespan; Raso (2014).

Os Psitacídeos estão entre as principais ordens envolvidas no comércio ilegal de animais selvagens, por apresentarem natureza sociável, inteligência, coloração exuberante e capacidade de imitar sons. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) as aves representam 82% dos animais apreendidos, no qual, aproximadamente 4% são psitacídeos (RENCTAS, 2002). Devido suas características, estão entre os principais grupos criados como animais de estimação no mundo, ficando atrás apenas dos cães e gatos (RENCTAS, 2002; MACHADO et al., 2008; GRESPLAN; RASO, 2014; IUCN, 2020).

Na América do sul existem cerca de 147 espécies de psitacídeos, das quais, 87 ocorrem no Brasil, sendo considerado um dos países com maior diversidade dessa ordem (CBRO, 2015; IUCN, 2021).

Dentre as 87 espécies atualmente conhecidas no Brasil, as araras-canindé (*Ara ararauna*) e papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) encontram-se neste grupo, e estão classificadas na ordem Psittaciformes, família Psittacidae. As araras-canindé medem cerca de 80 cm, possui cauda longa, coloração azul no dorso e amarelo-dourado desde a face, ventre até o rabo. Ocorre de Amazonas ao Paraná. Além do Brasil, é encontrada também, no leste do Panamá e norte da Colômbia, Venezuela, Guianas, Peru, Bolívia, até o norte da Argentina, Paraguai e no oeste do Equador (SICK, 2001). Os papagaios-verdadeiros medem cerca de 35cm, são variáveis do padrão da coloração da cabeça, com amarelo na região ocular e azul na coroa anterior. A coloração do ombro varia do amarelo ao avermelhado e possuem o espéculo da asa vermelho. São encontrados em florestas úmidas ou secas, bosques de palmeiras ou margens de rios, caatinga e em áreas urbanas arborizadas (PERLO, 2009).

2.3 Coleta e Processamento das Amostras Sanguíneas

Na medicina de animais selvagens, os exames laboratoriais são indicados como apoio para diagnóstico, monitoramento e prevenção de doenças. Contudo, podem ser empregados também, como biomarcadores de impacto ambiental, uma vez que, o meio ambiente influencia a vida dos seres que com este interagem (ALMOSNY, 2014).

O exame laboratorial inicia-se na contenção e coleta, que por sua vez, deve ser realizada de maneira adequada e cuidadosa, respeitando as particularidades de cada espécie (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007). O volume adequado de sangue varia de acordo com o tamanho e estado de saúde da ave, sendo recomendada a coleta de 1% do peso vivo do animal, desde que estes estejam hígidos (CAMPBELL, 2014).

As principais veias utilizadas para a punção são a jugular (preferencialmente a direita, pois ela pode ser a única presente ou a de maior calibre), basílica (ulnar cutânea, da asa ou braquial) e a metatársica medial (tibial caudal) (CAMPBELL, 2014).

Amostras sanguíneas podem ser colhidas em seringas, tubos capilares ou microtubos, e as agulhas devem apresentar o calibre entre 23 a 27 mm, conforme o porte da ave. A sucção deve ser leve, pois, as veias podem colabar-se facilmente. Em aves de pequeno porte, poucas gotas de sangue podem ser colhidas, sendo necessário a utilização do tubo capilar (SANTOS; CUBAS, 2014).

O anticoagulante indicado é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pois possibilita a coloração adequada das células e não tende a agrupar leucócitos. Certos grupos aviários, como corvos, gralhas e alguns passeriformes, necessitam a utilização da heparina, pois o EDTA pode ocasionar anticoagulação incompleta ou hemólise parcial (CAMPBELL, 2014).

As aves assim como os répteis, anfíbios e peixes possuem eritrócitos nucleados de formato ovalado. Os eritrócitos maduros das aves em geral são maiores do que os de mamíferos, mas menores do que os de répteis (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007).

O hemograma não deve ser realizado em contadores automáticos, tendo em vista a dificuldade dos equipamentos em diferenciarem eritrócitos, trombócitos e leucócitos, pela presença de núcleo nos três tipos celulares. Dessa forma, o processamento das amostras é predominantemente manual (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007).

As provas laboratoriais que compõem o hemograma nas aves são: contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer com diluente Natt & Herrick. A diluição para realização da hematimetria é 1:100 e a contagem é efetuada em aumento de 400x, uma vez que é necessário diferenciar as células durante o processo. Utiliza-se o retículo de eritrócitos (na câmara) para contagem de todas as células, cujos leucócitos e trombócitos são contados nos 25 quadrados, obtendo um valor que será multiplicado pelo fator 1.000. Os eritrócitos são mensurados apenas em cinco quadrados do retículo, utilizando o fator de multiplicação de 5.000. Os leucócitos também podem ser contados nos quadrantes laterais (retículos de leucócitos), como nos mamíferos, porém o fator de multiplicação nesse caso será de 250 (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007; SCHMIDT, 2014).

A confecção do esfregaço sanguíneo também é uma etapa importante na realização do hemograma e, recomenda-se que seja realizado antes que o material sanguíneo entre em contato com o anticoagulante, ou seja, sem o EDTA. Essa técnica permite a realização da contagem diferencial de leucócitos por microscopia de luz, observação morfológica das células e a pesquisa de hemoparasitos com menor interferência (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007).

O hematócrito é determinado pelo método de centrifugação do capilar sanguíneo, em rotação de 10.000 a 12.000 rpm durante 5 minutos (CLARK et al., 2009). A concentração de hemoglobina é avaliada utilizando-se kits comerciais (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007) e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) são calculados considerando os valores do hematócrito, hemoglobina e contagem de hemácias (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007).

2.4 Interpretação das Análises Laboratoriais

O hemograma é o principal exame laboratorial de triagem e, portanto, o primeiro a ser solicitado. Sua análise auxilia na informação do estado geral do animal, para elucidar uma

suspeita clínica e direcionar o médico veterinário à solicitação de outros exames complementares. A avaliação hematológica é composta pelo eritrograma, leucograma e trombograma e visa detectar e dimensionar condições como anemia, doenças inflamatórias, parasitemias, disfunções hemostáticas e distúrbios hematopoiéticos (CAMPBELL; ALMOSNY, 2014).

A determinação do hematócrito, concentração de hemoglobina e a contagem de eritrócitos auxiliam no diagnóstico da anemia e a avaliação da sua intensidade (TVEDTEN, 2009; THRALL, 2012).

As anemias em aves têm causas semelhantes às demais espécies. As anemias podem ser etiologicamente classificadas como hemolítica, hemorrágica, hipoplásica e aplásica por depressão da medula óssea. As anemias hemorrágicas geralmente estão relacionadas a lesões traumáticas ou a parasitos hematófagos, no entanto, outras causas, como coagulopatias ou lesões ulcerativas, também devem ser consideradas. Anemia hemolítica, pode ser decorrente de reações imunomediadas ou parasitemias, sepses ou intoxicações. Os parasitos mais comumente associados à anemia hemolítica em aves pertencem ao gênero *Plasmodium* spp. A anemia por depressão da medula óssea pode estar relacionada a doenças inflamatórias crônicas, especialmente aquelas envolvendo agentes infecciosos (tuberculose, aspergilose e clamidiose), ou doenças hepáticas, renais crônicas e o hipotireoidismo (CAMPBELL, 2014).

Outras condições podem ser dimensionadas pelo leucograma, pois os leucócitos são células responsáveis pela defesa do organismo. A contagem total de leucócitos pode apresentar-se normal, aumentada (leucocitose) ou reduzida (leucopenia). As leucocitoses podem estar associadas a redistribuição intravascular, devido ao estresse e isso pode interferir na análise do leucograma, ou por causas inflamatórias, podendo ser infecciosas ou não. A leucopenia, pode ocorrer em doenças inflamatórias superagudas, devido à rápida mobilização de heterófilos para os órgãos alvo (CAMPBELL, 2014).

Os tipos de leucócitos presentes no sangue periférico das aves são heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos. As aves apresentam ligeira variação morfológica entre os tipos de leucócitos, além de diferenças nos valores numéricos dessas células, intra e interespecies (SCHMIDT, 2014).

Os heterófilos são as células mais comuns no sangue das aves. Sua função é similar aos neutrófilos dos mamíferos, participam ativamente em reações inflamatórias, atuando como fagócitos. Apresentam grânulos eosinofílicos alongados que podem ser ovais ou arredondados no interior do citoplasma e núcleo lobulado com aspecto grosseiro (ALMOSNY e MONTEIRO, 2007; CAMPBELL, 2014).

Os eosinófilos apresentam o mesmo tamanho dos heterófilos, também possuem grânulos eosinofílicos, porém esses grânulos são arredondados e coram-se de maneira mais intensa, quando comparados aos heterófilos. Em aves, costumam estar relacionados a processos alérgicos e parasitários (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007; CAMPBELL, 2014).

Os basófilos tendem a ser menores que os heterófilos e os eosinófilos, possuem grânulos metacromáticos que em geral obscurecem o núcleo. Assemelham-se morfológicamente aos mastócitos de mamíferos. Sua função é pouco conhecida, porém, acredita-se estar associado a reações inflamatórias agudas e reações de hipersensibilidade do tipo IV. Apresentam histamina nos grânulos citoplasmáticos, assim como os mastócitos (CAMPBELL, 2014).

Os linfócitos das aves são semelhantes aos dos mamíferos, possuindo núcleo arredondado e pouco citoplasma, porém, tendem a apresentar irregularidades citoplasmáticas ao moldarem-se ao redor de células adjacentes. Podem ser classificados de acordo com o tamanho (pequenos, médios e grandes). Linfócitos grandes podem ser vistos no sangue de aves normais, contudo, podem ser confundidos com monócitos, pelo seu tamanho e volume citoplasmático (CAMPBELL, 2014). As linfocitoses estão associadas a afecções virais ou nas fases de resolução de infecções bacterianas. As linfopenias podem estar associadas a fase aguda

da inflamação, assim como, ao uso de corticosteroides, que determinam grave linfopenia, sendo observado também em casos de estresse prolongado, que eleva os níveis endógenos (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007).

Monócitos, as maiores células sanguíneas na circulação das aves, são morfologicamente semelhantes à dos mamíferos e podem apresentar formato arredondado a ameboides e citoplasma abundante, azul-acinzentado podendo apresentar vacúolos e grânulos. Exibem atividade fagocítica e migram para os tecidos para se diferenciarem em macrófagos. Estão envolvidos na inflamação e na destruição oxidativa de microrganismos invasores e desempenham também importante papel imunológico no processamento de apresentação de antígenos. A monocitose normalmente está relacionada a afecções crônicas, doenças infecciosas específicas e necroses, principalmente quando extensas, além de ser observada também em casos de neoplasias (DIETERIEN-LIEVRE, 1988; ALMOSNY; MONTEIRO, 2007; CAMPBELL, 2014).

2.5 Hemosporídeos Aviários

Os Hemosporídeos são um grupo cosmopolita de protistas, incluídos no Filo Apicomplexa, Ordem Haemosporida, na qual fazem parte as famílias Haemoproteidae, Garniidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae e dentre estas, os gêneros *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia* possuem mais de duas centenas de espécies capazes de infectar aves, embora este número esteja em constante rearranjo taxonômico e novas espécies sejam descritas frequentemente (VALKIŪNAS, 2005; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

Classificação taxonômica, segundo Valkiūnas (2005):

Reino: Protista (Haeckel, 1866)

Filo: Apicomplexa (Levine, 1970)

Classe: Coccidea (Leuckart, 1879)

Subclasse: Coccidia (Leuckart, 1879)

Ordem: Haemosporida (Danilewsky, 1885)

Família: Haemoproteidae (Doflein, 1916)

Gênero: *Haemoproteus* (Kruse, 1890)

Família: Plasmodiidae (Mesnil, 1903)

Gênero: *Plasmodium* (Marchiafava e Celli, 1885)

Família: Leucocytozoidae (Fallis e Bennett, 1961)

Gênero: *Leucocytozoon* (Berestneff, 1904)

Família: Garniidae (Lainson, Landau e Shaw, 1971)

Gênero: *Fallisia* (Lainson, Landau e Shaw, 1974)

Danilewsky (1886) descobriu e descreveu detalhes morfológicos sobre parasitos intraeritrocíticos em aves, reptéis e anfíbios, notando semelhanças entre os parasitos aviários e os parasitos da malária humana. Logo, foi responsável por identificar três dos principais gêneros de parasitos intraeritrocíticos em aves, atualmente conhecidos como *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. e *Leucocytozoon* spp. (COX, 2010).

Quadro 1: Comparativo dos gêneros de Hemosporídeos aviários

	<i>Haemoproteus</i> spp. (Pseudomalária)	<i>Plasmodium</i> spp. (Malária aviária)	<i>Leucocytozoon</i> spp. (Leucocitozoonose)
Espécies que acometem aves	132	38	32
Ordens de aves acometidas	19	20	18
Hospedeiro invertebrado	Ceratopogonidae, Hippoboscidae	Culicidae	Ceratopogonidae, Simuliidae
Capacidade de alternar hospedeiros vertebrados	Baixa	Elevada	Intermediária
Patogenicidade	Baixa	Elevada	Intermediária

Fonte: modificado de Vanstreels e Parsons (2014).

2.5.1 Gênero *Plasmodium* spp.

O gênero *Plasmodium* spp. além de acometer as aves, parasitam répteis, seres humanos e outros mamíferos, apresentam uma grande flexibilidade em alternar espécies de hospedeiros (VANSTREELS; PARSONS, 2014). Contudo, as espécies de *Plasmodium* spp. que parasitam aves são mais próximas filogeneticamente às espécies de *Haemoproteus* spp. do que às espécies de *Plasmodium* spp. de mamíferos (PÉREZ-TRIS et al., 2005).

Os plasmódios que infectam aves são divididos em cinco subgêneros (*Haemamoeba* – 10 spp., *Giovannolaia* – 15 spp., *Novyella* – 9 spp., *Huffia* – 3 spp., *Bennettinia* – 1 spp.) (VALKIUNAS, 2005):

Subgênero *Haemamoeba* (Grassi e Feletti, 1890)

P. relictum (Grassi and Feletti, 1891)

P. cathemerium (Hartman, 1927)

P. matutinum (Huff, 1937)

P. gallinaceum (Brumpt, 1935)

P. giovannolai (Corradetti, Verolini e Neri, 1963)

P. lutzii (Lucena, 1939)

P. subpraecox (Grassi e Feletti, 1892)

P. griffithsi (Garnham, 1966)

P. tejerai (Gabaldon e Ulloa, 1977)

P. coturnixi (Bano e Abbasi, 1983)

Subgênero *Giovannolaia* (Corradetti, Garnham e Laird, 1963)

P. lophurae (Coggeshall, 1938)

P. circumflexum (Kikuth, 1931)

P. polare (Manwell, 1934)

P. gundersi (Bray, 1962)

P. octamerium (Manwell, 1968)

P. pinottii (Muniz e Soares, 1954)

P. pedioecetae (Shillinger, 1942)

P. formosanum (Manwell, 1962)

P. durae (Herman, 1941)

P. hegneri (Manwell e Kuntz, 1966)

P. anasum (Manwell e Kuntz, 1965)

P. leanucleus (Huang, 1991)
P. fallax (Schwetz, 1930)
P. garnhami (Guindy, Hoogstraal e Mohammed, 1965)
P. gabaldoni (Garnham, 1977)

Subgênero *Novyella* (Corradetti, Garnham e Laird, 1963)
P. vauhani (Novy e MacNeal, 1904)
P. rouxi (Sergent, Sergent e Catanei, 1928)
P. hexamerium (Huff, 1935)
P. nucleophilum (Manwell, 1935)
P. dissanaikai (Jong, 1971)
P. bertii (Gabaldon e Ulloa, 1981)
P. columbae (Carini, 1912)
P. paranucleophilum (Manwell e Sessler, 1971)
P. kempii (Christensen, Barnes e Rowley, 1983)

Subgênero *Huffia* (Corradetti, Garnham e Laird, 1963)
P. elongatum (Huff, 1930)
P. hermani (Telford e Forrester, 1975)
P. huffi (Muniz, Soares e Batista, 1951)

Subgênero *Bennettini* (Valkiunas, 1997)
P. juxtannucleare (Versiani e Gomes, 1941)

Dentre esses subgêneros, atualmente cinco espécies de *Plasmodium* spp. já foram descritas parasitando a ordem Psittaciformes: *P. relictum*, (subgênero *Haemamoeba*); *P. circumflexum*, (*Giovannolaia*); *P. vauhani*, *P. nucleophilum* e *P. dissanaikai*, presentes no Subgênero *Novyella* (VALKIUNAS, 2005).

Plasmodium spp. já foi relatado em praticamente todos os continentes, exceto na Antártida (GARNHAM, 1966). São identificados em regiões que favoreçam condições ideais ao hospedeiro invertebrado, os dípteros da família Culicidae, sendo a temperatura o principal fator limitante. Dessa forma, nas regiões áridas, salinas, com baixas temperaturas e de elevada altitude encontra-se baixa prevalência ou até mesmo ausência deste parasito (BENNETT et al., 1993; VALERA et al., 2003). Contudo, essa infecção depende também do hospedeiro vertebrado, cuja resposta imune é o principal limitante para desenvolvimento do agente (VANSTREELS; PARSONS, 2014). Diante desse fato, a reintrodução de espécies ameaçadas à natureza é altamente complexa, devido à transmissão ativa de espécies patogênicas (VALKIUNAS, 2005).

No Brasil a Instrução Normativa nº 179, de 25 de junho de 2008 do IBAMA, não prevê exames moleculares negativos para malária aviária, apenas estabelece resultados negativos na pesquisa de hemoparasitos em geral, via esfregaço sanguíneo. Entretanto, a detecção do *Plasmodium* spp. em microscopia, pode ser limitada pela baixa parasitemia (VALKIUNAS, 2005), predispondo falsos resultados negativos, pela sua baixa sensibilidade, favorecendo a disseminação do agente à outras aves.

2.5.2 Gênero *Haemoproteus* spp.

O gênero *Haemoproteus* foi caracterizado pela primeira vez por Kruse (1890), que descreveu as três primeiras espécies desse gênero, *H. columbae* (espécie-tipo), *H. danilewskii* e *H. passeris*, sendo as duas primeiras em Columbiformes e a última em Passeriformes. São amplamente distribuídos, assim como seus vetores, insetos dípteros hematófagos, que são observados parasitando aves em diferentes regiões do mundo (DURRANT et al., 2006; BEADELL et al., 2009; CARLSON et al., 2013; BARRIENTOS et al., 2014; VALKIŪNAS et al. 2014; ZHANG et al., 2014).

O gênero *Haemoproteus* é conhecido por possuir grande variedade de espécies, baixa patogenicidade e alta prevalência, acometendo diversas aves selvagens (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008). O gênero é dividido em dois subgêneros: *Haemoproteus* e *Parahaemoproteus* (BENNETT et al., 1965). Os parasitos foram separados nestes subgêneros de acordo com seus vetores. O subgênero *Haemoproteus* é transmitido por moscas da família Hippoboscidae, este subgênero apresenta menor número de espécies (8 espécies), acometendo aves da ordem Columbiformes (pombos e rolinhas) e algumas aves marinhas (Pelecaniformes e Charadriiformes). O subgênero *Parahaemoproteus* são transmitidos por mosquitos da família Ceratopogonidae, são os mais numerosos em espécies (137 espécies) responsáveis por infectar as demais ordens de aves, com exceção da ordem Columbiformes (CLARK et al., 2009; KRIŽANAUSKIENĖ et al., 2013; VANSTREELS; PARSON, 2014).

2.5.3 Ciclo biológico de *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.

Os hemosporídeos são protozoários obrigatoriamente heteroxênicos, cujo ciclo de vida envolve hospedeiros vertebrados (intermediário) e invertebrados (definitivo), insetos hematófagos, dípteros da família Culicidae, Hippoboscidae e Ceratopogonidae (VALKIUNAS, 2005; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

O ciclo de biológico de *Plasmodium* inclui os seguintes estágios obrigatórios: merogonia exoeritrocítica (esquizogonia); fase eritrocítica: produção de gametócitos (infectantes para vetores) e merogonia eritrocítica; esporogonia, ocorrendo em insetos dípteros (figura 2) (GARNHAM, 1966; REMPLE, 2004; VALKIUNAS, 2005).

A fase exoeritrocítica inicia-se no momento do repasto sanguíneo do díptero infectado, onde os esporozoítos presentes nas glândulas salivares são inoculados no hospedeiro vertebrado. Nessa fase, os esporozoítos, penetram ou são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), nas quais, ocorre a merogonia exoeritrocítica primária, que consiste na geração de merontes que são chamadas de criptozoítos. Os merozoítos se desenvolvem em criptozoítos e, ainda não são capazes de infectar as células sanguíneas. Após a maturação dos criptozoítos, eles se rompem e liberam merozoítos que induzirão a segunda geração, os merontes exoeritrocíticos secundários (metacriptozoítos), que se desenvolvem em células endoteliais e mononucleares fagocíticas, frequentemente do baço, fígado, medula óssea e pulmões. Os merozoítos liberados dos metacriptozoítos poderão percorrer caminhos distintos, como retornar para o ciclo de merogonia exoeritrocitária secundária, invadindo as células sanguíneas ou percorrer a fase exoeritrocítica terciária, invadindo células endoteliais e mononucleares fagocíticas de diversos tecidos, desenvolvendo-se por reprodução assexuada os fanerozoítos (conhecidos também como merontes teciduais ou esquizontes teciduais). Esses merontes teciduais poderão permanecer por períodos prolongados nos tecidos, liberando grandes quantidades de merozoítos ao romperem-se (PARAENSE, 1944; VALKIUNAS, 2005; VANSTREELS; PARSONS, 2014; VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2017).

