

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

TESE

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E
HISTOPATOLÓGICA DAS INFECÇÕES
EXPERIMENTAIS CAUSADAS POR *Plasmodium*
(*Bennettinia*) *juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 E
Borrelia anserina (Sakharoff, 1891) EM *Gallus gallus* L.
1758.**

USHA VASHIST

2011



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

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E
HISTOPATOLÓGICA DAS INFECÇÕES
EXPERIMENTAIS CAUSADAS POR *Plasmodium*
(*Bennettinia*) *juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 E
Borrelia anserina (Sakharoff, 1891) EM *Gallus gallus* L.
1758.**

USHA VASHIST

Sob a orientação do Professor Dr.
Jairo Pinheiro da Silva

e Co-orientação dos professores Drs.
Carlos Luiz Massard
Carina Elisei de Oliveira

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

636.089

V333a

T

Vashist, Usha, 1982-

Avaliação biológica, bioquímica e histopatológica das infecções experimentais causadas por *Plasmodium* (*Bennettinia*) *juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) EM *Gallus gallus* L. 1758. / Usha Vashist - 2011.

113 f. : il.

Orientador: Jairo Pinheiro da Silva.

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

Inclui bibliografia.

1. Histopatologia veterinária - Teses.
2. Malária aviária - Teses.
3. Febre recorrente - Teses. I. Silva, Jairo Pinheiro da, 1969-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências veterinárias.
- III. Título.

Bibliotecário: _____

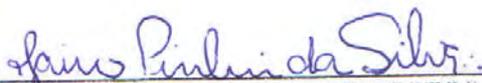
Data: ___ / ___ / ___

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

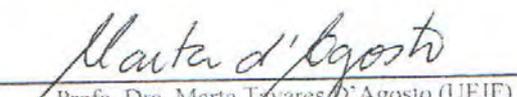
USHA VASHIST

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em
Parasitologia Animal.

TESE APROVADA EM 23/02/2011



Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva (UFRRJ)



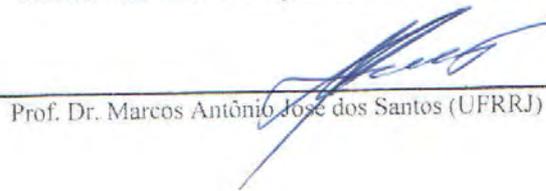
Profa. Dra. Marta Lavares de Agosto (UFJF)



Profa. Dra. Nádia Regina Pereira Almosny (UFF)



Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca (UFRRJ)



Prof. Dr. Marcos Antônio José dos Santos (UFRRJ)

Dedico este trabalho a todos aqueles que participaram dele direta ou indiretamente:
orientadores, amigos, colegas, funcionários, professores, parentes e marido.

A colaboração de cada um destes foi um grande presente que levarei por toda a vida.

AGRADECIMENTO

A **JEOVÁ DEUS** agradeço a vida, o amparo e por guiar o meu caminho.

Ao Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva pela oportunidade, confiança, compreensão, orientação compromissada e eficaz, aprendizado enriquecedor e o convívio sempre muito agradável.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Massard pela oportunidade, confiança, valiosos e generosos ensinamentos, co-orientação e ajuda fundamental na execução deste trabalho e a amizade.

À Dra. Carina Elisei pela oportunidade, confiança, ensinamentos, co-orientação e disponibilidade em colaborar.

À Profa. Dra. Marta Tavares D'Agosto por ter gentilmente cedido o laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora para realizar parte das análises desta pesquisa, pelo apoio, confiança, incentivo, orientação e amizade desde a graduação.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio José dos Santos e à Profa. Dra. Aparecida Alves do Nascimento pelo prestimoso auxílio na preparação e análise do material histológico das aves estudadas.

Ao Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca pelo apoio laboratorial, incentivo, ensinamentos e doação da cepa de *Borrelia anserina*.

Ao Prof. Dr. Fábio Barbour Scott por gentilmente ter emprestado as gaiolas para a acomodação das aves.

Ao Prof. Dr. Érik Daemon de Souza Pinto pelo apoio nas atividades acadêmicas.

Ao Dr. Walter Flausino pela prontidão em colaborar com sugestões na área laboratorial e biossegurança durante esta pesquisa.

Ao motorista Carlos Magno de Meireles pela boa condução nas viagens em prol desta pesquisa.

À amiga mestranda Aline Falqueto Duarte pela ajuda em todas as fases desta pesquisa, pela disponibilidade, atenção, ensinamentos e às generosidades de sempre.

À amiga Dra. Raquel Silva Lisbôa pela ajuda fundamental neste trabalho, atenção, estímulo e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica, os mestrandos Danilo Lustrino, Victor Menezes Tunholi Alves, Vinícius Menezes Tunholi Alves pela disponibilidade, ajuda prestimosa com as análises bioquímicas séricas, incentivo e ensinamentos.

As doutorandas Isabele da Costa Ângelo, Ana Paula Moraes Badini e Prof. Dr. Marcos Pinheiro Franque agradeço a amizade, o companherismo, o estímulo, o apoio de todas as horas e os momentos de estudo e lazer sempre tão agradáveis.

Aos amigos e companheiros do laboratório de hemoprotozoários e vetores Joice Aparecida Rezende Villela, Cláudia Bezerra da Silva, Huarrisson Azevedo Santos, Tiago Marques dos Santos, Marcos Sandes Pires, Érica Rocha Roier, Larissa Martins de Brito Moraes e Diogo Camarinha agradeço a valiosa ajuda prestada em diferentes fases desta pesquisa.

A graduanda do curso de Medicina Veterinária Raquel Procópio pela disponibilidade e ajuda na fase experimental desta pesquisa.

Ao meu co-orientado, aluno participante do projeto “Jovem Talento” da FAPERJ/UFRRJ Charles Jorge da Silva pelo auxílio e empenho durante todo o experimento.

Aos proprietários de todas as casas, granjas e sítios em que foram coletadas as amostras sanguíneas para esta pesquisa agradeço a colaboração e confiança.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia Animal, Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ e funcionários da Estação

Experimental para Pesquisas Parasitológicas W.O. NEITZ da UFRRJ agradeço as diferentes formas de auxílio e atenção prestados.