Os merozoítos liberados dos metacriptozoítos que penetraram os eritrócitos jovens ou maduros (ciclo eritrocítico), originarão formas chamadas de trofozoítos, que por reprodução assexuada (esquizogonia) se transformam em merontes eritrocíticos (também denominados esquizontes eritrocitários) ou desenvolvem-se por gametogonia, em macrogametócitos e

microgametócitos, formas infectantes e que serão ingeridas pelos dípteros, enquanto outra parte dos merozoítos, serão responsáveis por penetrar nas células endoteliais dos capilares de muitos tecidos incluindo o cérebro. O número de merozoítos dentro de cada meronte eritrocitário é uma das principais características na identificação dos plasmódios (PARAENSE, 1944; VALKIUNAS, 2005; PEIRCE, 2008; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

Após a ingestão pelo díptero, os gametócitos serão liberados dos eritrócitos e por ação da baixa temperatura e de fatores químicos, ocorrerá a exflagelação dos microgametas, que fusionam-se aos macrogametas, originando um zigoto (única fase sexuada do ciclo). O zigoto migra para lâmina própria da mucosa intestinal do díptero, formando oocisto, produzindo uma grande quantidade de esporozoítos por meio de reprodução assexuada (esporogonia). Após sua maturação, o oocisto rompe-se e libera os esporozoítos na hemocele para seguirem em direção às glândulas salivares do vetor, e, dessa forma, infectar o hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo de vida do parasito (VALKIUNAS, 2005; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

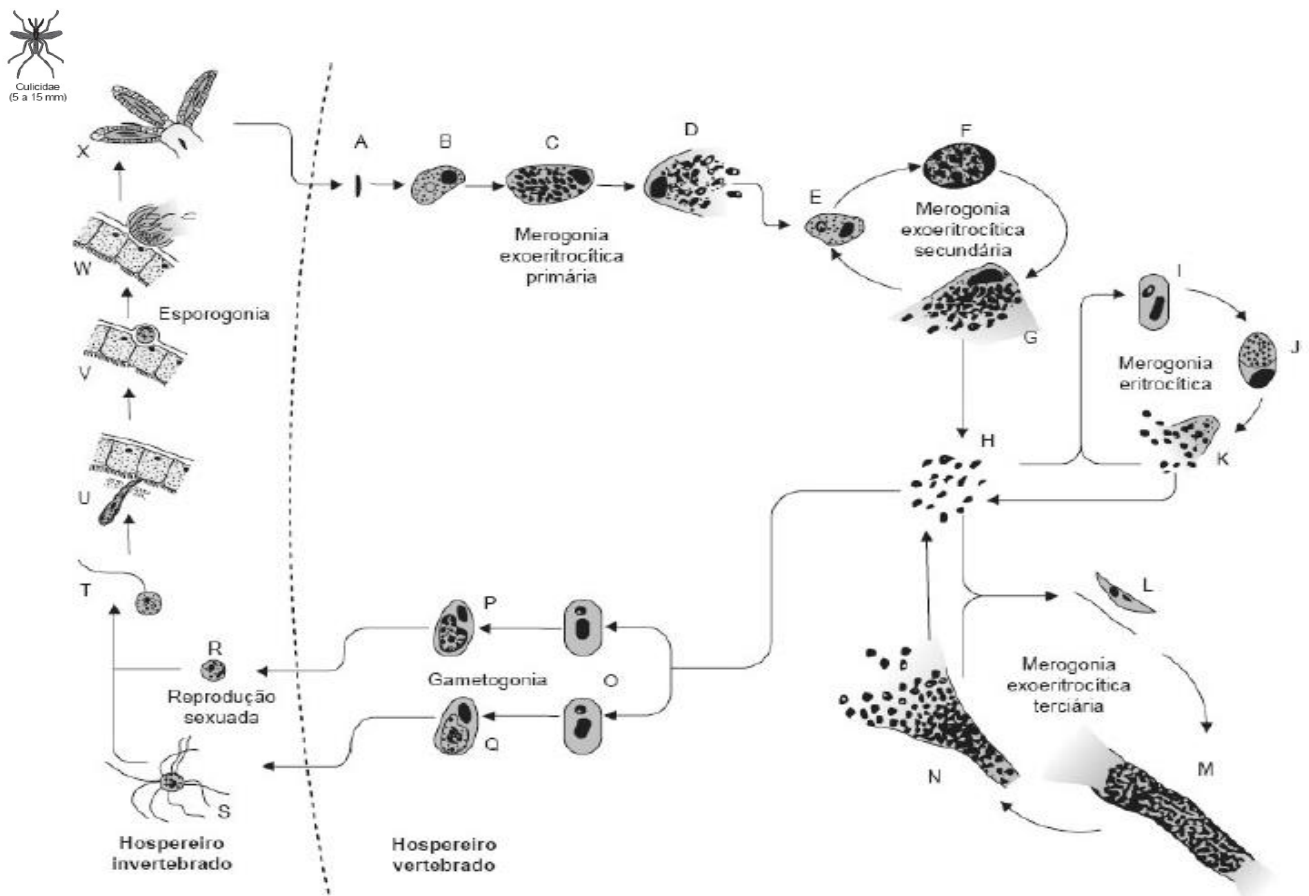


Figura 2. Ciclo de vida do parasito do gênero *Plasmodium* spp. que infectam aves. Painel direito, representando o ciclo no hospedeiro vertebrado. Painel esquerdo, ciclo no hospedeiro invertebrado. Fonte: modificado de Vanstreels; Parsons (2014).

O ciclo biológico de *Haemoproteus* spp. é semelhante ao do *Plasmodium* spp., com algumas importantes diferenças. No ciclo de vida de *Haemoproteus* spp., a merogonia exoeritrocítica ocorre nas células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos (principalmente nos músculos estriados) onde serão formados os megalomerontes (megaloesquizontes) e, diferente do ciclo do *Plasmodium* spp. não ocorre a merogonia eritrocítica. Outra diferença são os vetores, como citado anteriormente, que podem ser moscas da Família Hippoboscidae ou

mosquitos da Família Ceratopogonidae, *Culicoides* spp., conhecidos como mosquitos-pólvora (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

Diferente dos vetores de *Plasmodium* e dos *Culicoides* transmissores do subgênero *Parahaemoproteus*, as moscas hipoboscídeas, tanto o macho quanto a fêmea alimentam-se de sangue e, desta forma, são susceptíveis à infecção (VALKIŪNAS, 2005; SANTIAGO-ALARCON et al., 2012).

O ciclo se inicia quando os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do inseto são inoculados na ave e atingem as células endoteliais, desenvolvendo merontes exoeritrocíticos de primeira geração. Os merontes formam então merozoítos de formas e tamanhos variáveis, que ao romperem-se, seus merozoítos podem infectar novas células, podendo desenvolver megalomerontes, merontes teciduais excepcionalmente grandes no tecido muscular ou cardíaco e nas células endoteliais dos capilares. Os merozoítos formados neste processo podem infectar as células sanguíneas e desenvolverem os gametócitos, servindo como um mecanismo para potencializar a transmissão aos hospedeiros invertebrados durante o período sazonal favorável. Esses merozoítos de primeira geração infectam as células reticuloendoteliais do baço, formando merontes maduros no baço, onde os merozoítos serão capazes de infectar as células sanguíneas e se desenvolverem em gametócitos. As únicas formas parasitárias circulantes encontradas nas infecções por *Haemoproteus* são os gametócitos, fato que impossibilita a infecção de hospedeiros vertebrados por inoculação de sangue infectado devido à ausência de merogonia no sangue. A identificação de merontes eritrocíticos (esquizontes) são evidências de infecção por *Plasmodium* (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

2.5.4 Patogenia

No hospedeiro vertebrado o agente da malária aviária pode causar diversas alterações, cuja gravidade está relacionada ao grau de parasitemia e ao estado imunológico do hospedeiro (GARNHAM, 1966; ATKINSON, 2008). A evolução da infecção é variável de assintomática à grave, levando o hospedeiro ao óbito (ATKINSON, 2008).

O período pré-patente, antes do aparecimento das primeiras formas parasitárias sanguíneas variam entre 5 a 10 dias. A partir do surgimento das primeiras formas sanguíneas, a parasitemia cresce rapidamente alcançando a fase de crise, aproximadamente no vigésimo primeiro dia pós-infecção (6 a 12 dias após o início da parasitemia). A crise pode persistir por aproximadamente 7 dias, e então a parasitemia passa a diminuir gradativamente, alcançando os níveis crônicos de infecção. Pode ocorrer uma crise secundária no 35º dia pós-infecção, e outras poderão ocorrer posteriormente de forma esporádica, a depender das condições de estresse e do estado imunológico do hospedeiro. A cronologia da infecção foi desenvolvida em infecções experimentais de aves domésticas, desta forma, ressalta-se que em aves silvestres, o desenvolvimento cronológico poderá variar (ATKINSON; VAN RIPER, 1991; ATKINSON et al., 2001; RICKLEFS; FALLON, 2002; VALKIŪNAS, 2005).

Parasitas da malária aviária e outros hemosporídeos não causam apenas alterações sanguíneas devido ao desenvolvimento de alta parasitemia e destruição de hemácias, mas também alterações em diversos órgãos, como consequência dos danos causados pelos estágios exoeritrocíticos. Estes frequentemente se desenvolvem em células reticulo endoteliais não especializadas, sendo encontrados em diversas partes do corpo em aves susceptíveis, incluindo o cérebro, olhos, nervos, coração, músculos esqueléticos e muitos outros órgãos e tecidos (GARNHAM, 1966; VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON et al., 2008; TELFORD, 2009; VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2017).

Essas alterações, tornam-se mais acentuadas nas fases seguintes de geração de merontes, sendo a mais severa associada ao bloqueio ocasionado pelos fanerozoítos e algumas vezes,

pelos metacriptozoítos nos capilares cerebrais e de outros órgãos vitais, ocasionando anóxia tecidual, seguida de morte celular e necrose significativa. Por essa razão, algumas aves infectadas podem apresentar alterações neurológicas (AL DABAGH, 1961; VALKIUNAS, 2005). Desse modo, a malária aviária causada por algumas espécies de *Plasmodium* spp. torna-se ainda mais grave do que a malária em mamíferos, cujo desenvolvimento exoeritrocítico ocorre principalmente nas células hepáticas e geralmente não causa doença neste estágio da infecção (SHERMAN, 1998; SULLIVAN; KRISHNA, 2005).

Outras alterações ocasionadas pela malária aviária são esplenomegalia e hepatomegalia, por congestão, edema e hiper celularidade devido a infiltrados mononucleares, além do aumento da vesícula biliar, pois as formas exoeritrocíticas de *Plasmodium* spp. se concentram nesses órgãos (FOWLER; FOWLER, 2001; PARAENSE, 2004; WILLIAMS, 2005; VALKIUNAS, 2005).

A fase crônica da doença é frequentemente subclínica, visto que há redução da parasitemia, devido ao desenvolvimento de resposta imune eficaz do hospedeiro. A maioria das espécies de aves, apresentam a forma crônica da doença e, podem permanecer infectadas por toda a vida (ATKINSON; VAN RIPER, 1991, VALKIŪNAS, 2005), favorecendo a transmissão, por não apresentarem sinais clínicos evidentes.

Episódios de estresse e tratamentos com corticoides podem induzir a recrudescência em animais clinicamente curados e livres de parasitemia por longos períodos (ATKINSON; VAN RIPER, 1991; RICKLEFS; FALLON, 2002; VALKIŪNAS, 2005).

A patogenia das infecções causadas pela pseudomalária (*Haemoproteus*) muito raramente produzem lesões clinicamente importantes. O período pré-patente tende a ser mais longo, cerca de 7 a 17 dias no subgênero *Parahaemoproteus*, e 17 a 37 dias no subgênero *Haemoproteus*. As alterações predominantes são as lesões musculares, com hemorragias focais e infiltração mononuclear. Contudo, estudos de infecção experimental com diversas espécies de *Haemoproteus* não encontraram quaisquer lesões teciduais importantes, apenas discreta inflamação com infiltrados mononucleares e figuras de morte celular distribuídas espaçadamente nos órgãos acometidos, por vezes, no baço, observam-se macrófagos repletos de grânulos de hemozoína derivados da hemólise de eritrócitos parasitados. Ademais, os megalomerontes presentes nos tecidos musculares esquelético e cardíaco tendem a produzir lesões mais evidentes, com estriações hemorrágicas e/ou pálidas, semelhantes a lesões causadas por *Sarcocystis* sp. No entanto, as lesões causadas pelos megalomerontes apresentam morfologia variável e não contribuem significativamente para a identificação das espécies parasitárias, ressaltando a dificuldade de diferenciar megalomerontes de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* (ATKINSON; VAN RIPER, 1991; RICKLEFS; FALLON, 2002; VALKIŪNAS, 2005).

2.5.5 Alterações laboratoriais e métodos diagnósticos dos hemosporídeos

A ave com malária pode exibir alterações hematológicas como anemia hemolítica, leucocitose, linfocitose, hipo-albuminemia, aumento de globulinas, aumento da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e redução de creatinina (GRACZYK et al., 1995; WILLIAMS, 2005; HARR, 2006). No entanto, são alterações inespecíficas, e os exames atualmente disponíveis para diagnóstico confirmatório da malária aviária são as análises morfológicas, sorológicos e moleculares (ATKINSON et al., 2001; HELLGREN et al. 2004; VALKIŪNAS, 2005).

A avaliação de esfregaço sanguíneo em microscopia é baseada nas características morfológicas e morfométricas do parasito. Essa técnica permite a identificação do gênero desses hemoparasitos, sendo necessária a confecção correta do esfregaço sanguíneo, corado

com colorações do tipo Romanowsky e avaliado por profissional habilitado (FROMONT, 1993; CAMPBELL, 1995; PEIRCE, 2008).

A diferenciação dos gêneros *Haemoproteus* e *Plasmodium* apresentam desafios, diante de suas semelhanças morfológicas. Os *Haemoproteus* e *Plasmodium* apresentam em suas formas eritrocitárias adultas, gametócitos (para *Plasmodium* e *Haemoproteus*) e merontes eritrocitários (apenas para *Plasmodium*), grânulos de hemozoína que são refringentes à microscopia de luz, auxiliando a sua identificação (VANSTREELS; PARSONS, 2014).

A detecção individual de *Plasmodium* spp. em sangue periférico, ocorre a partir da visualização dos gametócitos, merontes e trofozoítos no interior dos eritrócitos, diferentemente do *Haemoproteus* spp., que são encontrados apenas como gametócitos no esfregaço de aves infectadas (CAMPBELL, 2014).

Algumas espécies de *Plasmodium* spp. apresentam gametócitos arredondados ou irregulares, e podem causar deslocamento acentuado do núcleo da célula hospedeira, entretanto outras espécies podem apresentar gametócitos alongados que não deslocam o núcleo da célula (SOULSBY, 1982; CAMPBELL, 2014).

Os trofozoítos de *Plasmodium* spp. são pequenos, apresentam formato ameboide arredondado a oval, podendo apresentar um grande vacúolo que empurra o núcleo do parasito para o canto, formando uma característica de “anel de sinete” ao trofozoíto. Os esquizontes apresentam inclusões arredondadas a ovais que contêm vários merozoítos corados profundamente. É descrita a utilização do número de merozoítos para determinar a espécie do *Plasmodium* spp. (CAMPBELL, 2014). Contudo, o método de microscopia limita a determinação de espécies dos hemosporídeos, mesmo que realizado por especialistas, principalmente quando relacionado ao *Plasmodium* spp., pois a não visualização dos merontes, não exclui a presença deste agente, nem sua presença é suficiente para excluir a possibilidade de uma infecção mista por *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Indivíduos que apresentem baixa parasitemia ou infecções mistas, dificultam o diagnóstico morfológico (VALKIŪNAS, 2005; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

Os macrogametócitos e microgametócitos do *Haemoproteus* apresentam dimorfismo sexual claramente identificado. Microgametócitos possuem coloração do citoplasma mais intensa, além de núcleo compacto. Macrogametócitos possuem nucléolo, não presente em microgametócitos, porém essa característica não é facilmente visualizada por microscopia de luz. Gametócitos maduros apresentam pigmentos de hemozoína, a posição e quantidade desses pigmentos são importantes caracteres para distinção das espécies (VALKIŪNAS, 2005).

As técnicas sorológicas podem ser utilizadas para detecção de anticorpos contra hemosporídeos, principalmente em infecções com baixa parasitemia, onde os parasitos não são facilmente encontrados em microscopia de luz, sendo considerado um método efetivo para detecção de infecções crônicas e de baixa intensidade (ATKINSON et al., 2001). No entanto, podem indicar falsos positivos, pois os anticorpos podem estar circulantes no hospedeiro que não estejam mais infectados, bem como gerar a ocorrência de reações cruzadas com outros parasitos da mesma ordem por possuírem grande semelhança entre si (FALLON, 2003).

Os métodos de biologia molecular, particularmente a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) são mais usados nesses estudos (KRONE et al., 2008; SEHGAL et al., 2001; VOTÝPKA et al., 2002). A técnica fornece diagnóstico rápido e confiável, até mesmo em baixos níveis de parasitismo, além de permitir volumes pequenos de amostras no seu processamento (RICHARD et al., 2002; VALKIŪNAS et al., 2008; CLARK et al., 2009).

Tem sido demonstrado que a PCR é mais sensível para a detecção de hemoparasitos no sangue de aves (RICKLEFS; FALLON, 2002; WALDENSTRÖM et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005). Estudos moleculares realizados por Jarvi et al. (2002), demonstraram sensibilidade de 3 a 4 vezes maiores do que a microscopia, em infecções crônicas de parasitos no sangue. Em

contrapartida, a utilização da microscopia é defendida por Valkiunas et al. (2008) e Krone et al. (2008), como um método eficiente e confiável para a detecção dos hemosporídeos.

Portanto, a combinação de ambas as metodologias (morfológica e molecular) tem sido uma ótima abordagem para a caracterização destes agentes (PALINAUSKAS et al., 2007; MANTILLA et al., 2016; TOSTES et al., 2018; VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018).

2.5.6 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tem ganhado destaque no diagnóstico e na pesquisa científica. Essa técnica permite aplicação em diversos tipos de amostras (VANSTREELS; PARSONS, 2014).

A PCR permite à amplificação de um fragmento específico de DNA por meio de sua replicação exponencial. Dessa forma, um gene presente no genoma como cópia única pode ser amplificado, podendo ser posteriormente visualizado como uma banda discreta, constituída por moléculas de DNA, por meio de eletroforese (SILVA-PEREIRA, 2003).

O Gene do citocromo b, tem sido utilizado na PCR para identificação de hemosporídeos, e o codificador do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA), mais especificamente da subunidade menor (SSU), para o gênero *Plasmodium* spp. Esses genes são sequências estáveis e bastante conservadas em espécies congênicas e não são encontradas no hospedeiro ou em outros patógenos comuns (LI et al., 1995; BENSCH et al., 2004).

Diversos *primers* projetados para amplificar porções do genoma mitocondrial do parasito permitem distinguir *Haemoproteus* spp. de *Plasmodium* spp. e *Leucocytozoon* spp., ou todos os três gêneros, um do outro, após digestão de restrição de produtos de PCR (HELLGREN et al. 2004; BENSCH et al., 2009). No entanto, é necessário o sequenciamento de produtos de PCR, a fim de identificar linhagens individuais dos parasitos e determinar relações filogenéticas. As sequências parciais do *cytb* são depositadas em um banco de dados específicos para hemosporídeos aviários (MalAvi) permitindo maior disponibilidade de informações do parasito (BENSCH et al., 2009).

2.6 Infecções por Agentes da Família Anaplasmataceae

Agentes da família Anaplasmataceae pertencem a ordem Rickettsiales, onde incluem os gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*. Digno de nota, um quinto gênero potencial, "*Candidatus Neoehrlichia*" foi caracterizado molecularmente a partir de carrapatos *Ixodes* (GOFTON et al., 2016). Estes agentes são alfa-proteobactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, capazes de infectar várias células de seus hospedeiros, causando doenças nos animais e no homem, transmitidas por vetores invertebrados, principalmente carrapatos (WALKER; DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001).

A crescente ocorrência de doenças transmitidas por vetores invertebrados, como os carrapatos em animais domésticos e humanos tem despertado preocupação, sobretudo devido ao contato com ambiente silvestre (PAROLA; RAOULT, 2001; PADDOCK et al., 2016) em razão do elevado potencial de transmissão de doenças de caráter zoonótico, como anaplasnose, babesiose, erliquiose e riquetsiose, principalmente por estarem relacionados a problemas de saúde pública, representando desafios à medicina humana e veterinária (FÖLDVÁRI; FARKAS, 2005; PAROLA et al., 2005; DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2015).

O gênero *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., são dois importantes grupos da família Anaplasmataceae. O gênero *Ehrlichia* é composto por diversas espécies, dentre elas *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium*,

Ehrlichia IOE (*Ixodes ovatus Ehrlichia*) e *Ehrlichia minasensis* (SHIBATA et al., 2000; DUMLER et al., 2001; CABEZAS-CRUZ et al., 2016).

A espécie *E. canis* é o principal agente causador da Erliquiose Monocítica Canina (EMC) circulante no Brasil, o principal mecanismo de transmissão natural no cão é através da picada do carrapato infectado (*Rhipicephalus sanguineus*) que, no momento do repasto sanguíneo inocula a bactéria no hospedeiro vertebrado (EWING, 1969; AGUIAR et al., 2008; VIEIRA et al., 2011).

O carrapato é infectado através da ingestão de sangue contendo a bactéria, sua multiplicação ocorre nos hemócitos, nas células das glândulas salivares e no intestino (SMITH et al., 1976). A transmissão ocorre de forma transestadial e não transovariana (GROVES et al., 1975; SMITH et al., 1976). No hospedeiro vertebrado, essa infecção inicia-se nos corpos elementares que penetram nos monócitos e linfócitos que posteriormente se multiplicarão por divisão binária formando os corpos iniciais e, após 7 a 12 dias de incubação darão origem as mórulas. As mórulas são as únicas formas identificadas microscopicamente nos leucócitos mononucleares dos hospedeiros vertebrados (MCDADE, 1990), reconhecidas por inclusões de aspecto compacto, formando um agrupado de estruturas de formato cocóide ou elipsoidal. (RISTIC; HUXSOLL, 1984). A ruptura das células hospedeiras liberam formas infectantes que darão continuidade exponencial ao processo ao atingirem novas células (MARCONDES, 2009).

O gênero *Anaplasma* é responsável por causar a doença infecciosa conhecida como anaplasmose (DUMLER et al., 2001). As espécies atualmente descritas são *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys*, *A. odocoilei* e *A. capra* (DUMLER et al., 2001; TATE et al., 2013; LI et al., 2015; CABEZAS-CRUZ et al., 2016).

Anaplasma platys é um parasito intracelular obrigatório encontrado exclusivamente em plaquetas onde formam mórulas características de sua infecção (HARVEY et al., 1978).

Outra espécie relevante é *Anaplasma phagocytophilum*, causadora da anaplasmose granulocítica animal e humana. Sua transmissão ocorre pelos carrapatos *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* nos EUA, tendo como principais hospedeiros o veado-de-cauda-branca, cães, equinos, esquilos, alces e roedores (RYMASZEWSKA; ADAMSKA, 2004; FERQUEL et al., 2006). No Brasil, estudos recentes relataram detecção de *Anaplasma* spp. filogeneticamente aproximados *A. phagocytophilum* em cães no estado do Rio de Janeiro, aves carnívoras, gatos domésticos, carnívoros selvagens em cativeiro e cervídeos (SANTOS et al., 2011; ANDRÉ et al., 2012; MACHADO et al., 2012; ANDRÉ et al., 2014; SILVEIRA et al., 2014).

2.6.1 Agentes Anaplasmataceae em aves silvestres

Estudos envolvendo agentes da família Anaplasmataceae vem despertando interesse em aves silvestres, dado o potencial zoonótico e os relatos de ocorrência destes agentes em várias espécies animais (BJÖERSDORFF et al., 2001; DANIELS et al., 2002; OGDEN et al., 2008; DAVIS et al., 2009; VÁCLAV et al., 2011). Contudo, no Brasil e no mundo ainda existem poucos relatos que revelem o papel das aves no ciclo das enfermidades causadas pelos referidos patógenos (ALEKSEEV et al., 2001; HEYLEN et al., 2013). Do ponto de vista epidemiológico, as aves podem ser consideradas os indivíduos mais importantes, devido à sua motilidade (hábito de migração) e associação frequente com vetores artrópodes, como os carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2015).

As aves podem se infectar com o agente durante sua migração, ao estabelecerem seus hábitos em situações e localidades específicas, por exemplo, durante as mudas de penas e nidificação, onde permanecerão por períodos variáveis de tempo, favorecendo contato com ectoparasitos locais, especialmente ácaros e carrapatos, os quais, podem ser transportados por longas distâncias, estabelecendo novos focos de doenças (BJÖERSDORFF et al., 2001). A

dispersão desses agentes por aves migratórias pode representar risco à Saúde Pública (OGDEN et al. 2008). A alimentação, também pode favorecer a infestação por ectoparasitos e infecção por endoparasitos, principalmente quando relacionado as aves carnívoras, devido ao contato íntimo com a presa durante sua predação e a ingestão de vísceras da mesma (PITARELLI; PEREIRA, 2002).

Estudo envolvendo aves migratórias na Suécia, identificou presença de *Ehrlichia* spp. em 5,4% dos *Ixodes ricinus* presentes nestes indivíduos. Os autores ainda ressaltaram, a importância destes animais na epidemiologia das erliquioses, visto que, apesar do papel reservatório das aves para *Ehrlichia* spp. ainda não ter sido totalmente esclarecido, sugere-se que as aves possam atuar tanto como reservatório dos agentes e como transportadoras de vetores de uma região para outra (BJÖERSDORFF et al., 2001). No entanto, enquanto alguns autores defendem a possibilidade de as aves desempenharem o papel de portador e reservatório destes patógenos, outros descartam tal possibilidade.

Daniels et al. (2002) detectaram larvas de carrapatos infectados por *A. phagocytophilum*, sugerindo possível atuação das aves como reservatório para *Anaplasma*. Em contrapartida, outros pesquisadores descrevem o papel das aves apenas como portadoras para tal gênero (BJÖERSDORFF et al., 2001; ALEKSEEV et al., 2001; OGDEN et al. 2008; HILDEBRANDT et al. 2010), devido a não detecção de *A. phagocytophilum* em larvas, considerando-as reservatórios incompetentes (BJÖERSDORFF et al., 2001).

Contudo, o DNA de *Anaplasma* spp. não foi detectado apenas nos vetores, mas também em amostras sanguíneas de aves silvestres na Grécia (IOANNOU et al., 2009) e no Brasil, onde Machado et al. (2012), identificaram a presença de DNA de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. em amostras sanguíneas de aves carnívoras e gansos. Indicando que esses hospedeiros possam ser infectados por tais agentes.

Pesquisas adicionais envolvendo infecções experimentais, isolamento dos agentes, estudos epidemiológicos e entre outros requisitos devem ser realizados, a fim de verificar o papel que as aves possam desempenhar como reservatórios competentes para agentes Anaplasmataceae, avaliando o risco que essas espécies aviárias representam a saúde humana (MACHADO et al., 2012).

2.6.2 Diagnóstico

O diagnóstico direto por esfregaço sanguíneo dos agentes da família Anaplasmataceae é realizado rotineiramente em amostras de sangue de mamíferos, através da visualização direta de mórulas nos leucócitos. Apesar de ser uma técnica rápida e prática, na maioria dos casos de infecção natural, não é totalmente confiável, já que a parasitemia é variável e, geralmente, um pequeno número de células são infectadas (NAKAGHI et al., 2008).

Estudos não demonstraram a presença inclusões citoplasmáticas de *Anaplasma* spp. nas células sanguíneas das aves e, portanto, não foi considerado claro se esses organismos são capazes de infectar células aviárias ou simplesmente permanecer no sangue aviário (SKOTARCZAK et al., 2006; DINGLER et al., 2014). No entanto, Vanstreels et al. (2018) detectou inclusões eritrocitárias em pinguins-africanos (*Spheniscus demersus*), próxima filogeneticamente de *Anaplasma*, nomeando a cepa bacteriana “*Candidatus Anaplasma sphenisci*”.

Os métodos sorológicos e moleculares são muito utilizados para detecção de agentes da família Anaplasmataceae, principalmente devido as dificuldades apresentadas pela detecção direta, via esfregaço sanguíneo. Contudo, a sorologia pode fornecer resultados negativos durante a primeira semana de infecção, além destes testes não detectarem a infecção em sua fase aguda (WALKER; DUMLER, 1996; WANER et al., 2001; PADDOCK; CHILDS, 2003). A limitação referente aos métodos sorológicos é a ausência de diferenciação de um quadro de

infecção atual, de exposição sem infecção propriamente dita ou de uma infecção prévia (SHAW et al., 2001).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma técnica amplamente aplicada em diversas áreas do diagnóstico molecular, que permite análise de uma grande variedade de amostras, detectando uma sequência de interesse presente em uma amostra complexa de DNA (MOLINA; TOBO, 2004).

Desta forma, essa técnica vem sendo cada vez mais implementada como método diagnóstico de agentes da família Anaplasmataceae em aves, sobretudo devido sua viável execução, permitindo a detecção e a caracterização de novos patógenos (SANTOS et al., 2011).

A pesquisa do DNA através de PCR, usando iniciadores ou *primers* baseados no gene 16SrRNA (gene que determina a síntese de RNA ribossomal), permite a detecção de várias espécies da família Anaplasmataceae. O gene 16SrRNA é amplamente utilizado no seu diagnóstico, identificação e genotipagem (OLSEN; WOESE, 1993; PEREZ et al., 2006). É um gene conservado encontrado em todas as espécies de bactérias, que tem sido usado em pesquisas em diferentes materiais biológicos, como invertebrados, sangue e outros tecidos de animais e humanos (INOKUMA et al., 2000; HARTELT et al., 2004, MARTIN et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Autorização para Pesquisa com Animais Silvestres

O estudo teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo n°010/2021, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Campus Vargem Pequena. A coleta do material biológico foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através do sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) protocolo n° 47069-4.

3.2 Animais

Foram examinadas 44 aves, pertencentes a ordem Psittaciformes, 19 araras-canindé (*Ara ararauna*) e 25 papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*), amostradas do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) (22°72'35" S; 43°70'98" W), localizado no município de Seropédica-RJ, oriundas de apreensão do tráfico ou criação ilegal.

3.3 Exame Clínico das Aves

Inicialmente, foi realizado a observação do recinto, visualizando cada ave à distância, avaliando postura, locomoção e comportamento. Posteriormente as araras foram capturadas com auxílio de puçá e contidas fisicamente. Foi aferido temperatura (Figura 4), verificado qualidade das penas, avaliação dos olhos, narinas, ouvidos, orofaringe, bico e averiguado presença de ectoparasitos. Na avaliação da cavidade oral, o abre bico foi utilizado para auxílio (GRESPLAN; RASO, 2014).

O escore corporal foi analisado segundo Gresplan e Raso (2014), utilizando como padrão o sistema de pontuação, seguindo a escala de 1 a 5, tendo como referência o tamanho dos músculos peitorais e a quilha (Figura 3). Todos os dados foram registrados em fichas clínicas individuais.

Após o exame clínico as aves foram submetidas a colheita de sangue, via veia jugular direita. As colheitas foram efetuadas de setembro de 2020 a abril de 2021. Todas as aves foram incluídas no estudo, independente de apresentarem ou não sinais clínicos.

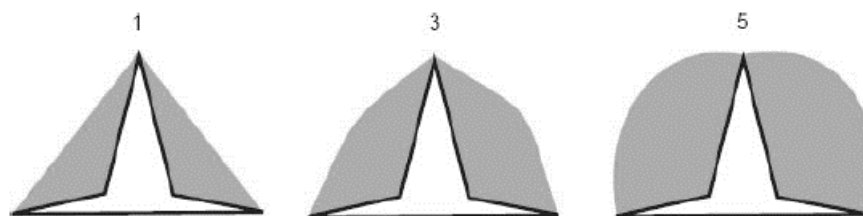


Figura 3. Representação esquemática sobre avaliação da condição corporal através do sistema de pontuação da musculatura peitoral com relação sua projeção a quilha (escore 1 a 5). Fonte: Gresplan; Raso (2014).



Figura 4. Aferição de temperatura cloacal em papagaio-verdadeiro, durante exame clínico, CETAS – Seropédica – RJ.

3.4 Colheita de Sangue

O procedimento de colheita de sangue foi realizado nas instalações do CETAS. As penas da região lateral direita do pescoço foram umedecidas com álcool 70% e afastadas para possibilitar a visualização da veia jugular e a realização da antisepsia local. O sangue foi colhido através de venopunção da jugular direita (veia mais calibrosa) (Figura 5) conforme descrito por Santos e Cubas (2007) ou através do acesso da veia ulnar.

Foram colhidos cerca de 0,5 mL de sangue, utilizando-se seringas de 3 mL e agulhas hipodérmica descartáveis estéreis. O sangue foi acondicionado em microtubos de 0,5 mL contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), mantidos resfriados em caixas isotérmicas até o momento do processamento.

Após a colheita, foram confeccionados esfregaços sanguíneos com resquício de sangue presente na seringa, sem a presença de EDTA, a fim de garantir melhor preservação da morfologia das células e evitar interferências do anticoagulante utilizado. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Patologia Clínica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LABVET/UFRRJ), no mesmo dia da sua obtenção.

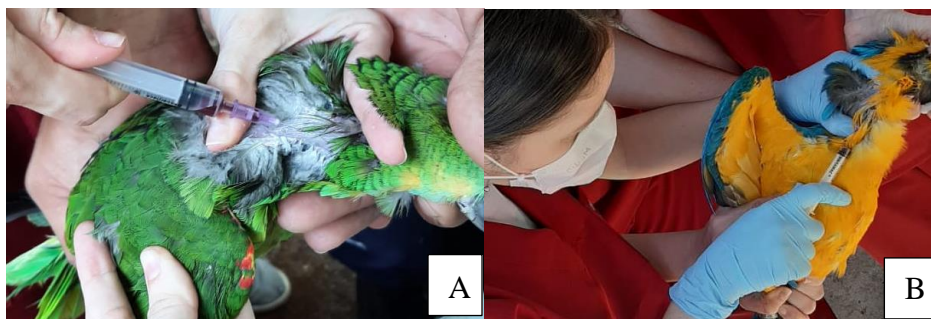


Figura 5. (A): Colheita de sangue em Papagaio-verdadeiro. (B): Colheita de sangue em Arara-canindé. Ambos, via acesso veia jugular direita, CETAS – Seropédica – RJ.

3.5 Hemograma

O volume globular foi obtido pela técnica de microhematócrito e a hemoglobinometria pelo método de Drabkin utilizando-se kit comercial. A hematimetria, a leucometria global e a contagem de trombócitos foram realizadas manualmente em câmara hematómica, onde foram efetuadas diluições com o Natt-Herrick na proporção 1:100. A contagem manual foi realizada conforme Almosny e Monteiro (2007), utilizando-se o aumento de 400x. Os trombócitos foram contados nas 25 subdivisões do quadrante central e os eritrócitos apenas nas cinco subdivisões diagonais do mesmo retículo (Figura 6). Em relação aos leucócitos, sua contagem foi realizada nas 16 subdivisões dos quadrantes laterais. Os valores das contagens destes parâmetros foram calculados com base na diluição, altura da câmara e área contada, resultando em um fator multiplicador: 250 para leucócitos, 1000 para trombócitos e 5000 para eritrócitos.

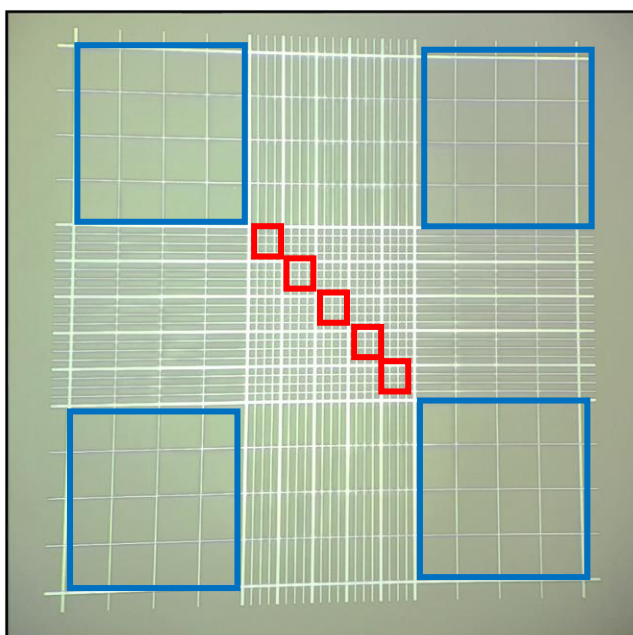


Figura 6. Câmara de Neubauer: retículo de eritrócitos (quadrante central), destacado em vermelho a região de contagem de eritrócitos; Quadrantes laterais, destacado em azul, região de contagem de leucócitos. LABVET, Seropédica, 2021.

A leucometria específica (contagem diferencial de leucócitos) foi realizada por microscopia de luz, em esfregaço sanguíneo corado com May-Grunwald-Giemsa, junto a pesquisa de hemoparasitos (*Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. e agentes da família Anaplasmatidae) utilizando o aumento de 1000x, pela observação de no mínimo 100 campos (BUSH et al., 1997). As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio de refratômetro manual (ALMOSNY e MONTEIRO, 2007).

3.6 Extração de DNA

Após o processamento das amostras, o sangue restante foi acondicionado em microtubos e mantidos a 20 graus negativos para posterior extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A extração de DNA foi realizada em um fluxo específico, a partir de 10 μ L de sangue com kit comercialmente disponível (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNA total tiveram suas concentrações

determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), separadas em alíquotas e armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

3.7 PCR Convencional

Após as extrações, as amostras foram analisadas mediante PCR convencional. Anteriormente a detecção dos agentes, todas as amostras foram submetidas à amplificação do gene endógeno Beta actina (ACTB). Posteriormente realizou-se à amplificação do gene alvo 16SrRNA, para detecção de agentes Anaplasmataceae e o gene mitocondrial citocromo b para detecção de hemosporídeos (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores nas reações de PCR e nested PCR. Controle da extração de DNA (gene endógeno) e detecção molecular de *Plasmodium* spp. /*Haemoproteus* spp. (citocromo b), família Anaplasmataceae (16SrRNA) e *Anaplasma* spp. (gene rrs).

Agentes	Primers	Sequências dos oligonucleotídeos
Beta actina, gene endógeno (ave)	B-actin-aveF	5'-TATCCGTAAGGATCTGTATG-3'
	B-actin-aveR	5'-ATCTCGTCTTGTTTTATGCG-3'
<i>Haemoproteus</i> spp., <i>Plasmodium</i> spp. e <i>Leucocytozoon</i> spp. (HELLGREN et al., 2004).	HaemNF-1	5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'
<i>Haemoproteus</i> spp. e <i>Plasmodium</i> spp. (BENSCH et al., 2000).	HaemNR3	5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'
Família Anaplasmataceae (INOKUMA et al., 2000).	Haem F	5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3'
	Haem R2	5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'
<i>Anaplasma</i> spp. Primers externo (MASSUNG et al., 1998)	EHR16SD	5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3'
	EHR16SR	5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'
<i>Anaplasma</i> spp. Primers interno (MASSUNG et al., 1998)	gE3a	5'-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'
	gE10R	5'-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC'-3'
<i>Anaplasma</i> spp. Primers interno (MASSUNG et al., 1998)	gE2	5'-GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG-3'
	gE9f	5'-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'

3.7.1 Reações de amplificação para Hemosporídeos baseado no gene citocromo b

A reação da PCR para o gene citocromo b (*cytb*), foi efetuada utilizando os iniciadores (*primers*) HaemNF-1 e HaemNR3, seguidos por uma segunda reação (*nested*) com os *primers* HaemF e HaemR2 para amplificação de aproximadamente 480 bp (HELLGREN et al., 2004; BENSCH et al., 2000). Foram utilizados 5 uL de DNA de cada amostra, 0,75U/μL Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®), Tampão da PCR que inclui 20mM de Cloreto de Magnésio (PCR Buffer 1 X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl) 0,4 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen®) 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura estéril (*Life Technologies*®) q.s.p. 25 μL. Nas reações de nested-PCR, foram utilizados 1μL do produto amplificado da primeira reação, mantendo-se as concentrações dos reagentes. Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições de termociclagem de cada reação estão representados na Tabela 1.

3.7.2 Reações de amplificação para Família Anaplasmataceae baseado no gene 16SrRNA

A reação de amplificação da família Anaplasmataceae, foi baseada no gene 16SrRNA e realizada segundo protocolo descrito por Inokuma et al. (2000), salvo pequenas modificações. Nas reações foram utilizados 5 uL de DNA de cada amostra, 1,25U/μL Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®), Tampão da PCR que inclui 20mM de Cloreto de Magnésio (PCR Buffer 1 X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl) 0,4 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen®) 0,5 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura estéril (*Life Technologies*®) q.s.p. 25 μL.

3.7.3 Reações de amplificação para *Anaplasma* spp. gene rrs

A reação de amplificação do agente *Anaplasma* spp. foi realizado segundo protocolo descrito por Massung et al. (1998). Os iniciadores (*primers*) externos gE3a e gE10R para amplificação de 932pb, seguidos por uma segunda reação (*nested*) com os *primers* internos gE2 e gE9f para 546pb (MASSUNG, et al., 1998). Nas reações foram utilizados 5 uL de DNA de cada amostra, 0,625U/μL Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®), Tampão da PCR que inclui 20mM de Cloreto de Magnésio (PCR Buffer 1 X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl) 0,4 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen®), 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura estéril (*Life Technologies*®) q.s.p. 25 μL.