Ao Prof. Dr. Roberto da Gama Alves, coordenador do curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas- Comportamento e Biologia Animal da UFJF, e ex-coordenador Prof. Dr. Fábio Prezoto sou grata por gentilmente me permitirem utilizar a infra-estrutura do curso ao longo do doutorado.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Zoologia da UFJF, em especial aos amigos do Laboratório de Protozoologia agradeço a atenção, ajuda e companheirismo.

A Empresa Doles® pela doação de excelentes kits para as análises bioquímicas séricas.

As Granjas Planalto, do município de Uberlândia, MG, pela doação das aves utilizadas durante a experimentação.

À minha mãe, Nancy Oliveira Vashist agradeço o estímulo, o companheirismo e carinho.

Ao meu pai, Sanjay Vashist agradeço os cuidados comigo, o apoio e o carinho.

Aos meus irmãos Amitabh Vashist e Daniel Vashist agradeço o apoio e o carinho.

À minha sogra Márcia Maria Costa Marangon agradeço o incentivo, o apoio e o carinho.

Ao meu marido André Ramos agradeço a compreensão, o companheirismo, o apoio, os ensinamentos e o interesse nesta pesquisa.

A CAPES agradeço a bolsa de doutorado concedida ao longo destes anos.

BIOGRAFIA

USHA VASHIST, nascida em Juiz de Fora, Minas Gerais, em 28 de Março de 1982, filha de Sanjay Vashist e Nancy Oliveira Vashist, cursou os anos iniciais, ensino fundamental e ensino médio no Instituto Granbery da Igreja Metodista, em Juiz de Fora, MG. No ano 2000 ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) no curso de Ciências Biológicas, graduou-se na modalidade licenciatura em 2004 e no bacharelado em 2005. Ao longo da graduação foi monitora da disciplina Protozoários, Poríferos, Cnidários e Ctenóforos (PPCC) por dois semestres letivos. Foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Protozoologia da UFJF, onde realizou pesquisas relacionadas com parasitos maláricos. Foi também bolsista de Treinamento Profissional da UFJF, nesta fase ministrou aulas de Ciências e Biologia Geral para turmas de educação para jovens e adultos no Colégio de Aplicação JOÃO XXIII. Ainda em 2005 foi aprovada no exame de seleção do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – Comportamento e Biologia Animal da UFJF, onde realizou o Mestrado com a Dissertação intitulada “ASPECTOS BIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* VERSIANI & GOMES, 1941 (APICOMPLEXA, PLASMODIIDAE) EM *Gallus gallus* LINNAEUS, 1758 EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E ATIVIDADE MALARICIDA DA 4-(6-MERCAPTOPURINA)-7-CLOROQUINOLINA”, sob a orientação da Profa. Dra. Marta Tavares D’Agosto, obtendo o título em 2007. Até o ano de 2006 atuou como professora de Ciências e Biologia no ensino fundamental, ensino médio e pré-vestibular em Escolas e Cursos pré-vestibulares do Município de Juiz de Fora, MG. Em 2007 foi aprovada no exame de seleção do PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para a realização do doutorado sob a orientação do Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva. Ao longo do doutorado, além da pesquisa tema desta tese participou em grupos de pesquisa da UFRRJ sob as lideranças dos Profs. Drs. Jairo Pinheiro da Silva e Carlos Luiz Massard e da UFJF sob a liderança da Profa. Dra. Marta Tavares D’Agosto e do Prof. Dr. Érik Daemon. Publicou trabalhos em Periódicos Científicos Nacionais e Internacionais e Anais de Congressos. Colaborou em disciplinas de graduação e de pós-graduação no Departamento de Parasitologia Animal/UFRRJ/RJ; no Departamento de Zoologia/UFJF/MG e no Departamento de Parasitologia da UNITAU/SP durante a realização do curso de pós-graduação, ora a convite de professores regentes de disciplinas ou durante o estágio docência para os cursos de Ciências Biológicas, Medicina Veterinária e de Zootecnia, sempre enfocando temas de sua especialidade. Realizou ainda, várias palestras e mini-cursos em eventos acadêmicos, colaborou na orientação de alunos de Iniciação Científica, de bolsistas em Treinamento Profissional. Foi co-orientadora de um estudante de ensino médio, selecionado como Jovem Talento do Programa FAPERJ. Em maio de 2010 foi aprovada em concurso público para ser professora efetiva do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais e em 2011 passou a lecionar disciplinas e a realizar pesquisas neste Instituto na área de Ciências Biológicas.

RESUMO

VASHIST, USHA. **AVALIAÇÃO BIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA DAS INFECÇÕES EXPERIMENTAIS CAUSADAS POR *PLASMODIUM (BENNETTINIA) JUXTANUCLEARE* VERSIANI & GOMES, 1941 E *BORRELIA ANSERINA* (SAKHAROFF, 1891) EM *GALLUS GALLUS* L. 1758.** 2011. 114p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Plasmodium juxtancleare e *Borrelia anserina* são patógenos de aves domésticas e silvestres. Podem causar sérios prejuízos às aves, em especial àquelas criadas de forma orgânica, livre de medicamentos e não confinadas. Estes patógenos podem causar anemia, diarreia, processos inflamatórios, danos aos órgãos vitais, paralisia de membros, anorexia, perda de peso e queda na produção de ovos. Em virtude da escassez de conhecimento a respeito desta infecção mista, passível de ocorrer naturalmente nas aves, realizou-se a presente pesquisa que avaliou os aspectos biológicos, bioquímicos e histopatológicos das infecções causadas por *P. juxtancleare* e *B. anserina* em *Gallus gallus*. Para este experimento, inicialmente realizou-se uma busca por aves infectadas por *P. juxtancleare* no município de Seropédica, RJ. Um total de 234 aves, dentre elas patos, marrecos, perus e galinhas, foram amostradas. Foram isolados plasmódios sanguíneos de aves da raça Sedosa do Japão para as inoculações experimentais. Os plasmódios foram caracterizados com base na morfologia e morfometria, e confirmada a espécie por técnica molecular. Foram realizadas infecções experimentais em codornas e patos para estudos a respeito da infectividade do isolado de *P. juxtancleare*. Posteriormente, para o estudo dos parâmetros biológicos, bioquímicos e histopatológicos da co-infecção foram adquiridas 48 aves da raça Cobb com um dia de idade. Aos 60 dias de idade as aves foram divididas em quatro grupos, com 12 indivíduos cada: G1 - controle não infectadas, G2 - infectadas por *P. juxtancleare* isolado de galinhas da raça Sedosa do Japão do município de Seropédica, RJ, G3 - infectadas por cepa de *B. anserina* criopreservada e mantida no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e G4- infectadas pelo mesmo isolado de *P. juxtancleare* e cepa de *B. anserina* anteriormente citados. Ao longo de 45 dias, diariamente, as aves foram observadas quanto à presença de sinais clínicos das infecções. Durante todo o experimento foram realizados esfregaços sanguíneos das aves para avaliação da parasitemia e espiroquetemia. Semanalmente, foram analisados os níveis séricos das enzimas alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), ácido úrico, creatinina e proteínas totais e ao final do experimento foram realizadas análises histológicas de cortes do fígado e rim de aves de cada grupo experimental. As prevalências de *P. juxtancleare* em galinhas, patos, marrecos, gansos e perus foi de 56%, 28%, 32%, 40% e 50%, respectivamente, e as parasitemias médias de 0,12%, 0,08%, 0,02%, 0,03% e 0,1%, respectivamente. As análises biomoleculares e morfométricas dos plasmódios isolados de galinhas da raça Sedosa do Japão confirmaram ser a espécie *P. juxtancleare* encontrada. Tanto os patos quanto as codornas sub-inoculados com *P. juxtancleare* se infectaram, mas com valores de parasitemia bem inferiores aos da ave doadora. Nas galinhas da raça Cobb, a atividade da ALT foi significativamente elevada nos Grupos 2, 3 e 4 em relação ao Grupo 1.