3.7.4 Controle de qualidade das reações

Para evitar contaminações dos reagentes e enzimas, foi incluído controles negativos nas reações de amplificação e extração de DNA. No controle negativo da extração e da reação de amplificação, as amostras de DNA foram substituídas por uma quantidade equivalente de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®). Foram utilizadas ponteiras com filtro em todas as fases da PCR. A extração de DNA, reações de PCR e nested-PCR foram realizadas em salas separadas. Todas as reações foram realizadas em sistema fechado, o preparo das reações e a pipetagem das amostras contendo DNA foram realizados em capela de fluxo laminar distintas, previamente esterilizadas com luz ultravioleta antes de cada reação.

Todas as reações de PCR contaram com controles positivos específicos para cada agente pesquisado. Foram utilizados controles positivos para hemosporídeos: *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. (WERTHER et al., 2017). *E. canis*, amostra cepa Jaboticabal (NAKAGHI et al., 2008) e *Anaplasma phagocytophilum* (AGUIAR et al., 2007).

3.7.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90 V/50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Life Technologies®). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-EyeII Stratagene®).

3.7.6 Sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da amplificação das reações de PCR convencional foram purificados com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de PCR (Tabela 1). O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems), no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Campus de Jaboticabal).

3.7.7 Análise das sequências e construção da árvore filogenética

Utilizando-se o programa Phred-Phrap versão 23 (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) foram construídas sequências-consenso, analisando ambas as fitas “forward” e “reverse” sequenciadas da mesma amostra. Foi conferido um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. A sequência foi escolhida com bases de qualidade acima de 20.

As sequências foram inseridas no programa BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”), utilizado para localizar e comparar sequências de nucleotídeos já existentes, publicados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (BENSON et al., 2002). Posteriormente, as sequências salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado retiradas do banco de dados (genbank), utilizando o software Clustal/W via Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Foi realizada análise de máxima verossimilhança utilizando o cluster blackbox RaxML (STAMATAKIS et al., 2008) a partir de 1000 réplicas de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). O modelo de Kimura-3-parâmetros foi usado para calcular as distâncias evolutivas. A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foram realizados utilizando o programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA X) versão 10.2.6 (TAMURA et al., 2013).

3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos no hemograma (eritrograma, leucograma e trombograma) foram agrupados e analisados por estatística descritiva, em termos de média e desvio padrão, valores mínimos e máximos, para ambas as espécies e separadas entre animais positivos e negativos. A análise estatística descritiva foi realizada utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos Esfregaços Sanguíneos

No mínimo 100 campos foram avaliados a fim de detectar a presença dos agentes no esfregaço sanguíneo (BUSH et al., 1997). Cada lâmina foi corada por Giemsa e examinada em microscopia de luz, aumento de 1000X.

Duas aves (4.54%), apresentaram inclusões no interior dos eritrócitos (Figura 7 e 8). Uma inclusão possibilitou constatar o gênero *Plasmodium* spp., visto que foi identificado a presença de meronte. No outro indivíduo, foi observado apenas gametócitos, enquadrando-os em inclusões sugestivas de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. Não foram observadas mórulas ou inclusões de agentes da família Anaplasmataceae no interior dos leucócitos e/ou plaquetas. As aves que apresentaram positividade na detecção direta, pertenciam apenas a espécie *Ara ararauna* (Arara-canindé).

Os dois indivíduos positivos em microscopia apresentaram baixos níveis de parasitemia (variando de 1 a 3 parasitos / 100 campos microscópicos), com poucos estágios sanguíneos, prejudicando a identificação morfológica do parasito.

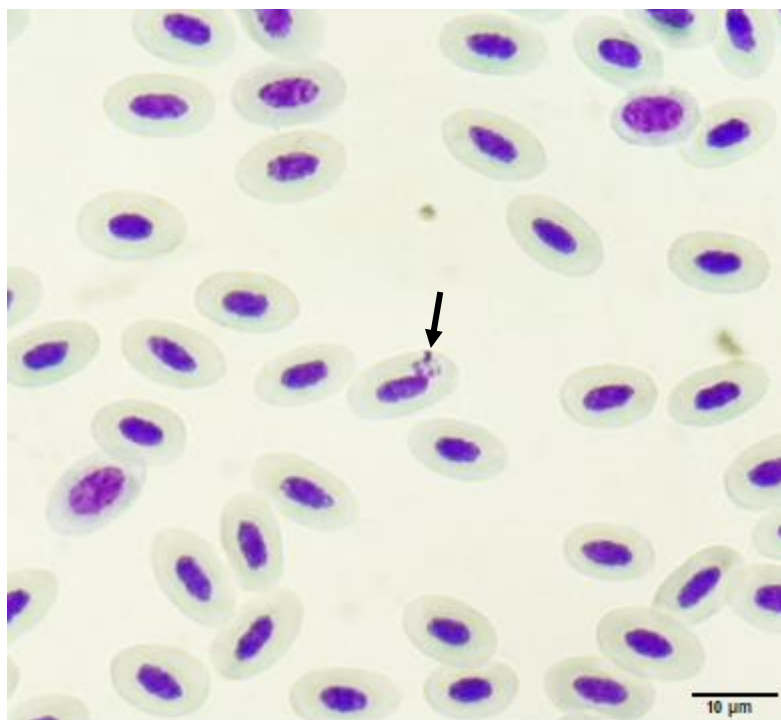


Figura 7. Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de meronte (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*) (Corante Giemsa, 1000x).

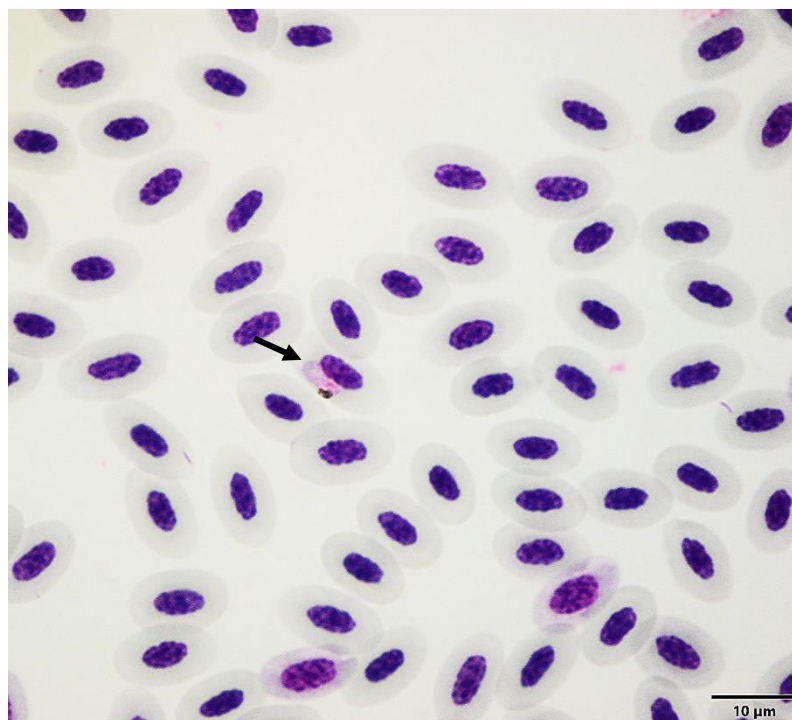


Figura 8. Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de gametócito (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*) (Corante Giemsa, 1000x).

4.2 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (cPCR)

Na reação de amplificação da PCR convencional com base no gene 16SrRNA para agentes da família Anaplasmataceae, uma ave (2.27%) mostrou-se positiva (Figura 9), porém, até o momento não foi realizado o sequenciamento do produto da PCR para a identificação do gênero do parasito e filogenia. A ave positiva pertence a espécie *Ara ararauna* (arara-canindé), proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres CETAS, localizado no município de Seropédica/RJ.

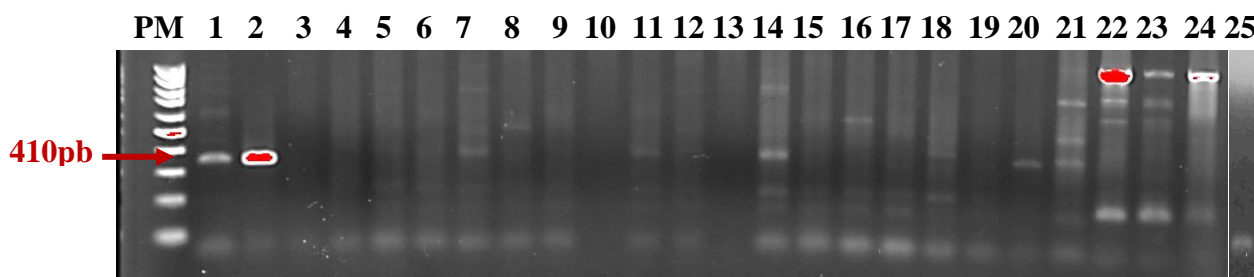


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 410 pb, na PCR para agentes da família Anaplasmataceae (gene 16SrRNA). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaleta 1 e 2: controles positivos (410 pb); Canaleta 25: controle negativo; Canaleta 20: amostra positiva.

Os resultados da cPCR para *Anaplasma* spp. foram negativos para todas as aves testadas, apesar de algumas amostras formarem bandas na altura do controle positivo (Figura 10), estas também formaram bandas inespecíficas (bandas em alturas diferentes), não podendo confirmar a ocorrência de sua positividade.

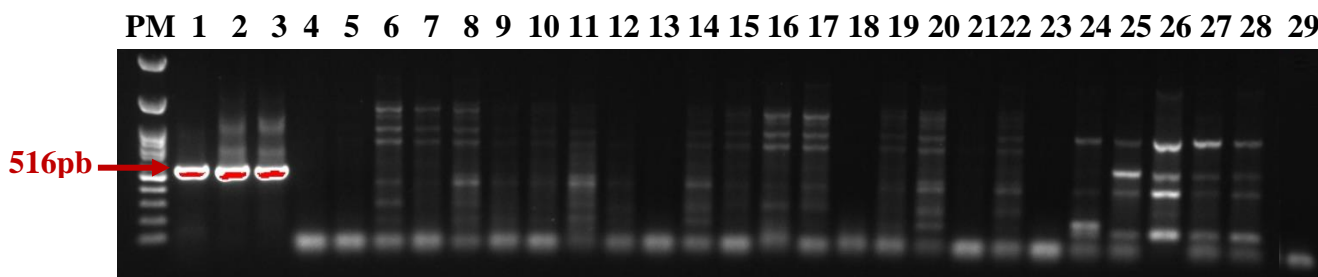


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando bandas na altura de 516 pb, na PCR para *Anaplasma* spp. (gene *rrs*). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaleta 1, 2 e 3: controles positivos (516 pb); Canaleta 29: controle negativo.

Quanto ao gene citocromo b, responsável por detectar hemosporídeos, dois (4.54%) indivíduos também pertencentes a espécie *Ara ararauna* (Arara-canindé), provenientes do CETAS – Seropédica – RJ, mostraram-se positivos. Uma das amostras positivas foi submetida ao sequenciamento e, enquadrou-se no gênero *Plasmodium* spp. Lembrando, que a PCR convencional não permite a diferenciação dos agentes, desta forma, é necessário a realização do sequenciamento dos amplicómeros a fim de identificar o gênero e espécie do parasito (Figura 11).

Quanto aos papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) também provenientes do CETAS/RJ, alguns indivíduos formaram bandas na altura do controle positivo (Figura 12), contudo, essas mesmas amostras também formaram bandas inespecíficas, não sendo possível confirmar a ocorrência de sua positividade sem o sequenciamento.

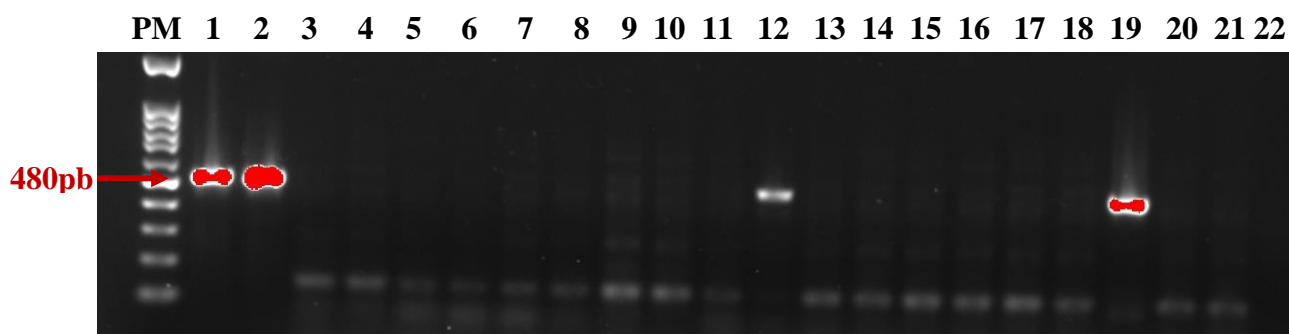


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, de amostras de aves espécie *Ara ararauna* (arara-canindé), evidenciando bandas na altura de 480 pb, na PCR para *Plasmodium* ssp. e *Haemoproteus* spp. (gene citocromo B). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Techonologies®); Canaleta 1 e 2: controle positivo; Canaleta 22: controle negativo; Canaletas 12 e 19: amostras positivas.

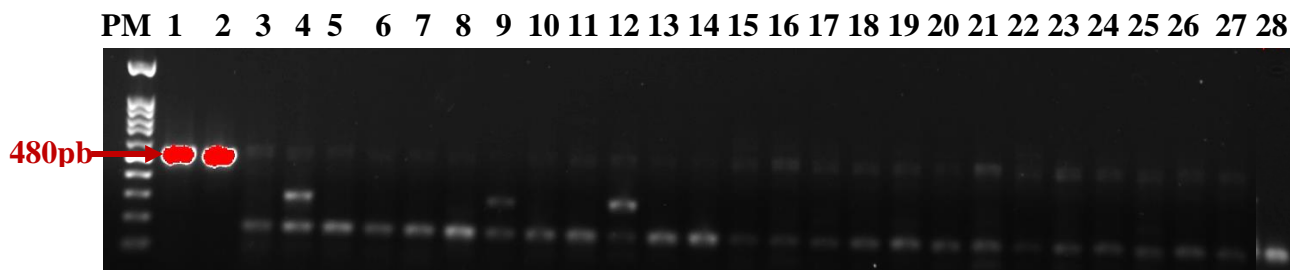


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, de amostras de aves espécie *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro), evidenciando bandas na altura de 480 pb, na PCR para *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. (gene citocromo B). Canaleta PM: peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Techonologies®); Canaleta 1 e 2: controle positivo; Canaleta 28: controle negativo; algumas canaletas com formação de bandas fracas na altura do controle positivo.

Dos 3 indivíduos positivos, 2 (66,66%) (Arara 10 e Arara 17) apresentaram positividade tanto na PCR para hemosporídeos, quanto na detecção direta, via esfregaço sanguíneo. Entretanto a arara 18 mostrou-se positiva apenas no teste molecular para agente da família Anaplasmataceae (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação das aves positivas, indicando a espécie acometida e a positividade/negatividade para os testes realizados no estudo.

Identificação da ave	Espécie	Deteção direta Família Anaplasmataceae	Deteção direta <i>Plasmodium/ Haemoproteus</i>	PCR família Anaplasmataceae	PCR <i>Anaplasma</i> spp.	PCR <i>Plasmodium/ Haemoproteus</i>
Arara 10	<i>Ara ararauna</i>	-	+	-	-	+
Arara 17	<i>Ara ararauna</i>	-	+	-	-	+
Arara 18	<i>Ara ararauna</i>	-	-	+	-	-

CETAS: Centro de Triagem de Animais Silvestres; PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase

4.3 Análise Hematológica das Araras-canindé

Os parâmetros hematológicos foram determinados separadamente de acordo com cada espécie, para indivíduos negativos e positivos, no qual os animais positivos apresentaram valores médios de eritrócitos abaixo dos valores médios estipulados por Carpenter et al. (2016), no entanto, o percentual de hematócrito do grupo positivo e negativo permaneceram dentro do intervalo de referência. Ambos os animais (negativos e positivos) apresentaram linfopenia, monocitose e heterofilia quando comparados aos valores de referência (Tabela 3). Os demais parâmetros não divergiram da literatura.

Apesar da média dos indivíduos positivos não apresentarem leucocitose, leucopenia ou anemia, quando analisados individualmente observou-se elevação dos leucócitos em pelo menos uma arara (n=1; 33.33%; arara 10) e anemia associada a leucopenia (n=1; 33.33%; arara 17) (Tabela 4).

No exame clínico, os indivíduos positivos não apresentaram alterações relevantes. Dois deles (2/3; 66.66%) apresentaram baixo escore corporal, e um apresentou arrancamento de pena concomitante.

Tabela 3. Análise Estatística Descritiva dos parâmetros hematológicos das araras-canindé (*Ara ararauna*) negativas e positivas. LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Parâmetros hematológicos	Resultados	N	Média	Desv. padrão	Erro padrão	Mín.	Máx.	Ara ararauna*
He ($\times 10^6$ cel/ μ L)	Negativo	16	2.77	0.40	0.09	2.19	3.56	2.7 \pm 0.7
	Positivo	3	2.13	0.12	0.06	2	2.2	
Hb (g/dL)	Negativo	16	16.17	1.54	0.39	13.5	18.4	11 \pm 2.9
	Positivo	3	14.77	0.72	0.42	14.3	15.6	
Hematócrito (%)	Negativo	16	43.25	4.24	1.06	37	50	40 \pm 7.7
	Positivo	3	41.66	3.05	1.76	39	45	
VCM (fl)	Negativo	16	159.05	27.62	6.91	124.58	223.74	-
	Positivo	3	190.28	14.57	8.41	178.08	206.42	
CHCM (g/dL)	Negativo	16	37.44	1.65	0.41	34.88	40	-
	Positivo	3	35.57	3.17	1.83	32	38.05	
Leuc. Totais (cel/ μ L)	Negativo	16	9937.5	4682.53	1170.64	3000	17500	18.9 \pm 5.6
	Positivo	3	17500	10009.37	5778.91	7250	27250	
Heterófilos (%)	Negativo	16	62.00	13.71	3.43	44	85	52 \pm 10
	Positivo	3	67	8.72	5.03	61	77	
Eosinófilos (%)	Negativo	16	0	0	0	0	0	0
	Positivo	3	0	0	0	0	0	
Basófilos (%)	Negativo	16	0.063	0.25	0.06	0	1	0.9 \pm 1.3
	Positivo	3	0	0	0	0	0	
Linfócitos (%)	Negativo	16	27.56	13.13	3.29	10	50	42 \pm 10
	Positivo	3	17.68	6.42	3.72	13	25	
Monócitos (%)	Negativo	16	10.31	4.16	1.04	5	21	4.3 \pm 2.7
	Positivo	3	15.33	7.58	4.37	10	24	
Trombócitos estimados (cel/ μ L)	Negativo	16	22875	9912.12	2478.02	11000	44000	-
	Positivo	3	23333.33	9609.02	5547.77	13000	32000	
PPT (Refratômetro)	Negativo	16	4.075	0.39	0.09	3.4	4.8	2.5 \pm 4.2
	Positivo	3	3.68	0.57	0.33	3	4	

HE: hemácias; HB: hemoglobina; HT: hematócrito; VGM: volume globular médio; CHCM: concentração de hemoglobina globular média; LEUC: leucócitos; LINF: linfócitos; MON: monócitos; BAST: neutrófilos bastões; SEG: neutrófilos segmentados; EOS: Eosinófilos; BAS: basófilos; PPT: Proteína plasmática total; N: número de araras-canindé; DP: desvio padrão. *Valores de referência Carpenter et al. (2016).

Tabela 4. Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de Aves (*Ara ararauna*) positivas para *Plasmodium/ Haemoproteus* e/ou agente da família Anaplasmataceae.

Parâmetros hematológicos	Arara 10	Arara 17	Arara 18	<i>Ara ararauna</i>*
Eritrócitos (x10⁶ cel/μL)	2	2.19	2.2	2.7 ± 0.7
Hb (g/dL)	14.4	14.3	15.6	11 ± 2.9
Hematócrito (%)	45	39	41	40 ± 7.7
VCM (fl)	206.42	178.08	186.36	-
CHCM (g/dL)	32.00	36.67	38.05	-
Leucócitos Totais (cel/μL)	27250	7250	18000	18.9 ± 5.6
Heterófilos (%)	63	61	77	52 ± 10
Eosinófilos (%)	0	0	0	0
Basófilos (%)	0	0	0	0.9 ± 1.3
Linfócitos (%)	25	15	13	42 ± 10
Monócitos (%)	12	24	10	4.3 ± 2.7
Trombócitos estimados (cel/μL)	13000	32000	25000	-
PPT (Refratômetro)	3	4	4	2.5 ± 4.2

Cel/μL: células por microlitro; Hb: Hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; g/dL: grama por decilitro. *Valores de referência Carpenter et al. (2016).

4.4 Análise Hematológica de Papagaios-verdadeiros

Os papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) não apresentaram positividade para nenhum dos agentes pesquisados (hemosporídeos ou agente da família Anaplasmataceae), entretanto quando comparado os resultados médios com valores de referência descritos por Grespan e Raso (2014) (Tabela 5), algumas alterações foram visualizadas, onde a média de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos totais e monócitos ultrapassaram os valores de referência já estabelecidos em literatura, enquanto a média do volume corpuscular médio (VCM) mostrou-se reduzida (Tabela 5), contudo, vale lembrar que os valores de referências estão relacionados ao gênero e não a espécie em específico.

Tabela 5. Análise Estatística Descritiva dos valores do Hemograma de *Amazona aestiva* LABVET - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 2021.

Parâmetros hematológicos	N	Média	Desv. padrão	Mínimo	Máximo	<i>Amazona spp.</i> (GRESPLAN; RASO, 2014)
Eritrócitos (x10 ⁶ cel/μL)	24	3.77	0.81	2.39	5.5	2.5 - 4.5
Hb (g/dL)	24	18.16	1.62	15.3	21.1	12.2 - 15.9
Hematócrito (%)	24	54.54	3.51	49	60	45-55
VCM (fl)	24	151.00	33.11	98.18	221.76	160-175
CHCM (g/dL)	24	33.34	2.59	28.33	40.6	29.1-31.9
Leucócitos Totais (cel/μL)	24	17231.25	14860.06	3300	66750	6000-17000
Heterófilos (%)	24	58.83	13.65	33	88	30-75
Eosinófilos (%)	24	1.95	1.80	0	6	1-2
Basófilos (%)	24	0	0	0	0	0-5
Linfócitos (%)	24	29	13.46	7	57	20-65
Monócitos (%)	24	10.20	4.52	3	19	0-3
Trombócitos estimados (cel/μL)	24	25166.67	12960.36	7000	55000	-
PPT (Refratômetro)	24	5.2	0.71	3.8	6.6	3-5.2

Cel/μL: células por microlitro; Hb: Hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; g/dL: grama por decilitro.

4.4 Análise das Sequências

O Produto da PCR para *Plasmodium spp./Haemoproteus spp.* (gene citocromo B) relacionado a arara 17 foi purificado e enviado para sequenciamento e analisado no BLAST. As sequências obtidas apresentaram 100% de identidade para o *P. nucleophilum* str. em *Ramphastos vitellinus* (tucano-de-bico-preto) no Brasil (número de acesso no GenBank KX159489.1).

4.5 Árvore Filogenética

A análise filogenética foi realizada apenas em uma amostra positiva (arara 17), baseada no gene citocromo b. A análise dos alinhamentos e produção da árvore filogenética demonstraram sequência no mesmo clado para a espécie *P. nucleophilum*, detectado em *Ramphastos vitellinus* (Tucano-de-bico-preto), número de acesso (KX159489.1) e em *Alopochen aegyptiacus* (JX467689.1) (Ganso-do-Egito) no Brasil (Figura 13). A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, modelo Kimura-3-parâmetros.

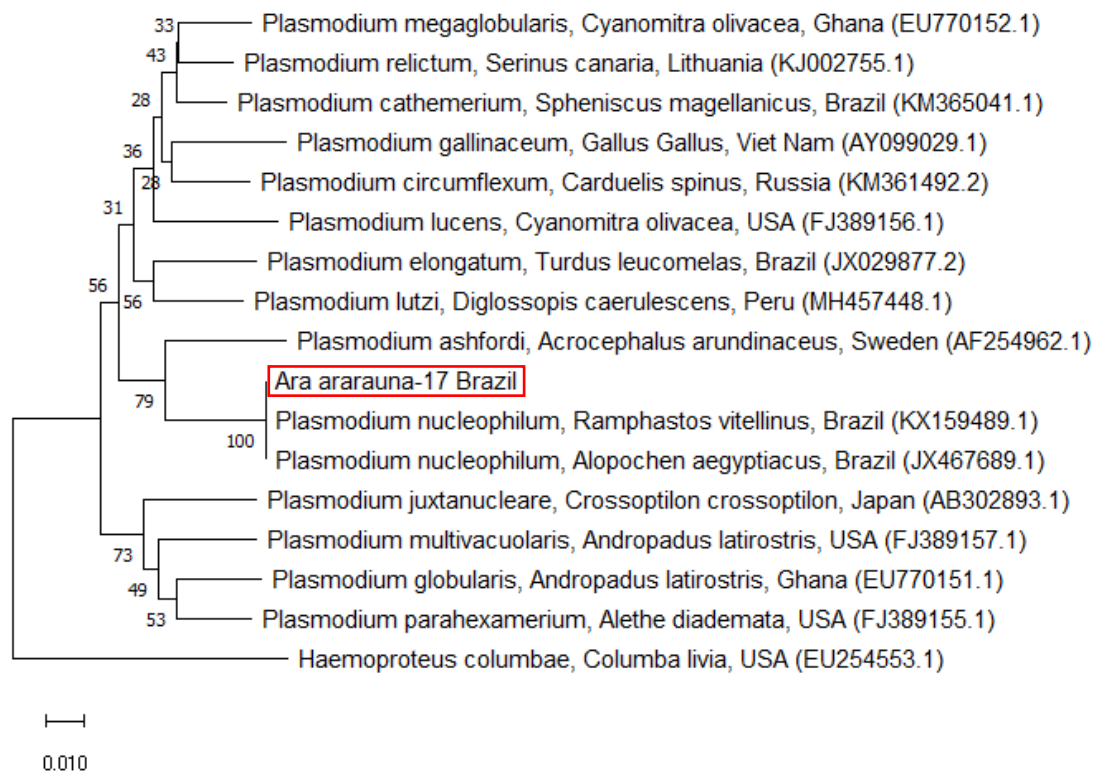


Figura 13. Posição filogenética de seqüências de *Plasmodium* spp. detectadas em espécies de aves, com base no gene mitocondrial citocromo b. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, modelo Kimura-3-parâmetros. As espécies de aves acometidas estão descritas após as espécies dos agentes sequenciados e os números de acesso do GenBank das estão fornecidos entre parênteses. A linhagem apresentada neste trabalho está destacada em vermelho.

CAPÍTULO I

5 ESTUDO HEMATOLÓGICO E MOLECULAR DA INFECÇÃO POR *Plasmodium* spp. E AGENTES DA FAMÍLIA ANAPLASMATACEAE EM ARARAS-CANINDÉ (*Ara ararauna*) DO CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES (CETAS-RJ)

5.1 RESUMO

Agentes da ordem Haemosporida e Rickettsiales são importantes patógenos transmitidos por artrópodes capazes de acometerem diversos grupos de animais, incluindo as aves. Os Centros de Triagens de Animais Silvestres (CETAS) do Brasil, albergam considerável número de aves de diversas espécies. Estes indivíduos chegam constantemente debilitados nestas instituições, estando propensos a doenças e a disseminação de patógenos. O presente estudo teve como objetivo examinar e colher material sanguíneo de 19 Araras-canindé (*Ara ararauna*) amostradas do CETAS do Rio de Janeiro, a fim de detectar a presença de hemosporídeos (*Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp.) e agentes da família Anaplasmataceae (*Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp.) através de técnicas moleculares, detecção direta em esfregaço sanguíneo e sequenciamento genético. Na avaliação dos esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, foram encontradas estruturas compatíveis com *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. em 10,52% (2/19) das aves. No diagnóstico molecular 17,79% (3/19) dos indivíduos testados foram positivos, onde 1 (5,27%) apresentou positividade para agentes pertencentes a família Anaplasmataceae (gene 16SrRNA), e 2 (10,52%) foram positivos para hemosporídeos (gene citocromo b). Apenas uma amostra positiva, referente ao gene citocromo b foi sequenciada e realizada a análise dos alinhamentos e inferência filogenética, demonstrando positividade para o gênero *Plasmodium*, intimamente relacionado a linhagem *nucleophilum*, não registrada até o momento na espécie *Ara ararauna*. Quanto aos hemogramas, embora as alterações hematológicas apresentadas possam não ter sido associadas apenas à infecção, dois indivíduos infectados por hemosporídeos apresentaram alterações em seus parâmetros hematológicos.

Palavras-chave: *P. nucleophilum*, Anaplasmataceae, Psittaciformes

5.2 ABSTRACT

Agents of the order Haemosporida and Rickettsiales are important pathogens transmitted by arthropods capable of affecting several groups of animals, including birds. The Wild Animal Screening Centers (CETAS) in Brazil house a considerable number of birds of different species. These individuals are constantly debilitated in these institutions, being prone to disease and the spread of pathogens. The present study aimed to examine and collect blood material from 19 Hyacinth Macaws (*Ara ararauna*) collected at CETAS in Rio de Janeiro, in order to detect the presence of hemosporidia (*Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp.) and agents of the family Anaplasmataceae (*Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp.) using molecular techniques, direct detection in blood smears and genetic sequencing. In the evaluation of blood smears stained by Giemsa, structures compatible with *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp. were identified in 10.52% (2/19) of the birds. In the molecular diagnosis, 17.79% (3/19) of the individuals tested were positive, being 1 (5.27%) positive for agents belonging to the Anaplasmataceae family (16SrRNA gene), and 2 (10.52%) for hemosporidia (cytochrome b gene). Only one positive sample, referring to the cytochrome b gene, was sequenced and the analysis of alignments and phylogenetic inference was performed, demonstrating positivity for the genus *Plasmodium*, closely related to the *nucleophilum* lineage, not recorded so far in the *Ara ararauna* species. As for the blood count, although the hematological alterations presented may not be associated only with the infection, two individuals infected with hemosporidia showed alterations in their hematological parameters.

Keywords: *P. nucleophilum*, Anaplasmataceae, Psittaciformes

5.3 INTRODUÇÃO

Pesquisas no Brasil e no mundo tem sido atualmente desenvolvidas a fim de determinar o papel das aves e outras classes silvestres na epidemiologia das doenças causadas por diversos agentes etiológicos, entre eles, a ordem Haemosporida e Rickettsiales (KRONE et al., 2008; MACHADO et al., 2012; ERWIN et al., 2016; CHAGAS et al., 2017).

Agentes da família Anaplasmataceae, mais especificamente *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. pertencem a ordem Rickettsiales, são alfa-proteobactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, transmitidas por vetores invertebrados (principalmente os carrapatos), capazes de infectar várias células de seus hospedeiros, causando doenças nos animais e no homem (WALKER; DUMLER, 1996; DUMLER et al., 2001).

Embora, o papel das aves na epidemiologia destes agentes seja pouco explorado, estudos já identificaram a presença de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em artrópodes de aves em diversos países (BJÖERSDORFF et al., 2001; DANIELS et al., 2002; OGDEN et al. 2008; HILDEBRANDT et al., 2010). Machado et al. (2012), e mais recentemente Sacchi et al (2021), identificaram a presença de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. no sangue de aves migratórias e carnívoras do Brasil.

Outro grupo muito importante e de distribuição cosmopolita é a Ordem Haemosporida, estes agentes são protistas heteroxenos obrigatórios, transmitidos por dípteros hematófagos (BRAGA et al., 2011) capazes de acometer anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Abrangem as famílias Haemoproteidae, Garniidae, Leucocytozoidae e Plasmodiidae e dentre estas famílias, os gêneros *Plasmodium*, causador da malária aviária, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* e *Fallisia*. Possuem mais de duas centenas de espécies capazes de infectar aves, embora este número esteja em constante rearranjo taxonômico e novas espécies sejam descritas frequentemente (VALKIŪNAS, 2005; VANSTREELS; PARSONS, 2014).

Estudos com hemosporídeos em hospedeiros aviários passaram a ter relevância após a descoberta da similaridade destes parasitos com os agentes da malária humana (DANILEWSKY, 1886; COX, 2010). Estes agentes possuem importância epidemiológica, podendo acarretar grandes prejuízos econômicos, causando sérios agravos a saúde, incluindo até a morte do hospedeiro (VALKIŪNAS, 2005; ATKINSON, 2008).

O objetivo deste estudo, foi determinar a ocorrência de hemosporídios (*Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp.) e agentes da família Anaplasmataceae (*Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp.) em araras-canindé (*Ara ararauna*) amostradas do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ), por meio da observação direta em microscopia de luz, diagnóstico molecular, sequenciamento genético e, estabelecer se as aves positivas apresentam sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Animais e local de coleta

A colheita de sangue das aves pertencentes a ordem Psittaciforme foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através do sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob número de autorização 47069-4.

Sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo n°010/2021, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Campus Vargem Pequena.

As 19 aves da espécie *Ara ararauna* (araras-canindé) foram amostradas do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) (22°72'35" S; 43°70'98" W), localizado no município de Seropédica-RJ.

5.4.2 Exame clínico das aves e colheita das amostras

Inicialmente, foi realizado a observação do recinto, visualizando cada ave à distância, avaliando postura, locomoção e comportamento. Posteriormente as araras foram capturadas com auxílio de puçá e contidas fisicamente. Foi aferido temperatura, verificado qualidade das penas, avaliação dos olhos, narinas, ouvidos, orofaringe, bico, escore corporal e averiguado presença de ectoparasitos. Na avaliação da cavidade oral, o abre bico foi utilizado como auxílio (GRESPLAN; RASO, 2014).

Após o exame clínico as aves foram submetidas a colheita de sangue, via veia jugular direita. As colheitas foram efetuadas de setembro de 2020 a abril de 2021. Todas as araras dessa espécie foram incluídas no estudo, independente de apresentarem ou não sinais clínicos.

5.4.3 Hemograma

No momento da colheita foram confeccionados esfregaços sanguíneos, sem a presença do anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a fim de garantir melhor preservação da morfologia das células.

O volume globular foi obtido pela técnica de microhematócrito e a hemoglobinometria por Kit comercial pelo método de Drabkin. A hematimetria, leucometria global e a contagem de trombócitos foram realizadas manualmente em câmara hematimétrica, onde foi efetuado diluição com solução de Natt-Herrick, na proporção 1:100. A contagem manual foi realizada conforme estipulado por Almosny e Monteiro (2007).

A leucometria específica (contagem diferencial de leucócitos) foi realizada por microscopia de luz, em esfregaço sanguíneo corado com May-Grunwald-Giemsa, junto a pesquisa de hemoparasitos (*Plasmodium* spp. / *Haemoproteus* spp. e agentes da família Anaplasmataceae) utilizando o aumento de 1000x pela observação de no mínimo 100 campos (BUSH et al., 1997). As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio de refratômetro manual (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007; CAMPBELL, 2014; VANSTREELS; PARSONS, 2014; SCHMIDT, 2014).

5.4.4 Análise molecular

5.4.4.1 Extração de DNA

Após o processamento das amostras, o sangue total restante foi acondicionado em microtubos e mantidos a 20 graus negativos, para posterior extração de DNA. Todas as 19 amostras foram extraídas e submetidas a análise molecular.

A extração de DNA foi realizada a partir de 10 µL de sangue com o auxílio de kit comercial disponível (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNA tiveram suas concentrações determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). A presença de DNA amplificável foi verificada por um ensaio convencional de PCR (cPCR) direcionado ao gene endógeno Beta

actina. Todas as amostras testaram positivas para o gene endógeno e foram submetidas a ensaios de cPCR para agentes Anaplasmatidae e hemossporídeos.

5.4.4.2 Ensaios cPCR e nPCR

Foram realizadas PCR convencional (cPCR) e nested (nPCR) com base no gene citocromo b para agentes *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. A reação foi efetuada utilizando os iniciadores HaemNF-1 e HaemNR3, seguidos por uma segunda reação (*nested*) com os iniciadores HaemF e HaemR2 para amplificação de aproximadamente 480 bp (HELLGREN et al., 2004; BENSCH et al., 2000). Foram utilizados 5 uL de DNA de cada amostra, 0,75U/ μ L Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®), Tampão da PCR que inclui 20mM de Cloreto de Magnésio (PCR Buffer 1 X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl) 0,4 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen®) 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura estéril (*Life Technologies*®) q.s.p. 25 μ L. As reações de nested-PCR, seguiram as mesmas especificações da primeira reação, entretanto foi utilizado 1 μ L do produto amplificado da primeira reação como DNA alvo. Os oligonucleotídeos iniciadores e as condições de termociclagem de cada reação estão descritos na tabela 1.

A reação de amplificação da família Anaplasmatidae, foi baseada no gene 16SrRNA e realizada segundo protocolo descrito por Inokuma et al. (2000), salvo pequenas modificações. Nas reações foram utilizados 5 uL de DNA de cada amostra, 1,25U/ μ L Xtra Platus Taq DNA Polimerase (Sinapse®), Tampão da PCR que inclui 20mM de Cloreto de Magnésio (PCR Buffer 1 X – 20mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl) 0,4 mM de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen®) 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura estéril (*Life Technologies*®) q.s.p. 25 μ L.

Para evitar contaminações dos reagentes e enzimas, foi incluído controles negativos nas reações de amplificação e extração de DNA. No controle negativo da extração e da reação de amplificação, as amostras de DNA foram substituídas por uma quantidade equivalente de água ultrapura esterilizada (Invitrogen®). Todas as reações de PCR contaram com controles positivos específicos para cada agente pesquisado. Foram utilizados controles positivos para hemossporídeos: *Plasmodium* spp. e *Haemoproteus* spp. (WERTHER et al., 2017). *E. canis*, amostra cepa Jaboticabal (NAKAGHI et al., 2008) e *Anaplasma phagocytophilum* (AGUIAR et al., 2007).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% com corrente elétrica de 90 V / 50mA por 90 min. O gel foi corado com brometo de etídio a 1,5% (0,5 μ L/mL) (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA) e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-EyeII Stratagene®).

Para amostras positivas, nas quais apenas uma banda foi observada no gel, o DNA foi purificado diretamente do produto nPCR usando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados pelo método da terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de PCR (tabela 1). O sequenciamento foi conduzido no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems), no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Campus de Jaboticabal).

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores e condições de termociclagem utilizadas nas reações de PCR e nested PCR e detecção molecular de *Plasmodium* spp. /*Haemoproteus* spp. (citocromo b), e família Anaplasmataceae (16SrRNA).

Agentes	Primers	Sequências dos oligonucleotídeos	Condições de termociclagem
<i>Haemoproteus</i> spp., <i>Plasmodium</i> spp. e <i>Leucocytozoon</i> spp. (HELLGREN et al., 2004).	HaemNF-1	5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'	- 94 °c por 3 min; - 20 ciclos: 94 °c por 30s, 50°c por 30s e 72 °c por 45s; - 72 °c por 10 min.
<i>Haemoproteus</i> spp. e <i>Plasmodium</i> spp. (BENSCH et al., 2000).	Haem F Haem R2	5'–ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3' 5'–GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'	- 94 °c por 3 min; - 35 ciclos: 94 °c por 30s, 55°c por 30s e 72 °c por 45s; - 72 °c por 10 min.
Família Anaplasmataceae (INOKUMA et al., 2000).	EHR16SD EHR16SR	5'- GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3' 5'- TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'	- 95°C por 5 min; - 34 ciclos: 95°C por 35s, 55°C por 30s e 72°C por 1:30min; - 72°C por 5 min.

5.4.4.3 Análises filogenéticas

As sequências obtidas foram submetidas a um teste de triagem de qualidade usando Phred-Phrap versão 23 (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) a fim de avaliar a qualidade dos eletroferogramas formados. Foram construídas sequências-consenso, analisando ambas as fitas sense e antisense usando o programa CAP3 (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py>). As comparações com sequências depositadas no GenBank foram feitas usando a ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) (Benson et al., 2002). As sequências foram alinhadas com sequências publicadas no GenBank usando Clustal W em Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). A análise de máxima verossimilhança (ML) foi inferida utilizando o cluster blackbox RaxML (STAMATAKIS et al., 2008). Os suportes dos cladogramas para as análises de máxima verossimilhança foram avaliados através de análises de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 repetições. O modelo de Kimura-3-parâmetros foi usado para calcular as distâncias evolutivas. A edição das árvores filogenéticas assim como o enraizamento (via grupo externo) foram realizados utilizando o programa “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” (MEGA X) versão 10.2.6 (TAMURA et al., 2013).

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Esfregaço sanguíneo

Dentre as 19 lâminas coradas por Giemsa e avaliadas em microscopia de luz (aumento de 1000X), foram encontradas inclusões no interior dos eritrócitos em 2 aves (10.52%). Uma inclusão possibilitou constatar o gênero *Plasmodium* spp., visto que foi identificado a presença de meronte (Figura 1). Já o outro indivíduo, foi enquadrado como *Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp., devido apenas a identificação de gametócitos no interior dos eritrócitos (Figura 2).

Não foram observadas mórulas ou inclusões de agentes da família Anaplasmataceae no interior dos leucócitos e/ou plaquetas. Para cada esfregaço, 100 campos foram examinados, a fim de estimar a ocorrência da infecção (BUSH et al., 1997).

Os dois indivíduos positivos em microscopia, apresentaram baixos níveis de parasitemia (variando de 1 a 3 parasitos / 100 campos microscópicos), com poucos estágios sanguíneos, prejudicando a identificação morfológica do parasito. As aves que apresentaram positividade na detecção direta, também foram positivas no diagnóstico molecular.