A atividade da AST oscilou, mas não variou significativamente entre os grupos. Ambas as enzimas também serviram como marcadoras de estresse das aves. Nos cortes histológicos de fígado das aves do Grupo 1 não foram evidenciadas alterações marcantes, já nos Grupos 2, 3 e 4 foram evidenciados infiltrados inflamatórios, hepatócitos vacuolizados e tumefeitos, hemorragias extensas, proliferação de tecido conjuntivo fibroso no espaço porta, congestão e dilatação de sinusóides e colestase intra-hepática. Houve variação significativa entre as concentrações de proteínas totais das aves dos grupos experimentais, sendo que o Grupo 4 apresentou média superior aos demais e superior ao nível considerado normal para aves saudáveis. A concentração sérica do ácido úrico foi mais elevada no grupo infectado por *P. juxtannucleare* e as concentrações séricas de creatinina não variaram significativamente entre os grupos experimentais. As análises histológicas revelaram nefrites, glomerulonefrites, congestão e hemorragias em algumas áreas dos rins de aves dos grupos infectados. Conclui-se que as infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* isoladas ou em conjunto causam danos às aves, o que pode comprometê-las na produção. O conjunto de ferramentas como anamnese, análise parasitológica, bioquímica clínica e histopatologia no estudo das infecções parasitárias em aves foram eficientes para a caracterização de doença isolada ou em conjunto causada por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*.

Palavras-chave: malária aviária, borreliose aviária, produção orgânica, galinhas, bioquímica sérica, histopatologia.

ABSTRACT

VASHIST, Usha. **BIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF THE INFECTIONS CAUSED BY *PLASMODIUM (BENNETTINIA) JUXTANUCLEARE* VERSIANI & GOMES, 1941 AND *BORRELIA ANSERINA* (SAKHAROFF, 1891) IN *GALLUS GALLUS* L. 1758.** 2011. 114p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Plasmodium juxtancleare and *Borrelia anserina* are common pathogens in domestic and wild birds, they can cause serious damages in the birds, especially those created organically, drugs free and not confined. These pathogens are related to anemia, diarrhea, inflammation, damage to vital organs, limb paralysis, anorexia, weight loss and reduction in egg production. This mixed infection can occur naturally among birds, but this subject is poorly studied, for this reason the present survey aimed to evaluate the biological, biochemical and histopathological features of infections caused by *P. juxtancleare* and *B. anserina* in *Gallus gallus*. For this experiment, initially a search for birds infected by *P. juxtancleare* was made in the Seropedica City, RJ. Two hundred thirty four birds, among them ducks, widgeons, geese, turkeys and chickens were sampled. Plasmodia were isolated from blood of chickens of Silky Japan's breed for experimental inoculations. The plasmodia were characterized based on morphology and morphometry, and the species confirmed by molecular technique. Experimental infections were performed in quails and ducks for the infectivity of the *P. juxtancleare* isolate studies. Thereafter, for the biological, biochemical and histopathological studies, 48 Cobb chickens with one day old were acquired. At 60 days old the chicks were divided into four groups of 12 birds each: G1-uninfected control, G2-infected by *P. juxtancleare* isolated from chicken of Silky Japan's breed of the Seropédica City, G3-infected by *B. anserina* strain cryopreserved and maintained in the Laboratory of Parasitic Diseases, Epidemiology and Public Health Department, Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro and G4- infected by the same strain of *P. juxtancleare* and *B. anserina* previously cited. Over 45 days, daily, the birds were observed for the presence of clinical signs of infection. Throughout the experiment blood smears were made from birds to parasitemia and spirochaetemia evaluation. Weekly, the serum enzymes alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), uric acid, creatinine, total proteins were analyzed and in the experiment end histological sections of liver and kidney of birds in each experimental group were evaluated. The prevalence of *P. juxtancleare* in chickens, ducks, widgeons, geese and turkeys was 56%, 28%, 32%, 40% and 50%, respectively, and the parasitemias averaged 0.12%, 0.08%, 0.02% 0.03% and 0.1%, respectively. Biomolecular and morphometric analysis of parasites isolated from chickens of Silky Japan's bred confirm that the specie was *P. juxtancleare*. Both ducks and quails subinoculated with *P. juxtancleare* became infected, but with lower values of parasitaemia in relation to the bird donor. In Cobb breed chickens, the ALT activity was significantly higher in Groups 2, 3 and 4 compared to Group 1. The AST activity fluctuated but did not vary significantly between groups. Both

enzymes also served as a marker of stress in birds. In histological liver sections of birds of Group 1 no marked changes were visualized, but in the histological liver sections of birds of Groups 2, 3 and 4 inflammatory infiltrates, swollen and vacuolated hepatocytes, extensive hemorrhages, proliferation of fibrous tissue in the portal space, congestion and dilation sinusoids and intrahepatic cholestasis were demonstrated. There was significant variation between the total protein concentrations in the experimental groups, and the birds of Group 4 had a higher average in relation to the others groups, and higher than the level considered normal for healthy birds. Serum uric acid was higher in the Group 2 and serum creatinine did not differ significantly between groups. Kidney histological analysis revealed nephritis, glomerulonephritis, congestion and hemorrhages in some areas of the kidneys of birds from Groups 2, 3 and 4. We concluded that the infections caused by *P. juxtannucleare* and *B. anserina* alone or in combination cause damage to birds, which can compromise them in production. The tools combination like history, parasitological analysis, clinical chemistry and histopathology in the study of infections caused by *P.juxtannucleare* and *B. anserina* in birds allowed a realistic picture of the overall health of the birds.