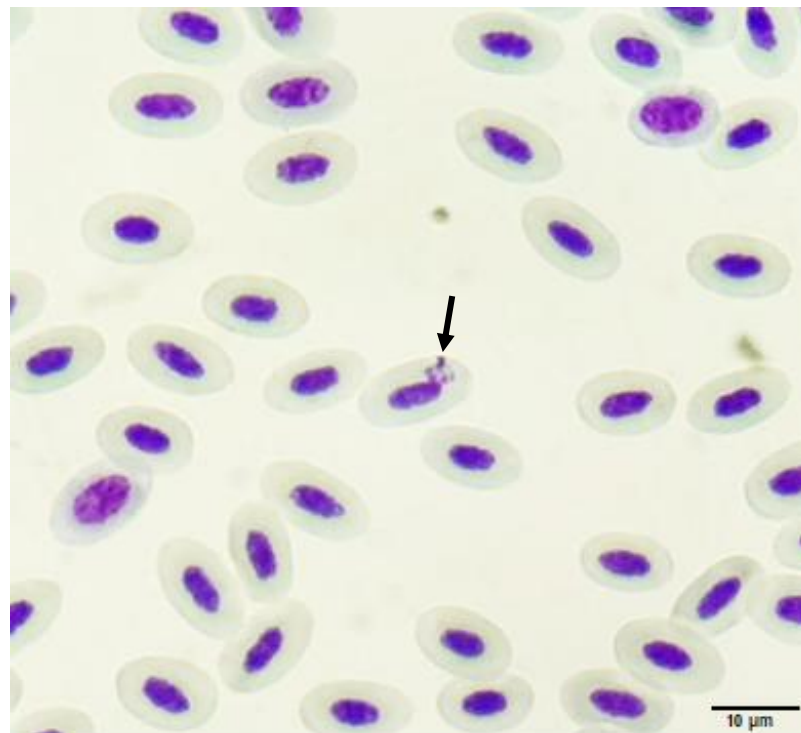


Figura 1. Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de meronte (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*). (Corante Giemsa, 1000x).

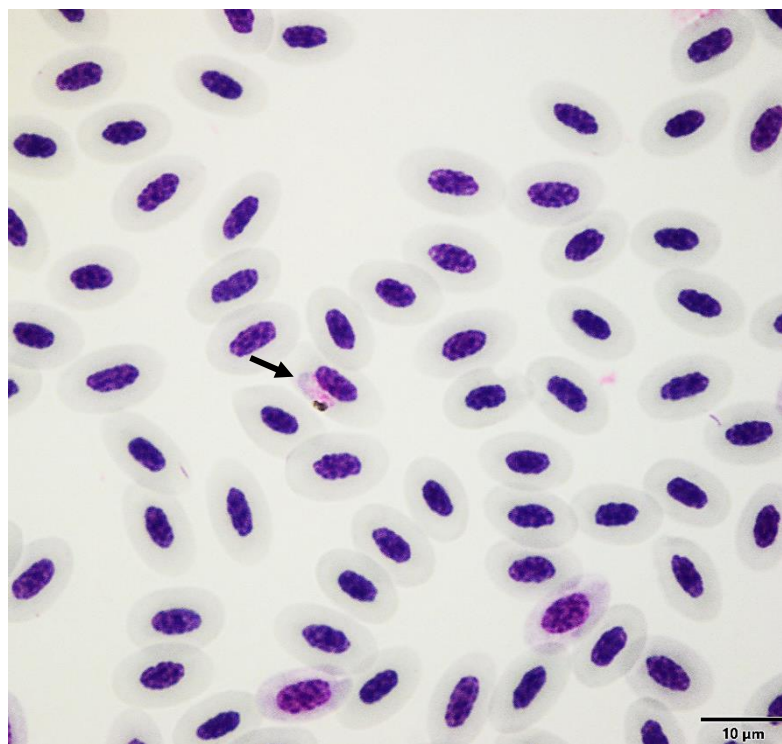


Figura 2. Esfregaço sanguíneo demonstrando presença de gametócito (seta) no interior de um eritrócito, sugestivo de *Plasmodium* spp. / *Haemoproteus* spp., em Arara-canindé (*Ara ararauna*). (Corante Giemsa, 1000x).

5.5.2 Ensaio de PCR (Agentes Anaplasmatáceas e Hemosporídeos), BLAST e análises filogenéticas

As 19 amostras de DNA testadas, foram positivas no ensaio cPCR com base no gene endógeno Beta-actina. Uma (1/19; 5,26%) arara (*Ara ararauna*) foi positivo para agente da família Anaplasmatáceas com base no gene 16SrRNA. No entanto, não foi realizado o sequenciamento para determinar o gênero e espécie do patógeno detectado.

Com base no gene citocromo b, duas (2/19; 10,52%) araras foram positivas para Hemosporídeos, e uma amostra, referente ao indivíduo 17, foi sequenciada. Na análise BLASTn, a sequência apresentou 100% de identidade para *Plasmodium nucleophilum*.

A análise filogenética para *Plasmodium* spp. posicionou a sequência no mesmo clado formado para *P. nucleophilum* em *Ramphastos vitellinus* (Tucano-de-bico-preto) e *Alopochen aegyptiacus* (Ganso-do-Egito) com suporte de ramo de 100% e em ramo separado próximo ao clado para *P. ashfordi*, suporte de 79% (Figura 3).

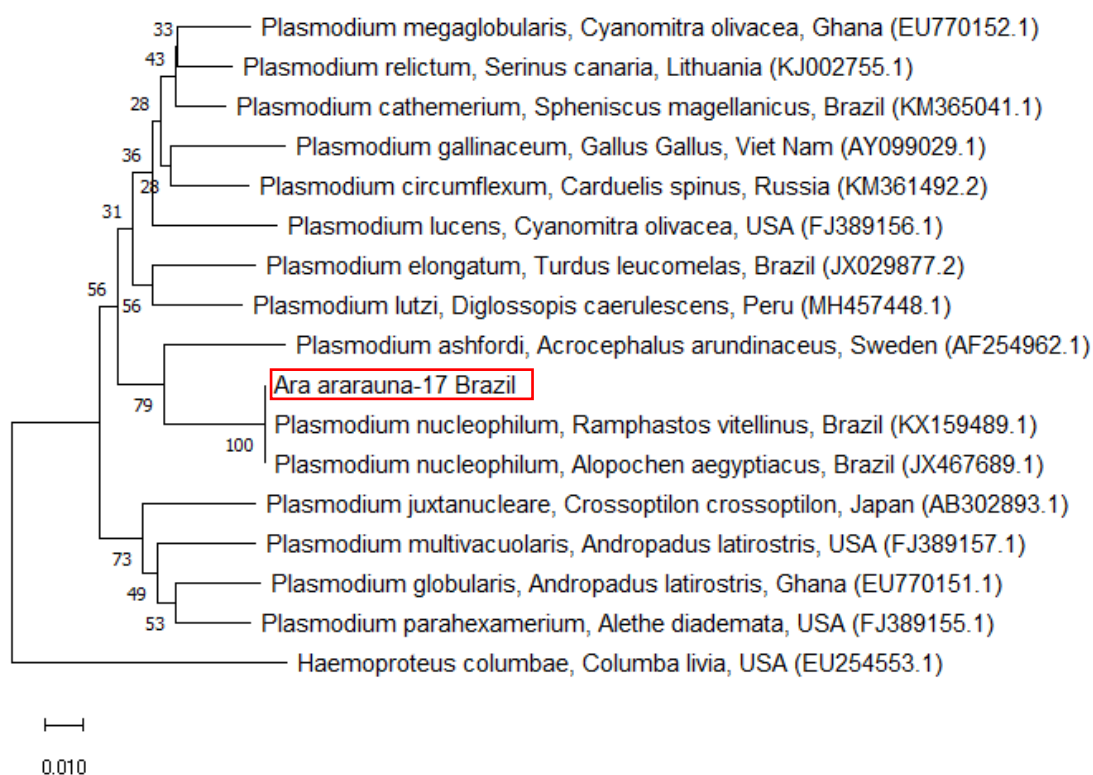


Figura 3. Posição filogenética de seqüências de *Plasmodium* spp. detectadas em espécies de aves, com base no gene mitocondrial citocromo b. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, modelo Kimura-3-parâmetros. As espécies de aves acometidas estão descritas após as espécies dos agentes sequenciados. Os números de acesso do GenBank estão fornecidos entre parênteses. A linhagem apresentada neste trabalho está destacada em vermelho.

5.5.3 Análises hematológicas

Entre os dois indivíduos positivos para os agentes etiológicos pesquisados, dois apresentaram alterações no hemograma. Uma ave positiva para a ordem Haemosporida (*Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp.) apresentou leucocitose (1/3; 33,33%; arara 10) enquanto a outra, positiva para *Plasmodium* intimamente relacionada a linhagem *nucleophilum* desenvolveu anemia associada à leucopenia (1/3; 33,33%; arara 17) (Tabela 2).

No exame clínico, os indivíduos positivos não apresentaram alterações relevantes. Dois deles (2/3; 66,66%) apresentaram baixo escore corporal, e um apresentou arrancamento de pena concomitante.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e proteína plasmática total de Aves (*Ara ararauna*) positivas para *Plasmodium/ Haemoproteus* e/ou agente da família Anaplasmataceae.

Parâmetros hematológicos	Arara 10	Arara 17	Arara 18	<i>Ara ararauna</i>*
Eritrócitos (x10⁶ cel/μL)	2	2.19	2.2	2.7 ± 0.7
Hb (g/dL)	14.4	14.3	15.6	11± 2.9
Hematócrito (%)	45	39	41	40 ± 7.7
VCM (fl)	206.42	178.08	186.36	-
CHCM (g/dL)	32.00	36.67	38.05	-
Leucócitos Totais (cel/μL)	27250	7250	18000	18.9 ± 5.6
Heterófilos (%)	63	61	77	52 ± 10
Eosinófilos (%)	0	0	0	0
Basófilos (%)	0	0	0	0.9 ± 1.3
Linfócitos (%)	25	15	13	42 ± 10
Monócitos (%)	12	24	10	4.3 ± 2.7
Trombócitos estimados (cel/μL)	13000	32000	25000	-
PPT (Refratômetro)	3	4	4	2.5 ± 4.2

Cel/μL: células por microlitro; Hb: Hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; g/dL: grama por decilitro. *Valores de referência Carpenter et al. (2016).

5.6 DISCUSSÃO

Neste estudo, os indivíduos pertencentes a espécie *Ara ararauna* provenientes do CETAS, apresentaram ocorrência de 5,26% (1/19) na detecção molecular (cPCR) baseado no gene 16SrRNA para agente da família Anaplasmataceae (*Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp.). Entretanto, como não foi realizado o sequenciamento e amplificação de fragmentos de outros genes não foi possível obter a detecção específica do agente quanto ao seu gênero e espécie (SACCHI, 2021).

Estudos relacionados a infecções destes patógenos em psitacídeos são escassos, porém no Brasil, Machado et al. (2012) detectaram presença de agentes filogeneticamente relacionados *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* e uma espécie de *Ehrlichia* intimamente relacionada *Ehrlichia canis* em amostras sanguíneas de aves carnívoras, além de uma espécie detectada em ganso, intimamente relacionada *Ehrlichia* observadas em felinos selvagens do Brasil (ANDRÉ et al., 2010), sugerindo que aves silvestres possam participar do ciclo de transmissão destes patógenos entre espécies distintas. Tais achados denotam a importância de estudos adicionais relacionados aos hospedeiros aviários.

Estudo realizado por Sacchi et al. (2021) em aves carnívoras de cativeiro e de vida livre do sudeste brasileiro, detectaram ocorrência de 9,91% para *Anaplasma* spp. e 6,61% para

Ehrlichia spp. em DNA extraído de amostras sanguíneas. Tal ocorrência foi superior quando comparado ao presente estudo (5,26%). Entretanto, esta diferença pode ser explicada pela distinção da ordem e espécies de aves amostradas, visto que, aves carnívoras estão mais expostas aos artrópodes no momento da alimentação, caça, permanecendo no solo por mais tempo (TEIXEIRA et al., 2008), tendo mais chances de adquirirem o patógeno. Outra possibilidade considerada, é a menor incidência do agente na região onde o estudo foi desenvolvido. No entanto, apesar da baixa ocorrência, até o momento não foi verificado agentes da família Anaplasmataceae infectando *Ara ararauna* no Brasil.

Em relação ao diagnóstico direto, via esfregaço sanguíneo, não foram detectadas inclusões sugestivas de agentes da família Anaplasmataceae, o que corrobora com estudos realizados por Werther et al. (2017) e Sacchi et al. (2021). Sugere-se que as aves não desenvolvam bacteremia elevada a ponto de serem observadas inclusões nas células sanguíneas do indivíduo infectado (KEESING et al., 2012; JOHNSTON et al., 2013). Embora Vanstreels et al. (2018) tenham detectado inclusões em eritrócitos do chamado ‘*Candidatus Anaplasma sphenisci*’ em pinguins da África do Sul. Salientando a necessidade de desenvolver mais estudos que pesquise a presença destas formações nas células sanguíneas das aves.

Quanto aos hemosporídeos, os indivíduos (arara 10 e 17) apresentaram positividade em ambos os testes, baseado no gene citocromo b (cPCR) e em esfregaço sanguíneo.

No esfregaço sanguíneo foram encontradas inclusões no interior dos eritrócitos em 2 aves (10,52%). No indivíduo 17 foi possível determinar o gênero, devido a forma evolutiva identificada, tratando-se de um meronte (Figura 1). Segundo Valkiūnas (2005) os estágios sanguíneos do gênero *Plasmodium* são distintos de outros gêneros hemosporídeos, por serem os únicos a apresentarem merogonia eritrocítica. Em contrapartida, não foi possível determinar o gênero do indivíduo 10 devido à baixa parasitemia, neste caso, foi enquadrado apenas como Haemosporida (*Plasmodium* spp. /*Haemoproteus* spp.) (Figura 2).

Os dois indivíduos positivos em microscopia apresentaram baixos níveis de parasitemia (variando de 1 a 3 parasitos/100 campos microscópicos) com poucos estágios sanguíneos, prejudicando a identificação morfológica do parasito, bem como, observado por Belo et al. (2009) e Tostes et al. (2015), no qual a infecção por hemosporídeos apresentou poucas formas de desenvolvimento nas células sanguíneas. Segundo Valkiūnas (2005), baixos níveis de parasitemia podem estar associadas a infecções crônicas para hemosporídeos.

Embora a baixa parasitemia tenha prejudicado a identificação morfológica do agente, a sequência do indivíduo 17 agrupou-se no mesmo clado formado por *P. (Novyella)* linhagem *nucleophilum*, em *Ramphastos vitellinus* (Tucano-de-bico-preto) e *Alopochen aegyptiacus* (Ganso-do-Egito), com suporte de ramo de 100% e em um ramo vizinho ao clado para *P. ashfordi*, suporte de 79% (Fig. 3).

Estas espécies de *Plasmodium* posicionadas no mesmo clado ou próximo a ele, pertencem ao subgênero *Novyella*, no qual é considerado diverso entre os parasitos de *Plasmodium*, representando aproximadamente 40% de todos os casos de malária aviária descritos e, aproximadamente 78% das espécies de *Plasmodium* descobertas durante os últimos 15 anos (VALKIŪNAS; IEZHOVA, 2018).

A ocorrência de hemosporídeos observada neste estudo foi baixa quando comparado aos resultados obtidos por Belo et al. (2009), onde psitacídeos mantidos em parques zoológicos da região sudeste (Minas Gerais) e nordeste (Ceará) apresentaram 36% de positividade para *Plasmodium*, embora na filogenia não tenham presenciado a linhagem *nucleophilum* nestes indivíduos. A distinção de ocorrência entre os estudos pode estar associada a menor incidência do agente na região, ou até mesmo vinculado a concentração insuficiente de DNA do hematozoário, propiciando falsos negativos (RICHARD et al., 2002). Videvall (2019) abordou que a pesquisa genômica e transcriptômica em hemosporídeos aviários é muito desafiadora, devido à maior quantidade de DNA aviário em comparação com o DNA do parasito em

amostras de sangue, além da grande diferença no tamanho do genoma entre o hospedeiro e o parasito, logo, tais fatores podem influenciar no diagnóstico destes patógenos.

Em contrapartida, Sacchi et al. (2021), obtiveram ocorrência menor (3.3%) de indivíduos positivos para hemosporídeos em aves carnívoras do sudeste, sendo detectado *Plasmodium* spp. em apenas uma (0.82%) espécie, *Ictinia plumbea* (gavião-pombo) posicionada próxima a linhagem de *P. paranucleophilum*, *P. nucleophilum* e *P. ashfordi*.

Outros hospedeiros aviários também foram parasitados por *P. nucleophilum* no Brasil, como os pardais-domésticos (*Passer domesticus*), primeira espécie descrita no país infectada por este agente (LUCENA, 1938); em várias espécies de Passeriformes da Mata Atlântica (LACORTE et al., 2013); em *Alopochen aegyptiacus* (CHAGAS et al., 2013); pinguins migrantes da espécie *Spheniscus magellanicus* (VANSTREELS et al., 2015); e em 5 Tucanos obtidos de centros de triagens do sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro) (TOSTES, 2017).

Cabe ressaltar, que um destes tucanos relatados por Tostes (2017) foi amostrado do mesmo local do presente estudo, CETAS, localizado no município de Seropédica-RJ, sugerindo que este patógeno ainda esteja presente nesta área, revelando a potencial transmissão do agente entre diferentes espécies e, constatando o papel destas unidades na propagação destes patógenos, uma vez que possam aumentar a taxa de transmissão entre indivíduos que normalmente não interagiriam.

Esta linhagem, já foi registrada em aproximadamente 108 espécies de aves das mais variadas ordens (TOSTES, 2017). Entretanto, apesar da baixa especificidade deste parasito quanto aos hospedeiros, até o momento não foi registrado ocorrência de *P. nucleophilum* em *Ara ararauna* nas bases de dados MalAvi, e GenBank, apenas 4 espécies incluídas na ordem Psittaciformes foram descritas, sendo em 2 espécies de papagaios reportados por Bennett et al. (1993b); em *Diopsittaca nobilis* (maracanã-nobre), na Guiana (DURRANT et al., 2006) e *Guaruba guarouba* (ararajuba), no Brasil (CHAGAS et al., 2017).

No estudo, algumas alterações hematológicas foram observadas no hemograma das aves positivas. Uma arara desenvolveu anemia (arara 17) associado a leucopenia. Este indivíduo (arara 17) apresentou positividade para *Plasmodium* intimamente relacionado a linhagem *nucleophilum*. Na malária aviária a anemia está associada à destruição de eritrócitos devido ao desenvolvimento de merontes eritrocíticos e a remoção ativa de eritrócitos infectados da circulação pelas células do sistema fagocítico mononuclear (GARNHAM, 1966; SEED; MANWELL, 1977; VALKIUNAS, 2005; CAMPBELL, 2014), o que corrobora com o achado (meronte) identificado no esfregaço sanguíneo deste indivíduo, sugerindo que a causa da anemia possa estar relacionada à infecção por *Plasmodium*.

Ramos (2012) não observou anemia em araras positivas para *Plasmodium* spp. no Distrito Federal, porém, tais alterações dependem da fase de infecção da doença e resposta imunológica do hospedeiro, na qual variações laboratoriais e clínicas encontram-se frequentemente ausentes (SILVEIRA et al., 2009). Quanto a leucometria, alguns pinguins infectados por *Plasmodium* spp. advindos de instituições do sudeste brasileiro também desenvolveram leucopenia (CAMPOS et al., 2014). A leucopenia associada a processos infecciosos e inflamatórios pode ser considerada desfavorável, indicando que a taxa de produção esteja abaixo da demanda (FELDMAN et al., 2000, CUBAS et al., 2014).

Em contrapartida, o indivíduo 10, também positivo para hemosporídeo (*Plasmodium* spp./*Haemoproteus* spp.) apresentou leucocitose ao invés de leucopenia, não sendo observado anemia concomitante. Estudo desenvolvido por Silveira et al. (2009) demonstrou aumento significativo no número médio de leucócitos totais em galinhas infectadas experimentalmente por *P. juxtannucleare*. As causas gerais de leucocitose em aves incluem inflamação, que pode estar associada a causas infecciosas ou não infecciosas (LATIMER et al., 1988; MULCAHY et al., 2007; CLARK; RAIDAL, 2008). Leucocitose de leve a moderada também pode ocorrer com o excesso de glicocorticoides endógenos ou exógenos (leucograma de estresse)

(CAMPBELL, 2014), entretanto, como este foi o único indivíduo a apresentar leucocitose e nenhuma intercorrência ocorreu no momento da colheita sanguínea. Acredita-se que a leucocitose esteja associada a algum processo inflamatório, podendo estar relacionado à infecção ou não.

Vanstreels et al. (2019) ressaltam que os resultados dos parâmetros hematológicos podem variar consideravelmente entre as linhagens de *Plasmodium*. Desta forma, os indivíduos infectados podem apresentar importantes alterações ou nenhuma a depender também de sua resposta imunológica.

Quanto a arara 18, (positiva para agente da família Anaplasmataceae) não foram observadas alterações significativas em seu hemograma, sendo identificado apenas uma heterofilia isolada. Os demais parâmetros permaneceram dentro do intervalo de referência. No entanto, estudos adicionais são necessários a fim de determinarem possíveis alterações hematológicas decorrentes à família Anaplasmataceae em aves e o acometimento de suas células sanguíneas (VANSTREELS et al., 2018).