Keywords: avian malaria, avian borreliosis, organic produce, chickens, serum biochemistry, histopatology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Plasmodium juxtannucleare</i> e a malária aviária	4
2.1.1. Distribuição	5
2.1.2. Hospedeiros vertebrado e invertebrado	6
2.1.3. Vias de inoculação, período pré-patente, pico máximo de parasitemia e mortalidade	7
2.1.4. Patogenias	8
2.1.5. Criopreservação e passagens	9
2.1.6. Técnicas de diagnóstico	9
2.1.7. Tratamento, Vacinação e Profilaxia	10
2.2. <i>Borrelia anserina</i>	10
2.2.1. Distribuição	16
2.2.2. Hospedeiros vertebrado e invertebrado	16
2.2.3. Vias de inoculação, período pré-patente e pico máximo de espiroquetemia	12
2.2.4. Patogenias	13
2.2.5. Criopreservação e passagens	15
2.2.6. Técnicas de diagnóstico	16
2.2.7. Tratamento, Vacinação e Profilaxia	16
2.3. Associação de parasitoses	17
2.4. Importância econômica do <i>Plasmodium juxtannucleare</i> e <i>Borrelia anserina</i>	18
Capítulo I- <i>Plasmodium juxtannucleare</i> Versiani & Gomes, 1941, em aves no município de Seropédica, RJ e aspectos biológicos do isolado proveniente de aves ornamentais da raça Sedosa do Japão	20
RESUMO	32
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Busca por aves infectadas por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> e isolamento de ave doadora	24
2.2. Caracterização morfológica, morfométrica e molecular do isolado de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> estudado	25
2.3. Infectividade e parasitemia de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> isolado de <i>Gallus gallus</i> da raça Sedosa do Japão em aves de importância comercial	26
2.4. Sintomatologia associada às infecções causadas pelo isolado de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> estudado	26
3. RESULTADOS	27
3.1. Encontro de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> nas aves	27
3.2. Caracterização morfológica, morfométrica e molecular do isolado de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> estudado	28

3.3. Infectividade e parasitemia do isolado de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> estudado em aves de importância comercial	30
3.4. Sintomatologia associada às infecções causadas pelo isolado de <i>Plasmodium juxtannucleare</i> estudado	31
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	33
Capítulo II- Aspectos biológicos e clínicos das infecções causadas por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> Versiani & Gomes, 1941 e <i>Borrelia anserina</i>, Sakharoff, 1891 em <i>Gallus gallus</i>, Linnaeus, 1758	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
3. RESULTADOS	44
4. DISCUSSÃO	51
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
Capítulo III- Níveis séricos de enzimas e histopatologia hepática de <i>Gallus gallus</i> Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> Versiani & Gomes, 1941 e <i>Borrelia anserina</i> Sakharoff, 1891.	55
RESUMO	56
ABSTRACT	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
3. RESULTADOS	61
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÃO	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
Capítulo IV- Níveis séricos de proteínas, ácido úrico, creatinina e histopatologia renal de <i>Gallus gallus</i> Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por <i>Plasmodium juxtannucleare</i> Versiani & Gomes, 1941 e <i>Borrelia anserina</i> Sakharoff, 1891.	71
RESUMO	72
ABSTRACT	73
1. INTRODUÇÃO	74
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
3. RESULTADOS	78
4. DISCUSSÃO	82
5. CONCLUSÕES	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO I	97
ANEXO II	98

1. INTRODUÇÃO GERAL

Plasmodium juxtenucleare foi descrito por Versiani & Gomes, em 1941, em *Gallus gallus* Linneaus, 1758 de criações rústicas, no estado de Minas Gerais. A ocorrência deste hemoparasito é ampla na América Latina e no Brasil onde apresenta alta prevalência em aves de criações rústicas (VERSIANI & GOMES, 1941; BELTRÁN, 1941; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; MOTA, 1997; SANTOS-PREZOTO *et al.*, 2004; VASHIST, 2003). Há também relatos na literatura de *P. juxtenucleare* em aves silvestres (BENNET *et al.*, 1966; MOHAN & MANWELL, 1969). MASSARD (1976) realizou pesquisa buscando encontrar a infecção por *P. juxtenucleare* em 26 espécies de aves e encontrou este parasito em galinhas e faisões, com prevalências de 39,7% e 80% respectivamente. O parasitismo por *P. juxtenucleare* também já foi relatado em perus (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979).

Plasmodium juxtenucleare tem como hospedeiros invertebrados mosquitos da tribo Culicini (VERSIANI & GOMES, 1941; BENNET *et al.*, 1966; GARNHAM, 1966; KRETTLI, 1972; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & CASTRO, 1991).

A malária aviária causada por *P. juxtenucleare* é uma infecção que pode causar quadro de anemia hemolítica, febre, inapetência, congestão e megalia de órgãos, distúrbios digestivos e neurológicos e, nos casos de altas parasitemias, prostração e morte (VERSIANI & GOMES, 1941; DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998; VASHIST, 2010). Em criações comerciais, já foi relacionada com baixa produção de ovos, entre as aves infectadas (MASSARD, 1982). Na fase aguda, as aves podem apresentar sintomas neurológicos decorrentes de lesões cerebrais e na medula espinhal, levando à incoordenação motora, fraqueza acentuada nas pernas, podendo levar a paresia ou à paralisia dos membros inferiores (VERSIANI & GOMES, 1941; MASSARD & MASSARD, 1981; VASHIST, 2010). Também foram observados distúrbios sistêmicos como perda de apetite, emaciação (AL DABAGH, 1961), diarreia com fezes sanguinolentas, anemia evoluindo em casos mais severos para morte (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979).

Análises bioquímicas séricas em humanos infectados por *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium falciparum* revelaram alterações nos níveis de enzimas, tais como as transaminases e fosfatases, a gravidade destas alterações está relacionada ao tipo e estágio da doença (PEREIRA *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2004). Embora há muitos anos veterinários e pesquisadores tenham lançado mão das ferramentas da patologia clínica na saúde animal, não consta na literatura a análise de parâmetros bioquímicos em aves infectadas por plasmódios.