Diante das análises moleculares e pesquisa em esfregaço sanguíneo foi possível determinar a presença de agentes da família Anaplasmataceae e hemospóridios em araras-canindés provenientes CETAS/IBAMA e, a partir do estudo filogenético à positividade para *Plasmodium* intimamente relacionado a linhagem *nucleophilum*, não registrada até o momento na espécie *Ara ararauna*.

Constatou-se também, anormalidades hematológicas em 66.66% (2/3) dos indivíduos positivos, embora as alterações apresentadas possam não ter sido associadas apenas à infecção, fica evidente a necessidade em associar estas análises as pesquisas moleculares e morfológicas, visto que tais resultados laboratoriais além de refletirem o estado de saúde geral do animal, podem auxiliar na compreensão do curso da infecção.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O estudo demonstrou a ocorrência de hemosporídeos e agentes da família Anaplasmataceae apenas nas araras-canindé provenientes do centro de triagem do IBAMA, Rio de Janeiro. Apesar da baixa ocorrência constatada, os resultados salientam a circulação dos referidos patógenos nesta área e o risco de infecção destes indivíduos devido a exposição a tais agentes, demonstrando a importância na implementação de testes diagnósticos como requisito à destinação à natureza ou instituições privadas, a fim de evitar a disseminação destes agentes etiológicos e impactos à fauna.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. *In vitro* isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 489-493, 2008.
- AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R.Z.; LABRUNA, M.B. Serological diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis with Brazilian antigen of *Ehrlichia canis*. **Cienc. Rural**, v. 37, p. 796–802, 2007.
- AL DABAGH, M.A. Symptomatic partial paralysis in chicks infected with *Plasmodium juxtannucleare*. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 71, p.217–221, 1961.
- ALEKSEEV, A.N.; DUBININA, H.V.; VAN DE POL, I.; SCHOULS, L.M. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. **Clinical Microbiology**, v. 39, n.6, p.2237-2242, 2001.
- ALEKSEEV, N.A.; DUBININA, H.V.; SEMENOV, A.V.; BOLSHAKOV, C.V. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. **J. Med. Entomol.** v.38 p.471-474, 2001.
- ALMOSNY, N. R. P. Patologia Clínica de invertebrados ectotérmicos. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 1736-1766.
- ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 939-966.
- ANDRÉ, M.R.; ADANIA, C.H.; MACHADO, R.Z.; ALLEGRETTI, S.M.; FELIPPE, P.A.N.; SILVA, K.F.; NAKAGHI, A.C.H. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia* spp. in endangered Brazilian wild captive felids. **J. Wildl. Dis.** v.46, p.1017–1023, 2010.
- ANDRÉ, M.R.; BACCARIM DENARDI, N.C.; MARQUES DE SOUSA, K.C.; GONÇALVES, L.R.; HENRIQUE, P.C.; GROSSE ROSSI ONTIVERO, C.R.; LIMA GONZALEZ, I.H.; CABRAL NERY, C.V.; FERNANDES CHAGAS, C.R.; MONTICELLI, C.; ALEXANDRE DE SANTIS, A.C.; MACHADO, R.Z. Arthropod-borne pathogens circulating in free-roaming domestic cats in a zoo environment in Brazil. **Ticks and Tickborne Diseases**, v. 5, n.5, p. 545-551, 2014.
- ANDRÉ, M.R; DUMLER, J.S.; SCORPIO, D.G.; TEIXEIRA, R.H.; ALLEGRETTI, S.M.; MACHADO, R.Z. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.3, n.4, p. 247-253, 2012.
- ATKINSON C.T.; DUSEK R.J.; LEASE J.K. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii amakihi. **Journal of Wildlife Diseases**. v.37, p.20-27, 2001.
- ATKINSON, C.T. Avian Malaria. In: ATKINSON, C. T.; THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B. **Parasitic Diseases of Wild Birds**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. p. 35-53.

- ATKINSON, C.T. Avian malaria. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D.; ATKINSON, C. T. **Infectious diseases of wild birds**. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 35–53.
- ATKINSON, C.T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon and Haemoproteus. In: LOYE, J.E.; ZUK, M. **Bird parasite interactions**. Oxford: Oxford University Press, 1991. p. 19-48.
- ATKINSON, K. L.; WOODS, R. J.; DUSEK, L. S. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iiwi (*Vestiaria coccinea*). **Parasitology**, [s. l.], v.11, p.59-69, 1995.
- AYRES, M. et al. Bioestat 5.0 **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.
- BARRIENTOS, R.; VALERA, F.; BARBOSA, A.; CARRILLO, C. M.; MORENO, E. Biogeography of haemoparasites and ectoparasites of an arid-land bird, the Trumpeter finch. **Journal of Ari Environments**. [s. l.], v. 106, p.11-17, 2014.
- BEADELL, J. S.; COVAS, R.; GEBHARD, C.; ISHTIAQ, F.; MELO, M.; SCHMIDT, B. K.; PERKINS, S. L.; GRAVES, G. R.; FLEISCHER, R. C. Host associations and evolutionary relationships of avian blood parasites from West Africa. **International Journal Parasitology**. [s. l.], v.39, p. 257-266, 2009.
- BELO, N.O.; PASSOS, L.F.; JÚNIOR, L.M.C.; GOULART, C.E.; SHERLOCK, T.M.; BRAGA, E.M. Avian malaria in captive psittacine birds: detection by microscopy and 18S rRNA gene amplification. **Prev. Vet. Med**, [s. l.], v.88, p.220–224, 2009.
- BENNETT, G. F.; GARNHAM, P.C.C.; FALLIS, A.M. On the status of the genera *Leucocytozoon* Ziemann, 1898 and *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporidiida: 82 Leucocytozooidae and Haemoproteidae). **Canadian Journal of Zoology**, [s. l.], v.43, p.927–932, 1965.
- BENNETT, G. F.; PEIRCE, M.A.; ASHFORD, R. W. Avian haematozoa: Mortality and pathogenicity. **Journal of Natural History**, [s. l.], v. 27, p. 993–1001, 1993.
- BENNETT, G.F.; BISHOP, M.A.; PEIRCE, M.A. Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. **Systematic Parasitology**, [s. l.], v. 26, p. 171-179, 1993b.
- BENSCH, S.; HELLGREN, O.; PÉREZ-TRIS, J. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. **Molecular Ecology Resources**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1353–1358, 2009.
- BENSCH, S.; PEÉREZ-TRIS, J.; WALDENSTRÖM, J.; HELLGREN, O. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? **Evolution**, [s. l.], v. 58, n. 7, p. 1617–1621, 2004.
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; ÖSTMAN, O.; HANSSON, B.; WESTERDAHL, H.; PINHEIRO, R. T. Host specificity in avian blood parasites: A study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. **Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 267, p. 1583–1589, 2000.
- BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I. **GenBank. Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 1, p.17-20, 2002.

BJÖERSDORFF, A.; BERGSTROM, S.; MASSUNG, R.F.; HAEMIG, P.D.; OLSEN, B. *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 7, p.877–879, 2001.

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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v.106, n.1, p.3-11, 2011.

BRASIL. **Lei Nº 5197 de 3 de Janeiro de 1967, art1º**. [S.I.:s.n], 1967. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/15197.htm>. Acesso em: 11 Setembro. 2021.

BRASIL. **Lei Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998**. [S.I.:s.n], 1998. Disponível em:< http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm>. Acesso em: 11 Setembro. 2021.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v.83, n.4, p. 575–583, 1997.

CABEZAS-CRUZ, A.; ZWEYGARTH, E.; VANCOVÁ, M.; BRONISZEWSKA, M.; GRUBHOFFER, L.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; ALBERDI, P. DE LA FUENTE, J. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, p. 1426-1430, 2016.

CAMPBELL, T.W. **Avian Hematology and Cytology**. 2 ed. Iowa: State University Press, 1995.

CAMPBELL, T.W. Hematologia de Aves. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 205-238.

CAMPOS, S.D.E.; PIRES, J.R; NASCIMENTO, C.L.; DUTRA, G.; TORRES-FILHO, R.A; TOMA, H.K; BRENER, B.; ALMOSNY, N.R.P. Analysis of hematologic and serum chemistry values of *Spheniscus magellanicus* with molecular detection of avian malarial parasites (*Plasmodium* spp.). **Pesq. Vet. Bras.** [s. l.], v.34, n.12, p.1236-1242, 2014.

CARLSON, J. S., MARTÍNEZ-GÓMEZ, J. E., VALKIŪNAS, G., LOISEAU, C., BELL, D. A. & SEHGAL, R. N. M. J. Diversity and phylogenetic relationships of hemosporidian parasites in birds of Socorro Island, México, and their role in the re-introduction of the socorro dove (*Zenaida graysoni*). **Journal of Parasitology**. [s. l.], v.99, n.2, p. 270–276, 2013.

CHAGAS, C.R.F.; VALKIŪNAS, G.; DE OLIVEIRA GUIMARÃES, L.; MONTEIRO, E.F.; GUIDA, F.J.V.; SIMÕES, R.F.; RODRIGUES, P.T.; DE ALBUQUERQUE LUNA, E.J.; KIRCHGATTER, K. Diversity and distribution of avian malaria and related haemosporidian parasites in captive birds from a Brazilian megalopolis. **Malaria Journal**, [s. l.], v.16, p.83, 2017.

CHAGAS, C.R.F.; VALKIŪNAS, G.; NERY, C.V.C.; HENRIQUE, P.C.; GONZALEZ, I.H.L.; MONTEIRO, E.F.; GUIMARÃES, L.O.; ROMANO, C.M.; KIRCHGATTER, K. *Plasmodium (Novyella) nucleophilum* from an Egyptian Goose in São Paulo Zoo, Brazil: microscopic confirmation and molecular characterization. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], v. 2, p. 286-291, 2013.

CLARK, P.; BOARDMAN, W. S. J.; RAIDAL, S. R. **Atlas of Clinical Avian Hematology**. Blackwell, 2009.

CLARK, P.; RAIDAL, S.R. Haematological indicators of inflammation exhibited by Australian Falconiformes. **Comp. Clin. Pathol.** [s. l.], v.18, p.1–6, 2008.

COLLAR, N. J. Family psittacidae (parrots). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world**. Barcelona: Lynx, 1997.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. Lista das aves do Brasil. 12. ed. Disponível em: <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em 25 agosto. 2020.

COX, F. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v.3, n.5. p. 2-9, 2010.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2014.

DANIELS, T.J.; BATTALY, G.R.; LIVERIS, D., et al. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v.8, p. 1524–1525, 2002.

DANILEWSKY, B. Zur Parasitologie des Blutes. **Biologisches Zentralblatt**, Leipzig, v.5, p.529-537, 1886.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, O. Vector-borne zoonoses. In: SING, Andreas. **Zoonoses: infections affecting humans and animals—a focus on public health aspects**. Springer: Netherlands, 2015. p. 683–695.

DAVIS, A.K.; DEVORE, J.L.; MILANOVICH, J.; CECALA, K.; MAERZ, J.C.; YABSLEY, M.J.; New Findings from an Old Pathogen: Intraerythrocytic Bacteria (Family Anaplasmataceae) in Red-Backed Salamanders *Plethodon cinereus*. **EcoHealth**, [s. l.], v.6, p.219–228, 2009.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; Brey, R. Carrapatos voadores: associações desenvolvidas no passado que constituem um risco de propagação de doenças infecciosas. **Vetores parasitas**. [s. l.], v.8 p.538, 2015.

DIETERIEN-LIEVRE, F. Birds. In: RAWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. **Vertebrate Blood Cells**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1988. p.257–336.

DINGLER, R.J.; WRIGHT, S.A.; DONOHUE, A.M.; MACEDO, P.A.; Foley, J.E. Surveillance for *Ixodes pacificus* and the tick-borne pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in birds from California's Inner Coast Range. **Ticks Tick-Borne Dis**, [s. l.], v.5, p.436–445, 2014.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; STUART, C.R.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE

agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. [s. l.], v.51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DURRANT, K. L.; BEADELL, J. S.; ISHTIAQ, F.; GRAVES, G.R.; OLSON, S. L.; GERING, E.; PEIRCE, M. A.; MILENSKY, C. M.; SCHMIDT, B. K.; GEBHARD, C.; FLEISCHER, R. Avian hematozoa in South America: a comparison of temperate and tropical zones. **Ornithological Monographs**. [s. l.], v.60, p.98–111, 2006.

ERWIN, J.A.; FITAK, R.R.; DWYER, J.F.; MORRISON, J.L.; CULVER, M. Molecular detection of bacteria in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in northern crested caracaras (*Caracara cheriway*). **Ticks Tick Borne Dis**. [s. l.], v.7, p.470–474, 2016.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**. [s. l.], v.8, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**. [s. l.], v.8, n.3, p.175-185, 1998.

EWING, S.A. Canine ehrlichiosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, San Diego, v.13, p.331-353, 1969.

FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Island and taxon effects in parasitism revisited: Avian malaria in the Lesser Antilles. **Evolution**. Missouri, v. 57, n. 3, p.606–615, 2003.

FECCHIO, A. **Prevalência, diversidade e estrutura da comunidade de hemoparasitos (*Haemoproteus e Plasmodium*) em aves do cerrado do Brasil**. 2011. Tese (doutorado em Biologia Animal) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, [s. l.], v.39, p.783-791, 1985.

FERQUEL, E.; GARNIER, M.; MARIE, J.; BERNÈDE-BAUDUIN, C.; BARANTON, G.; PÉREZ-EID, C.; POSTIC, D. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 3074-3078, 2006.

FÖLDVÁRI, G.; FARKAS, R. Ixodid tick species attaching to dogs Hungary. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v.129, p. 125-131, 2005.

FORSYTH, J. M. **Parrots of the world**. New Jersey: Princeton University Press, 2010.

FOWLER, G. S.; FOWLER, M. E. Order Sphenisciformes (Penguins). In: FOWLER, M.E.; CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**, 2001. p. 63.

FROMONT, E. **Hematologie et Parasites Sanguins des Rapaces. Étude chez des Oiseaux en Rehabilitation.** 1993. Tese (Doutorado em Veterinária) École Nationale Veterinaire de Lyon, Lyon, 1993.

GARNHAM, P. C. C. **Malaria parasites and other Haemosporidia.** Oxford: Black-well, 1966.

GODOY, S.N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.** São Paulo: Roca, 2006. p. 222-251.

GOFTON, A.W.; DOGGETT, S.; RATCHFORD, A.; RYAN, U.; IRWIN, P. IRWIN. Phylogenetic characterisation of two novel Anaplasmataceae from Australian *Ixodes holocyclus* ticks: "*Candidatus* Neoehrlichia australis" and "*Candidatus* Neoehrlichia arcana **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, [s. l.], v.66, p. 1-6, 2016.

GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R.; BICKNESE, E. J. Evaluation of serum chemistry values associated with avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Parasitology Research.** [s. l.], v. 81, n. 4, p.316-319, 1995.

GRAJAL, A. The Neotropics (Americas). In: SNYDER, N.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. Parrots. **Status survey and conservation action plan: The World Conservation Union (IUCN), Gland.** Switzerland & Cambridge: Oxford, 2000. p. 98-151.

GRESPLAN, A; RASO, T. F. Psittaciformes (Araras, Papagaios, Periquitos, Calopsitas e Cacatuas). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.** São Paulo: Roca. 2014. p. 614-656.

GRIM, C.K.; MERWE, V.E.; SULLIVAN, M.; PARSONS, N.; McCUTCHAN, T.F.; CRANFIELD, M. Plasmodium juxtannucleare associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. **J. Zoo Wild. Med.** [s. l.], v.34, p.250–255, 2003.

GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.36, n.1, p.937-940, 1975.

GUEDES, N. M. R. **Araras Azuis: 15 Anos de Estudos no Pantanal.** IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, Corumbá-MS, 2004.

GUEDES, N.M.R.; SCHERER, P.N. Order Psittaciformes (Parrots, Macaws, Conures). In: FOWLER, M.; CUBAS, Z.S. **Biology, Medicine and Surgery of South Wild Animals.** [S. l.]: Iowa State University, 2001. p. 146-209.

HALL., T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 _ 98 _ NT. **Nucleic Acids Symposium**, [s. l.], v.41, p. 95-98,1999.

HARCOURT-BROWN, N. V. Aves psitaciformes. In: TULLY, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. **Clínica de Aves.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 312-377.

HARR, K. E. Diagnostic Value of Biochemistry. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical Avian Medicine.** Flórida: Spix Publishing, 2006. p. 616.

HARTELT, K.; OEHME, R.; FRANK, H.; BROCKMANN, S.O.; HASSLER, D.; KIMMIG, P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia*

sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in southern Germany. **Int. J. Med. Microbiol.** [s. l.], v.293, n.37, p.86-92, 2004.

HARVEY, J.W.; SIMPSON, C.F.; GASKIN, J.M. Cyclic Thrombocytopenia Induced by a *Rickettsia*-Like Agent in Dogs. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.137, n.2, p.182-188, 1978.

HELLGREN, O.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, e *Haemoproteus* from avian blood. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v.90, n.4, p.797-802, 2004.

HEYLEN, D.; ADRIAENSEN, F.; VAN DONGEN, S.; SPRONG, H.; MATTHYSEN, E. Ecological factors that determine *Ixodes ricinus* tick burdens in the great tit (*Parus major*), an avian reservoir of *Borrelia burgdorferi* **Int J Parasitol**, [s. l.], v.43, p.603-611, 2013.

HILDEBRANDT, A.; FRANKE, J.; MEIER, F. et al. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. ticks. **Tick Borne Diseases**, [s. l.], v.1, p.105–107, 2010.

IBAMA, Instrução Normativa IBAMA nº 179, 2008. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao>>. Acesso em: 30 agos. 2020.

IBAMA, Instrução Normativa IBAMA nº 23, 2014. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32094529/do1-2015-01-02-instrucao-normativa-n-23-de-31-de-dezembro-de-2014-32094512>. Acesso em: 11 setembro. 2021.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 38, p. 4219–4221, 2000.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red list of threatened species. Version 2020.2. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 25 agos. 2021.

IOANNOU, I.; CHOCHLAKIS, D.; KASINIS, N.; ANAYIOTOS, P.; LYSSANDROU, A.; PAPADOPOULOS, B.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A. Carriage of *Rickettsia* spp. *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v.15, n.2, p.158-160, 2009.

JARVI, S. I.; SCHULTZ, J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 153-158, 2002.

JOHNSTON, E.; TSAO, J.I.; MUÑOZ, J.D.; OWEN, J. *Anaplasma phagocytophilum* infection in American robins and gray catbirds: an assessment of reservoir competence and disease in captive wildlife. **J. Med. Entomol.** [s. l.], v.50, p.163–170, 2013.

KEESING, F.; HERSH, M.H.; TIBBETTS, M.; MCHENRY, D.J.; DUERR, S.; BRUNNER, J.; KILLILEA, M.; LOGIUDICE, K.; OSTFELD, R.S. et al. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg. Infect. Dis.** [s. l.], v.18, p.2013–2016, 2012.

KRIŽANAUSKIENĖ, A.; IEZHOVA, T.A.; SEHGAL, R.N.M.; CARLSON, J.S.; PALINAUSKAS, V.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Molecular characterization of *Haemoproteus sacharovi* (Haemosporida, Haemoproteidae), a common parasite of columbiform birds, with remarks on classification of haemoproteids of doves and pigeons. **Zootaxa**, [s. l.], v.3613, n.1, p.85–94, 2013.

KRONE, O.; WALDENSTRÖM, J.; VALKIUNAS, G.; LESSOW, O.; MÜLLER, K.; IEZHOVA, T. A.; FICKEL, J.; BENSCH, S. Haemosporidian Blood Parasites In European Birds Of Prey And Owls. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 709–715, 2008.

KRUSE, W. Ueber Blutparasiten. **Archiv fun Pathologische Anatomie und Physiologie und fur Klinnische Medizin**, [s. l.], v.121, p.359–372, p.453–485, 1890.

LACORTE, G.A.; FÉLIX, G.M.F.; PINHEIRO, R.R.B.; CHAVES, A.V.; ALMEIDA-NETO, G.; NEVES, F.S.; LEITE, L.O.; SANTOS, F.R.; BRAGA, E.M. Exploring the diversity and distribution of neotropical avian malaria parasites– a molecular survey from southeast Brazil. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n.3, p. 57770, 2013.

LATIMER, K.S.; TANG, K.N.; GOODWIN, M.A. Leukocyte changes associated with acute inflammation in chickens. **Avian Dis**, [s. l.], v.32, p.760–72, 1998.

LI, J.; WITZ, R.A.; McCONKEY, G.A.; SATTABONGKOT, J.; WATER, A.P.; ROGERS, M.J.; McCUTCHAN, T.F. Plasmodium: genus-conserved primers for species identification and quantification. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 81, p. 182-190, 1995.

LOCKHART, J. M.; DAVIDSON, W. R.; STALLKNECHT, D. E.; DAWSON, J. E.; HOWERTH, E. W. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p.1681-1686, 1997.

LUCENA, D.T. Malaria aviaria. III — Da presença dos *Plasmodium praecox*, *nucleophilum* e *vaughani* em pássaros de São Paulo. **Folha Médica**, [s. l.], v. 19, n.34, p. 404-406, 1938.