Outro hemoparasito comumente encontrado parasitando aves domésticas é a bactéria *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891), agente etiológico da borreliose aviária, que acomete também as galinhas. Esta espiroqueta foi descrita por Sakharoff em 1891 ao pesquisar sobre a septicemia em gansos no Cáucaso. As aves infectadas apresentam sintomas como hipertermia, polidipsia, sonolência, anorexia, inapetência, diarreia verde escura, podendo ocorrer paralisia das pernas e asas e até mesmo a morte. A mortalidade varia de 10 a 99% de acordo com a cepa, enquanto a morbidade é maior que 80% (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903; BOERO, 1967; BIER, 1985; HOOGSTRAAL, 1985; QUINN *et al.*, 1994). Tentativas de vacinas foram feitas mas sem êxito (WOUDA *et al.* 1975).

Esta bactéria possui ampla distribuição geográfica (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903; McNEIL *et al.* 1949; DICK & BARRERA, 1964; COOPER & BICKFORD, 1993).

Os vetores biológicos de *B. anserina* são carrapatos do gênero *Argas*, os quais servem como reservatórios naturais (DA MASSA & ADLER, 1979). Ao sugar o sangue das aves o carrapato transmite as espiroquetas pela secreção salivar e pelo líquido coxal, secretado principalmente pelos adultos, durante o repasto sanguíneo. Quatro a seis dias após a inoculação ou contaminação pelas espiroquetas, as aves começam a manifestar sinais da doença (BIER, 1985).

Estudos hematológicos da borreliose aviária, revelaram diminuição marcante do número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina do sangue (SHOMMENIN & KHOGALI, 1974). As alterações dos valores hematológicos podem ser também atribuídas aos produtos tóxicos lançados na circulação resultantes da multiplicação das espiroquetas (HUTYRA, 1947). LISBÔA (2006) ao estudar aspectos da transmissão biológica, experimentalmente de *B. anserina* por *Argas miniatus* realizou avaliações relativas aos parâmetros hematológicos em galinhas e concluiu que as aves infectadas demonstraram elevada sensibilidade e alterações hematológicas compatíveis com a infecção bacteriana estudada.

De acordo com RUPLEY (1999) a anemia em aves é causada pelos mesmos mecanismos dos mamíferos tais como alterações na hematopoiese e conseqüente diminuição na produção de eritrócitos, na sua destruição ou na perda de sangue.

Um estudo a respeito das mudanças na composição bioquímica do sangue de galinhas infectadas por *B. anserina* revelou que os níveis da transaminase glutâmico oxalacética (TGO), proteínas totais, globulinas e ácido úrico aumentaram, mas houve redução da albumina, lipídeos totais, colesterol e uma pequena diminuição no fosfato inorgânico. Os níveis de açúcar não mudaram. Tais mudanças nos níveis séricos de enzimas e componentes do sangue refletiram consequências da inflamação, enterite, anorexia e prostração causados pelas espiroquetas no sangue e tecidos das aves.

A malária e a borreliose aviária são infecções comuns principalmente em aves de criação “rústica” (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903; VERSIANI & GOMES, 1941; BELTRÁN, 1941; BOERO, 1967; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; BIER, 1985; HOOGSTRAAL, 1985; QUINN et al., 1994; MOTA, 1997; SANTOS-PREZOTO et al., 2004; VASHIST, 2003), com a utilização de antibióticos e coccidiostáticos em rações comerciais este problema foi minimizado em aves de criações comerciais (WOUDA et al. 1975), entretanto em nosso país, em cidades do interior é muito comum a criação de aves “de fundo de quintal” para a subsistência da família, tanto pela venda de aves como pela venda de ovos. A prática da criação orgânica de animais vem ganhando cada vez mais espaço no mercado brasileiro e mundial, um dos regulamentos para esta prática é a não utilização de antimicrobianos na produção de aves de corte o que torna estes animais vulneráveis às doenças parasitárias. As infecções por *B. anserina* e *P. juxtannucleare* são passíveis de ocorrer simultaneamente em aves dada à ampla distribuição de seus vetores e não há na literatura estudos sobre aspectos bioquímicos séricos destas infecções em conjunto.

Interessante notar que, em humanos, há poucos relatos de casos na literatura em que pessoas que foram acometidas simultaneamente por *Plasmodium* e *Borrelia*. Os pacientes infectados apresentaram sintomatologia grave e alterações hematológicas, atribuídas a estes hemoparasitos. A gravidade dos sintomas foi relacionada diretamente aos efeitos sinérgicos destas infecções (MIRON et al., 2004). Assim, são poucos os estudos sobre esta co-infecção que pode ser mais comum do que se imagina, entretanto, por muitas vezes obtém-se um diagnóstico incorreto (BERGER & DAVID, 2005). Uma vez que, modelos aviários envolvendo plasmódios ou borrelias são bem aceitos para a experimentação científica e alguns destes são utilizados em pesquisas avançadas na busca por tratamentos das enfermidades humanas, sugere-se que os resultados de pesquisas a respeito dos aspectos

biológicos e bioquímicos destas infecções em conjunto sirvam para elucidar o que ocorre no organismo humano.

Considerando-se a importância das parasitoses causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em aves, a possibilidade da utilização dos resultados desta pesquisa na elucidação de problemas relacionados tanto à saúde animal, como à saúde pública, e a escassez de referências em relação a esta temática, o objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos biológicos, as alterações bioquímicas séricas e a histopatologia das infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em aves, de forma isolada e conjunta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Plasmodium juxtannucleare* e a malária aviária

A malária aviária é comum e frequente em aves de todos os continentes, para algumas espécies aviárias é uma infecção grave que pode levar à morte, enquanto que para outras é uma infecção assintomática e raramente fatal. Em galinhas, somente *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935 e *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 são os causadores da malária aviária (DHANAPALA, 1962; GARNHAM, 1966; MASSARD & MASSARD, 1981). Evolutivamente a associação entre aves e *P. juxtannucleare* é mais antiga do que entre aves e *P. gallinaceum*, o que pode explicar a menor patogenicidade de *P. juxtannucleare* em relação a *P. gallinaceum* (ELISEI, 2005).

Plasmodium juxtannucleare foi primeiramente identificado por Peres e Gomes (1940) em galinhas de criações rústicas provenientes do mercado municipal de Belo Horizonte, MG, quando estes pesquisadores procuravam a espiroqueta *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) nas aves, acredita-se que as aves tinham origem na região oeste do estado de Minas Gerais. Este parasito foi assim denominado pelo fato da frequente justaposição deste em relação ao núcleo das células parasitadas (VERSIANI & GOMES, 1941; 1943).

Ishiguro (1957) identificou no Japão *Plasmodium japonicum* que era morfológicamente semelhante ao *P. juxtannucleare*, mas Akiba (1959) fez um estudo comparativo entre as duas amostras e considerou *P. japonicum* como sinônimo de *P. juxtannucleare*.

Quanto à morfologia deste hemoparasito, Versiani & Gomes (1941) descreveram o *P. juxtannucleare* como parasito de pequenas dimensões. Elisei (2001) realizou caracterizações morfológicas e morfométricas deste parasito, foram mensurados o diâmetro maior (DM) e diâmetro menor (dm) e calculado o índice morfométrico (IM=dm/DM). Os trofozoítos tiveram em média $1,802 \pm 0,313 \times 1,230 \pm 0,208 \mu\text{m}$ com IM = $0,623 \pm 0,110$. Estes eram arredondados, com predomínio das formas ovóides e elípticas. Os esquizontes estimaram em média $2,809 \pm 0,187 \times 1,820 \pm 0,386 \mu\text{m}$ com IM = $0,643 \pm 0,120$. Os esquizontes tinham formas ovóide, elíptica, piriforme e amebóide, com predomínio das formas ovóides e piriformes. Em geral, apresentaram dois, três ou quatro merozoítos. Os macrogametócitos mediram em torno de $3,559 \pm 0,883 \times 2,363 \pm 0,207 \mu\text{m}$ com IM= $0,766 \pm 0,078$. Foram observadas formas ovóides, elípticas e piriformes, com predomínio das ovóides e piriformes. Os microgametócitos tiveram em média $3,891 \pm 0,946 \times 2,386 \pm 0,783 \mu\text{m}$ com IM = $0,505 \pm 0,103$. Foram observadas formas ovóides, elípticas e piriformes, com predomínio das ovóides e elípticas.

Segundo Cox (1994), Pierce e Bennet (1996) e Valkiunas (2005) *P. juxtannucleare* ocupa a seguinte posição taxonômica:

Reino: Protozoa

Sub-Reino: Alveolata

SuperPhylum: Apicomplexa

Phylum: Sporozoa

Classe: Haemosporidea

Ordem: Haemosporida

Família: Plasmodiidae

Gênero: *Plasmodium*

Sub-Gênero: *Bennettinia*

Espécie: *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*

Os plasmódios são divididos em 5 subgêneros, sendo eles: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella*, *Huffia* e *Bennettinia* (GARNHAM, 1966; VALKIUNAS, 2005). Pierce e Bennet (1996) propuseram o gênero *Plasmodioides* e até recentemente *P. juxtannucleare* estava inserido no subgênero *Novyella*, mas em virtude dos gametócitos deste parasito nem sempre serem alongados este foi remanejado para o subgênero *Bennettinia* (VALKIUNAS, 2005).

Bennet (1970), estudando a sequência evolutiva dos sub-gêneros dos plasmódios aviários *Haemamoeba*, *Giovannolaia* e *Novyella*, concluiu que *Novyella* era o mais evoluído, devido à sua especificidade em relação aos hospedeiros vertebrados e invertebrados, redução do número de merozoítos, redução do tamanho do parasito e grau de distorção da célula hospedeira. O autor citou que a espécie de *P. juxtannucleare* é a mais diferenciada, devido ao fato de possuir oocistos especializados, grandes e pedunculados. Formas exoeritrocíticas desta espécie foram relatadas por alguns pesquisadores em infecções experimentais e naturais (BARRETO, 1943; PARAENSE, 1947; KRETTLI, 1972a; MASSARD & MASSARD, 1981). Acredita-se que embora os plasmódios humanos e aviários sejam morfológicamente distintos, genotipicamente podem estar bem próximos. Estudos moleculares e imunológicos realizados com *P. falciparum*, que é agente fatal da malária humana, e os plasmódios aviários *P. gallinaceum* e *Plasmodium lophurae*, apontaram para uma semelhança genotípica entre estes plasmódios (KLASLOW et al., 1989; WALTERS et al., 1991; FELDMAN et al., 1995; MC CUTCHAN et al., 1996; ELISEI, 2005). Quando analisados dados moleculares e biológicos de diferentes espécies de plasmódios, percebe-se que os plasmódios aviários estão evolutivamente entre as espécies que acometem répteis e mamíferos, isto porque os plasmódios aviários realizam além das esquizogonias eritrocíticas, esquizogonias em leucócitos, o que não ocorre nos plasmódios de mamíferos, mas ocorre nos plasmódios de répteis (SOARES et al., 1999a).

2.1.1. Distribuição

Plasmodium juxtannucleare ocorre em vários países da América Latina, Ásia e África (BELTRÁN, 1941, 1943; CASSAMAGNAGHI, 1947; ISHIGURO, 1957; AKIBA, 1959; DHANAPALA, 1962; MANWELL, 1966; MOHAN & MANWELL, 1969; KRETTLI, 1972; LOURENÇO DE OLIVEIRA & CASTRO, 1991).

No Brasil a ocorrência de *P. juxtannucleare* é ampla e já houve registros em alguns. As prevalências de *P. juxtannucleare* no Brasil estão assinaladas no Quadro 1.