MACHADO, A. B. M.; DRUMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008.

MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R.; WERTHER, K.; SOUSA, E.; GAVIOLI, F.A.; ALVES JÚNIOR, J.R.F. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* Species? **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v.12, n.8, p. 705-708, 2012.

MACHADO, R.Z.; DUARTE, J.M.; DAGNONE, A.S.; SZABÓ, M.P. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, p. 262-266, 2006.

MANTILLA, J.S.; GONZÁLEZ A.D.; LOTTA, I.A.; MOENS, M.; PACHECO, M.A.; ESCALANTE, A.A.; VALKIŪNAS, G.; MONCADA, L.I.; PÉREZ-TRIS, J.; MATTA, N.E. *Haemoproteus erythrogravidus* n. sp. (Haemosporida, Haemoproteidae): Description and molecular characterization of a widespread blood parasite of birds in South America. **Acta Tropica**, [s. l.], v.159, p.83–94, 2016.

- MARCONDES, C.B. Generalidades e Importância das Doenças Relacionadas com Artrópodes. In: MARCONDES, C.B. **Doenças transmitidas e causadas por artrópodes**, [s. l.], 2009. p.1-3.
- MARTIN A.R., BROWN, G.K., DUNSTAN, R.H., ROBERTS, T.K. *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v.109, p.176-180, 2005.
- MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.1090-1095, 1998.
- MCDADE, J.E. Ehrlichiosis – A disease of animals and humans. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v.161, p. 609-617, 1990.
- MENDES, F.L.S. Apreensão de aves silvestres brasileiras que foram exportadas ilegalmente para Portugal. **Revista Brasileira de Zootecias, Brasil**, [s. l.], v. 1, n. 19, p.56-66, 2018.
- MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Série – Biologia molecular. Atualização Parte 2 – Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, [s. l.], v.2, n.2, p.139-142, 2004.
- MULCAHY, M.D.; BUREK, K.A.; ESTER, D. Inflammatory reaction to fabric collars from percutaneous antennas attached to intracoelomic radio transmitters implanted in Harlequin ducks (*Histrionicus histrionicus*). **J. Avian Med. Surg.** [s. l.], v.21, p.13–21, 2007.
- NAKAGHI, A.C.H; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Clinical, hematological, serological and molecular survey of canine ehrlichiosis. **Ciência Rural**, [s. l.], v.38, n.3, p.766-770, 2008.
- OGDEN, N. H.; LINDSAY, L. R.; HANINCOVA, K.; BARKER, I. K.; BIGRAS-POULIN, M.; CHARRON, D. F.; HEAGY, A.; FRANCIS, C. M.; O’CALLAGHAN, C. J.; SCHWARTZ, I.; THOMPSON, R. A. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v.74, n.6, p.1780–1790, 2008.
- OLSEN, G.J; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, [s. l.], v.7, p.113–123, 1993.
- PADDOCK, C. D.; LANE, R. S.; STAPLES, J. E.; LABRUNA, M. B. Changing paradigms for tick-borne diseases in the Americas, p. 221–257. In: **Global health impacts of vector-borne diseases: workshop summary**. Washington: National academies Press, 2016.
- PADDOCK, C.D.; CHILDS, J.E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.16, n.1, p.37-64, 2003.
- PALINAUSKAS, V.; KOSAREV, V.; SHAPOVAL, A.; BENSCH, S.; VALKIŪNAS, G. Comparison of mitochondrial cytochrome *b* lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida: Plasmodiidae). **Zootaxa**, [s. l.], v.1626, p.39–50, 2007.
- PARAENSE, W. L. A Fragment of Malaria History. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 99, n.4, p. 439-442, 2004.

PARAENSE, W.L. O ciclo eritrocitário dos parasitos da malária. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. [s. l.], v. 47, n. 3, 1944.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiological Reviews**, [s. l.], v.18, p.719-756, 2005.

PAROLA, P.; RAOULT, T. D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v.32, n.6, p.897-928, 2001.

PEIRCE, M. A. Infectious disease – Hemoparasites. In: SAMOUR, J. **Avian Medicine**. Philadelphia, PA: Elsevier. 2008. p 337-342.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; XIONG, Q.; RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Science**, [s. l.], v.1078, n.1, p.110-117, 2006.

PÉREZ-TRIS, J.; HASSELQUIST, D.; HELLGREN, O.; KRIZANAUSKIENE, A.; WALDENSTRÖM, J.; BENSCH, S. What are malaria parasites? **Trends In Parasitology**, [s. l.], v. 21, p. 209-211, 2005.

PERLO, B. V. **A Field Guide to the Birds of Brazil**. New York: Oxford University Press, 2009.

PITARELLI, A.; PEREIRA, M. Dieta de aves na região leste do Mato Grosso do Sul. **Ararajuba**. [s. l.], v.10, p.131-139, 2002.

RAMOS, R.R. **Estudo da Infecção por *Plasmodium* spp. em Araras Mantidas em Cativeiro no DF**. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

REMPLE, J. D. Intracellular Hematozoa of Raptors: A Review and Update. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 75-88, 2004.

RENCTAS (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres). 1º Relatório Nacional sobre o Tráfico da Fauna Silvestre. Brasília, DF: RENCTAS, 2001. Disponível em: <http://www.renctas.org.br/files/REL_RENCTAS_pt_final.pdf>. Acesso em: 26 de outubro. 2021.

RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S.; MARINE, M. Â.; VAGO, A. R.; BRAGA, E. M. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. **Parasitology**, [s. l.], v. 130, p. 261-267, 2005.

RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 88, p. 819-822, 2002.

RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. Diversification and host switching in avian malaria parasites. **Proceedings of the Royal Society of London B**. [s. l.], v.269, p.885-892, 2002.

RICKLEFS, R.E. Host–pathogen coevolution, secondary sympatry and species diversification. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, [s. l.], v. 365, p. 1139–1147, 2010.

RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Ehrlichieae. In: KREIG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey’s manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkings, 1984. p.704-709.

RYMASZEWSKA, A.; ADAMSKA, M. Participation of *Ixodes ricinus* developmental stages in transmission of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*. **Wiad. Parazytol.**, [s. l.], v.50, n. 3, p. 563-569, 2004.

SACCHI, A.B.V.; ANDRÉ, M.R.; CALCHI, A.C.; SANTI, M.; GUIMARÃES, A.; PIRES, J.R.; BALDANI, C.D.; WERTHER, K.; MACHADO, R.Z. Molecular and serological detection of arthropod-borne pathogens in carnivorous birds from Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, Jaboticabal, v. 23 p.100539, 2021.

SACCHI, A.B.V.; DUARTE, J.M.B.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], v.35, p.325– 334, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.

SANTIAGO-ALARCON, D.; PALINAUSKAS, V.; SCHAEFER, H.M. Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. **Biological Reviews**, [s. l.], v.87, n.4, p. 928–64, 2012.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D., THOME, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.23, n.4, p.770-774, 2011.

SANTOS, L. C.; CUBAS, P. H. Colheita e Conservação de Amostras Biológicas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 1690-1702.

SANTOS, L. C.; CUBAS, P. H. Colheita e Conservação de Amostras Biológicas. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 930-938.

SCHMIDT, E. M. S. Patologia Clínica de Aves. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 1715-1735.

SCHRENZEL, M.D.; MAALOUF, G.A.; KEENER, L.L.; GAFFNEY, P.M. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. **J. Parasitol.** [s. l.], v.89, p.1025–1033, 2003.

SEBAIO, F.; BRAGA, E.M.; BRANQUINHO, F.; FECCHIO, A.; MARINI, M.A. Blood parasites in passerine birds from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 7-15, 2012.

SEED, T.M.; MANWELL, R.D. Plasmodia of birds. In: Kreier, J.P. **Parasitic Protozoa**. New York: Academic Press, 1997, p.311–357.

SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Host specificity and incidence of Trypanosoma in some African rainforest birds: a molecular approach. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 10, p. 2319-2327, 2001.

SHAW, S.E.; BIRTLES, R.J.; DAY, M.J. Review: Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [s. l.], v.3, n.4, p.193-209, 2001.

SHERMAN, I. W. **Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection**. Washington: ASM, 1998.

SHIBATA, S. I.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WATANABE, Y.; SUTO, C.; ITO, T. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v.38, p.1331-1338, 2000.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001.

SILVA, E.M.; OLIVEIRA, E.L.R.; LIMA, V.F.S.; BORGES, J.C.G.; PORTO, W.J.N. Aves silvestres comercializadas ilegalmente em feiras livres da cidade de Arapiraca, Alagoas. **Enciclopédia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 2045-2055, 2015.

SILVA, L.G. **Determinação da prevalência de infecção, por meio da identificação por microscopia óptica, das espécies do gênero *Plasmodium* em araras canindé (*Ara ararauna*) mantidas em cativeiro no Estado do Rio de Janeiro e seus achados no hemograma e bioquímicas séricas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Clínica e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2011.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; DE-SOUZA, M.T **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 2003. p. 99-100.

SILVEIRA, J.A.G.; RABELO, E.M.L.; LIMA, P.C.S.; CHAVES, B.N.; RIBEIRO, M.F.B. Post-mortem hemoparasites detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** [s. l.], v.23, p.206–215, 2014.

SILVEIRA, P.; DAMATTA, R.A.; DAGOSTO, M. Hematological changes of chickens experimentally infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 162, p. 257–262, 2009.

SILVEIRA, P; MARIN, S.Y.G; MOREIRA, P.A, TOCANTINS, B.B; LACORTE, G; PAIXÃO, T.A; MARTINS, N.R.S; BRAGA, E.M. Interactions of *Plasmodium juxtannucleare* and chicken anaemia virus: establishing a model. **Parasitology**, [s. l.], v. 140, p. 1777-1788, 2013.

SKOTARCZAK, B.; RYMASZEWSKA, A.; WODECKA, B.; SAWCZUK, M.; ADAMSKA, M.; MACIEJEWSKA, A. PCR detection of granulocytic Anaplasma and Babesia in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. **Ann Agric Environ Med.** [s. l.], v.13, n.3, p.21, 2006.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic bacteria. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.37, n.2, p.119-125, 1976.

SOULSBY, E. J. L. **Helminths, Arthropods, and Protozoa of Domesticated Animals**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982.

STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. **Syst. Biol.** [s. l.], v.57, p.758-771, 2008.

SULLIVAN, D. J.; KRISHNA, S. **Malaria: drugs, disease and post-genomic biology**. Berlin: Springer, 2005.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, [s. l.], v.30, n.12, p.2725-2729, 2013.

TATE, C.M.; HOWETH, E.W.; MEAD, D.G.; DUGAN, V.G.; LUTTRELL, M.P.; SAHORA, A.I.; MUNDERLOH, U.G.; DAVIDSON, W.R.; YABSLEY, M.J. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Ticks and Tick-borne Diseases**. [s. l.], v.4, p.110-119, 2013.

TEIXEIRA, R.H.F.; FERREIRA, I.; AMORIM, M.; GAZETA, G.S.; SERRA-FREIRE, N.M. Ticks em wild fowls at Sorocaba-São Paulo state. Brazil. Arq. **Bras. Med. Vet. Zootec.** [s. l.], v.60, p.1277-1280, 2008.

TELFORD, S. R. **The hemoparasites of the reptilian**. Boca Raton: CRC, 2009.

THRALL, M. A. Classification of and diagnostic approach to anemian. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2. ed. Ames IO: John Wiley & Sons, 2012. p. 75-80.

TOSTES, R.C. **Caracterização morfológica e molecular de Plasmodium spp. (Apicomplexa, Haemosporida) em aves de fragmentos da Mata Atlântica**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

TOSTES, R.C.; DIAS, R.J.P.; OLIVEIRA, L.; SENRA, M.V.; MASSARD, C.L.; D'AGOSTO, M. Molecular and morphological characterization of a brazilian lineage of *Plasmodium (Novyella) unalis* in *Turdus* spp. (Passeriformes) of the Atlantic Forest, with remarks on new hosts and high genetic variation. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 104, p. 70-78, 2018.

TOSTES, R.C.; VASHIST, U.; SCOPEL, K.K.G.; MASSARD, C.L.; DAEMON, E.; D'Agosto, M. *Plasmodium* spp. and *Haemoproteus* spp. infection in birds of the Brazilian Atlantic Forest detected by microscopy and polymerase chain reaction. **Pesq. Vet. Bras.** [s. l.], v.35, n.1, p.67-74, 2015.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEISS, D. J.; WARDDROP, K. J. **Scham's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2009. p.152-161.

VÁCLAV, R.; FICOVÁ, M.; PROKOP, P.; BETÁKOVÁ, T. Associations between coinfection prevalence of *Borrelia lusitaniae*, *Anaplasma* sp., and *Rickettsia* sp. in hard ticks feeding on reptile hosts. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 61, p. 245-253, 2011.

VALERA, F.; CARRILLO, C.; BARBOSA, A.; MORENO, E. Low prevalence of haematozoa in Trumpeter finches *Bucanetes githagineus* from south-eastern Spain: additional support for a restricted distribution of blood parasites in arid lands. **Journal of Arid Environments**, [s. l.], v. 55, p. 209-213, 2003.

- VALKIŪNAS, G. **Avian malaria parasites and other Haemosporidia**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A. Exo-erythrocytic development of avian malaria and related haemosporidian parasites. **Malaria Journal**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 101-125, 2017
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; KRIZANAUSKIENĖ, A.; PALINAUSKAS, V.; SEHGAL, R. N. M.; BENSCH, S. A comparative analysis of microscopy and pcr-based detection methods for blood parasites. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 1395-1401, 2008.
- VALKIŪNAS, G.; IEZHOVA, T.A. Keys to the avian malaria parasites. **Malaria Journal**, [s. l.], v.17, p.212, 2018.
- VALKIŪNAS, G.; PALINAUSKAS, V.; ILGŪNAS, M.; BUKAUSKAITĖ, D.; DIMITROV, D.; BERNOTIENĖ, R.; ZEHTINDJIEV, P.; ILIEVA, M.; IEZHOVA, T. A. Molecular characterization of five widespread avian haemosporidian parasites (Haemosporida), with perspectives on the PCR-based detection of haemosporidians in wildlife. **Parasitology Research**. [s. l.], v.113, n.6, p.2251-2263, 2014.
- VANSTREELS, R. E. T.; DUTRA, D.A.; FERREIRA-JUNIOR, F.C.; HURTADO, R.; EGERT, L.; MAYORGA, L.F.S.P.; BHERING, R.C.C.; BRAGA, E.M.; CATÃO-DIAS, J.L. Epidemiology, hematology, and unusual morphological characteristics of Plasmodium during an avian malaria outbreak in penguins in Brazil. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 118, n. 12, p. 3497-3508, 2019.
- VANSTREELS, R. E. T.; PARSONS, N. J. Malária Aviária e outros Hemosporídeos Aviários. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. p. 1557- 1574.
- VANSTREELS, R.; DA SILVA-FILHO, R.; KOLESNIKOVAS, C.; BHERING, R.; RUOPPOLO, V.; EPIPHANIO, S.; AMAKU, M.; JUNIOR, F.; BRAGA, E.; CATÃO-DIAS, J. Epidemiology and pathology of avian malaria in penguins undergoing rehabilitation in Brazil. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 46, n.1, p.1-12, 2015.
- VANSTREELS, R.E.T.; YABSLEY, M.J.; PARSONS, N.J.; SWANEPOEL, L.; PISTORIUS, P.A. A novel candidate species of *Anaplasma* that infects avian erythrocytes. **Parasites Vectors**, [s. l.], v.11, p.525, 2018.
- VIDEVALL, E. Genomic advances in avian malaria research. **Trends Parasitol**, [s. l.], v.35, p.254–266, 2019.
- VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARAES, A.M.; SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, p. 1-12, 2011.
- VOTÝPKA, J.; OBORNÍK, M.; VOLF, P.; SVOBODOVÁ, M.; LUKES, J. Trypanosoma avium of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. **Parasitology**, [s. l.], v. 125, p. 253-263, 2002.
- WALDENSTRÖM, J., BENSCH, S., HASSELQUIST, D., ÖSTMAN, Ö. A new nested PCR method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 90, p. 191-194, 2004.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.2, p.18-29, 1996.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEUSARY, A.; CORNELISSEN, A.W.C.A. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.95, n.1, p.1-15, 2001.

WERTHER, K.; DE CÁSSIA LUZZI, M.; GONÇALVES, L.R.; DE OLIVEIRA, J.P.; JUNIOR, J.R.F.A.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Arthropod-borne agents in wild Orinoco geese (*Neochen jubata*) in Brazil. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** [s. l.], v.55, p.30–41, 2017.

WILLIAMS, R. B. Avian malaria: clinical and chemical pathology of *Plasmodium gallinaceum* in the domesticated fowl *Gallus gallus*. **Avian Pathology**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 29-47, 2005.

ZANELLA, J.R.C. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v.51, p.510-519, 2016.

ZHANG, Y.; WU, Y.; ZHANG, Q.; SU, D.; ZOU, F. Prevalence Patterns of Avian Plasmodium and Haemoproteus Parasites and the Influence of Host Relative Abundance in Southern China. **Plos One**, [s. l.], v. 9, n.6, p. 99501, 2014.

ANEXOS

A – Aprovação CEUA/UNESA



**Universidade Estácio de Sá
Comissão de Ética no Uso de Animais**

Certificamos que o protocolo nº010/2021 de ensino da disciplina "Estudo hematológico e molecular da Infecção por hemospóridios e agentes Anaplasmatáceas em Psittaciformes, Piciformes e aves carnívoras mantidas no centro de triagem de animais silvestres (CETAS-RJ)", sob a responsabilidade da Professora *Andresa Guimarães*, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Campus Vargem Pequena, está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 08 de dezembro de 2021. Este protocolo tem validade de um ano a contar desta data.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2021

Luciana de Paula Lima Schmidt de Andrade
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estácio de Sá

B – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47069-4	Data da Emissão: 17/07/2020 15:11:49	Data da Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 23 da IN 032/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Divan Baldani	CPF: 044.128.097-81
Título do Projeto: Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodos vetores em aves no Rio de Janeiro, Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 26.427.455/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Processamento das amostras por meio de imunofluorescência indireta e PCR	07/2015	07/2017
2	Execução de PCR em tempo real, reações de clonagem, e sequenciamento e análise das sequências	01/2017	12/2017
3	Obtenção das amostras de aves de vida livre (coelhos de sangue e ectoparasitas)	01/2015	01/2018
4	Novas coletas e métodos de diagnóstico	06/2019	12/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Marco Rogério André	Auxílio nas análises moleculares	302.435.145-59	Brasileira
2	FERNANDA MODESTO CARPINTERO	Coleta de material (sangue e ectoparasitas)	137.876.127-85	Brasileira
3	Andressa Guimarães	Auxílio nas análises moleculares	116.295.977-08	Brasileira
4	Naiara Vidal Stocco	Coleta de amostras e análises laboratoriais	957.031.522-91	Brasileira
5	Agatha Ferreira Xavier de Oliveira	Coleta de amostras e análises laboratoriais	155.445.547-01	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim decidido por ato de autoridade competente.
2	No caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade e ter a CONFIRMAÇÃO EXATA das espécies, as condições para realização das coletas e de uso de infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de viagem de trabalho regular, ou quando de trabalho, oriundo ou não de viagem de trabalho, não poderão ser autorizados a expedir ou viajar de avião, podendo, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos de legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 12/2010, ou que especifique esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou diagnósticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pesquisa científica ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, terão por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integradas de cultura nativa e cultura popular, presente e passado, sobras por meio de técnicas e técnicas que se aplicarem ao estudo, o difusão ou o resgate, sendo sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão obedecer por métodos de coleta e instrumentos de captura diversificados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforços de coleta ou captura que não comprometam a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições de vida.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Abrevia do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio de página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0470690420200717

Página 1/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47068-4	Data da Emissão: 17/07/2020 15:11:49	Data da Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 23 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Silvan Baldani	CPF: 044.128.097-81
Título do Projeto: Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodos vetores em aves no Rio de Janeiro, Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 26.427.485/0001-05

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exclui o pesquisador titular e os membros de sua equipe de necessidade de obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distal ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou locatário de área dentro das terras de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Este documento não dispensa o cumprimento de legislação que dispõe sobre acesso e compartilhamento de patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou no compartilhamento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja outras informações em www.mma.gov.br/gen .

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Centro de Recuperação de Animais Silvestres	Rio de Janeiro-RJ	Matá Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora de natureza)

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Anseriformes	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Columbiformes	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Falconiformes	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Passeriformes	-
5	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Psittaciformes	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Strigiformes	-
7	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Accipitriformes	-
8	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Cathartiformes	-

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Abaixo do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0470690420200717

Página 2/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47069-4	Data da Emissão: 17/07/2020 15:11:49	Data de Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 23 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Givan Baldoni	CPF: 044.128.097-81
Título do Projeto: Detecção sorológica e caracterização molecular de agentes transmitidos por artrópodes vetores em aves no Rio de Janeiro, Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 26.427.485/0001-06

Material e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Material
1	Amostras biológicas (Aves)	Ectoparasita, Sangue

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Outro

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0470690420200717

Página 3/4