Quadro1: Prevalência de *Plasmodium juxtannucleare* em diversas localidades brasileiras

Localidades	Prevalências (%)	Autor
Minas Gerais		
Japão de Oliveira	16,6%	PARAENSE (1944)
BambuÍ	21,47%	PARAENSE (1949)
Caratinga	1,4%	FERRAZ-FRANCO (1954)
Diversas regiões	4 – 33%	KRETTLI (1971)
Lambari	6%	MASSARD (1976)
Santa Bárbara do Tugúrio	100%	SANTOS-PREZOTO (2004)
Juiz de Fora	53%	VASHIST <i>et al.</i> (2003)
Rio de Janeiro		
Cordeiro, Laranjal, Sto. Antônio de Pádua	2%	FERRAZ-FRANCO (1954)
Diversas regiões	32,3%	MASSARD (1976)
Diversas regiões	35,5%	SOUZA (1998)
Espírito Santo		
Alegre	39,2%	MASSARD (1976)
Pernambuco		
Recife	51,4%	MOTA <i>et al.</i> (2000)
Pará		
Belém	40%	SERRA- FREIRE <i>et al</i> (1976)

2.1.2. Hospedeiros vertebrado e invertebrado

Plasmodium juxtannucleare tem alta especificidade para *Gallus gallus*, com alta prevalência em aves de criações rústicas (VERSIANI & GOMES, 1941; BELTRÁN, 1941; PARAENSE, 1947; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981). Além da galinha doméstica, há registros de outras aves parasitadas por *P. juxtannucleare*: *Gallus lafayettei* (jungle-fowl) no Ceilão (DISSANAIKE, 1963), *Bambusicola thoracica sonorivox* (perdiz de bambu) em Taiwan (MANWELL, 1966), *Francolinus spp* (perdiz) na África (MOHAN & MANWELL, 1969), *Meleagris galopavo* (peru), *Crysolophus pictus* (faisão dourado), *Lophura nyctemera* (faisão prateado), *Crysolophus amherstiae* (faisão lady) e *Phasianus colchicus* (faisão coleiro) no Brasil (SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979, MASSARD & MASSARD, 1981) e *Spheniscus demersus* e *Spheniscus magellanicus* (pingüim) na África do Sul e Brasil (GRIM *et al.*, 2003; FALQUETO, 2010).

No hospedeiro vertebrado ocorrem as fases exoeritrocítica (pela inoculação dos esporozoítos presentes nas glândulas salivares do mosquito infectado na corrente circulatória da ave, com invasão dos esporozoítos nas células do sistema fagocítico mononuclear e posterior penetração dos criptozoítas em células endoteliais de vários órgãos, como o fígado) e eritrocítica (pela penetração dos merozoítos nas hemácias e formação de trofozoítos) (MC GHEE *et al.*, 1988).

Os vetores de *P. juxtannucleare* são mosquitos da tribo Cullicini (VERSIANI & GOMES, 1941; BENNET *et al.*, 1966; GARNHAM, 1966; KRETTLI, 1972; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & CASTRO, 1991). Experimentalmente, Paraense (1944) assinalou a ocorrência de esporozoítos em dois exemplares de *Culex quinquefasciatus*. Bennet *et al.* (1966) conseguiram com grande índice de positividade infectar *Culex gelidus*, *Culex*

tritaeniorrhynchus e *Culex pseudovishnui*. Na Malásia, Bennet et al. (1966) descreveram estágios esporogônicos de *P. juxtannucleare* em *Culex sitiens* e *Culex annulus* naturalmente infectados. Niles & Kulasiri (1967), no Sri Lanka, isolaram *P. juxtannucleare* de *Mansonia crassipes*, capturados na Natureza. Krettli (1972) estudou a infecção experimental em *C. quinquefasciatus*, demonstrando o oocisto pedunculado no estômago do mosquito. Lourenço de Oliveira e Castro (1991) estudando os possíveis vetores de *P. juxtannucleare*, capturaram mosquitos no Rio de Janeiro. As seguintes espécies estavam infectadas: *Culex saltanensis*, *Culex declarator*, *Culex coronator*, *Culex quinquefasciatus* e *Culex bidens*. Segundo os autores *Culex saltanensis* foi o mais frequente em criações de galinhas. Nos mosquitos ocorre a fase esporogônica do ciclo pela ingestão de gametócitos presentes no sangue das aves, maturação destes no estômago do mosquito e fertilização, originando o zigoto móvel, que atravessa o epitélio do estômago, encistando e formando oocisto. O oocisto, por esporogonia, produz esporozoítos que por movimentos da hemolinfa chegam às glândulas salivares do mosquito dando continuidade ao ciclo (GARNHAM, 1966).

2.1.3. Vias de inoculação, período pré-patente, pico máximo de parasitemia e mortalidade

O período de pré-patência pode variar de acordo com as vias de inoculação experimentais (Quadro 2).

Quadro 2. Vias de inoculação experimentais e período de pré-patência de *Plasmodium juxtannucleare* observados por diferentes autores.

Vias de inoculação	Período Pré-patente	Autores
Intramuscular	6- 20 dias	VERSIANI & GOMES (1943)
	76-106 dias	BÉLTRAN (1943)
	7-14 dias	BARRETO (1943)
Endovenosa	4-15 dias	VERSIANI & GOMES (1943)
	38 dias	BÉLTRAN (1943)
	7-14 dias	BARRETO (1943)
Intraperitoneal	11-18 dias	DHANAPALA (1962)
	4-8 dias	MASSARD (1981)
	12 dias	ELISEI (2001)
	17 dias	AMARAL (2005)

Bennett e Waren (1966b) estudando cepas malaias de *P. juxtannucleare* observaram nas aves infectadas dois picos de parasitemia, de 25% e 35%, após o segundo pico a parasitemia diminuiu. Krettli (1971) realizou experimentos com amostras brasileiras de *P. juxtannucleare* e relatou que após a fase aguda da infecção, o número de parasitos sanguíneos diminuía e não surgiam novos picos de parasitemia. Massard & Massard (1981) realizaram estudos experimentais com amostras brasileiras de *P. juxtannucleare* e verificaram que durante o primeiro mês pós inoculação a parasitemia se elevou, mas no segundo mês ela decresceu tornando-se crônica. Souza (1998) observou em aves infectadas com amostra de *P. juxtannucleare* do Rio de Janeiro que o pico de parasitemia ocorreu 25 dias pós inoculação.

Quanto aos métodos de exacerbação da parasitemia por *P. juxtannucleare*, Al Dabagh (1961) realizou esplenectomia em frangos durante a fase crônica da doença e observou o

avanço da parasitemia dois a três dias depois da retirada do baço, o que as levou à morte. Krettli (1971) também realizou a técnica de esplenectomia em frangos e observou uma parasitemia de até 61%, entre o quarto e sexto dia após a intervenção cirúrgica, com perda de metade das aves estudadas. Esta mesma autora irradiou aves com cobalto e raios-X, o que resultou na elevação da parasitemia acima de 40%, em outro teste foi administrado o acetato de delta-hidro cortisona a 2,5%, via intramuscular, obtendo-se a parasitemia de 24% com posterior óbito das aves. Souza (1998) injetou o acetato de metilprednisolona, em dose única, no músculo peitoral das aves e elevou a parasitemia de 0,34% para 33,4% em 16 dias, Vashist et al. (2008, 2009) também utilizaram o acetato de metilprednisolona na dose de 30 mg/kg de peso das aves e obtiveram elevação significativa parasitemia das aves.

A taxa de mortalidade em aves infectadas por *P. juxtannucleare* pode variar significativamente de acordo com o isolado em questão, Versiani & Gomes (1943) trabalhando com aves jovens infectadas por *P. juxtannucleare*, relataram mortalidade acima de 96%, em um período de 15 dias a nove meses, esta mesma taxa de mortalidade foi relatada por Beltrán (1943) ao estudar uma cepa mexicana, o mesmo autor estudou uma amostra brasileira e relatou taxa de mortalidade de 67%, até o segundo mês pós-inoculação. Dhanaphala (1962) no Sri Lanka obteve taxa de mortalidade de 16%. Em aves no Japão, a mortalidade foi de 66,7% (ITAGAKI, 1970). Krettli (1971) estudou diferentes amostras brasileiras e observou mortalidade entre 33 e 100%. Massard & Massard (1981) infectaram aves com idade de três e 15 dias e verificaram morte de 50 % das aves no primeiro mês e 100% em 12 meses após a inoculação.

2.1.4. Patogenias

A malária em galinhas causada por *P. juxtannucleare* é uma infecção que causa morbidade e mortalidade, principalmente em aves jovens, quando a letalidade pode atingir 90-100%, entre o oitavo e 12º mês após a infecção, sendo responsável por perdas econômicas no setor da avicultura. Pode causar quadro de anemia, febre, inapetência, congestão e megalia de órgãos, distúrbios digestivos e neurológicos e, nos casos de altas parasitemias, prostração e morte (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998; SOARES et al. 1999; VASHIST et al., 2008, 2009). Alguns autores já observaram sintomatologia nervosa com paralisia em aves infectadas experimentalmente por *P. juxtannucleare* (AL DABAGH, 1961; VASHIST et al. 2008, 2009). A razão para esta sintomatologia pode ser devido a lesões do tipo necrótica ou inflamatória observadas no cérebro, cordão espinhal, como também pelos efeitos do parasitismo e seus produtos no sistema nervoso central (MOTA, 1997). Em criações comerciais, foi relacionada com a queda na produção de ovos (ITAGAKI, 1970; MASSARD, 1982). Entretanto, Barreto (1943), Paraense (1947), Mota *et al.* (1998) e Krettli (1971) sugeriram que a malária aviária, causada por *P. juxtannucleare*, seja crônica, assintomática e raramente fatal, de acordo com a amostra do parasito.

A patogenicidade de *P. juxtannucleare* está na capacidade de produzir formas exoeritrocíticas teciduais ou livres (PARAENSE, 1950; KRETTLI, 1971; MASSARD, 1982). O primeiro relato de formas exoeritrocíticas ocorreu em células endoteliais dos capilares cerebrais de aves experimentalmente infectadas (BARRETO, 1943). Também já foram observadas formas exoeritrocíticas endoteliais no baço, fígado, medula óssea, pulmão, pâncreas, testículos, músculo cardíaco, timo, suprarenal, adrenal e cérebro, tais achados podem estar relacionados com a morte das aves (PARAENSE, 1947; AL DABAGH, 1961; DHANAPHALA, 1962; ITAGAKI, 1970; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981). Versiani e Gomes (1943) verificaram em necropsias de aves

infectadas por *P. juxtannucleare*, derrame pericárdico e deposição de pigmentos férricos em vários órgãos. Al Dabagh (1961) relatou lesões em órgãos com excessivo grau de infiltração de células redondas no fígado, baço, rim, timo, cérebro e coração. Soni e Cox (1975) ao estudar a malária aviária causada por *P. gallinaceum* observaram glomerulonefrite aguda. Massard (1979) observou em aves de criação industrial infectadas por *P. juxtannucleare*, musculatura flácida e pálida, fragilidade óssea, acompanhada de edema ou congestão pulmonar, discreta hepatomegalia com vesícula distendida e repleta de bile, baço aumentado e escuro, rim pálido, enterite de aspecto mucóide e infiltração gelatinosa nas articulações. Soares et al. (1995) observaram em aves infectadas por *P. juxtannucleare* hipertrofia cardíaca com derrame pericárdico, musculatura flácida e pálida, e observaram todas as formas evolutivas do plasmódio em sangue periférico e tecidual (baço, rim, fígado, pulmão, coração e cérebro).

Análises bioquímicas séricas em humanos e macacos *Aotus* infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum* revelaram alterações nos níveis de glicose sangüínea, proteínas, triglicerídeos, lipídios, colesterol e fosfolipídios, além de alterações nos níveis de enzimas hepáticas pelos danos à integridade celular que este parasito causa nos hepatócitos, as transaminases ficaram aumentadas em mais de três vezes o limite superior da normalidade. Estes dados levam a crer que a malária humana resulta em desnutrição do hospedeiro, cuja gravidade está relacionada ao tipo e estágio da doença (WELLDE et al., 1972, PEREIRA et al., 1995; SILVA et al., 2004). Não consta na literatura a análise destes parâmetros bioquímicos em aves infectadas por *P. juxtannucleare*, não sendo possível ainda mensurar as perdas totais para o setor de criação “rústica” e orgânica de galinhas, ocasionadas por esta infecção.

2.1.5. Criopreservação e passagens

Diferentes amostras de *P. juxtannucleare* foram mantidas em *G. gallus* por passagens sanguíneas sucessivas pelas vias endovenosa, intramuscular e intraperitoneal, em aves jovens na dosagem de 0,5 a 1 mL de sangue, com intervalos de 15 a 30 dias (VERSIANI & GOMES, 1943; KRETTLI, 1971; MASSARD & MASSARD, 1981, SOUZA, 1998).

2.1.6. Técnicas de diagnóstico

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela análise de esfregaços sanguíneos obtidos por venopunção, secção transversal da unha ou escarificação da crista. Geralmente, os esfregaços são fixados em metanol e corados em Giemsa. Os caracteres morfológicos e morfométricos do plasmódio auxiliam na identificação da espécie.

Clinicamente a malária aviária causa curso semelhante à leucose linfóide aviária, tifo aviário, doença de Marek na forma visceral, colibacilose, borreliose e outras doenças infecciosas (HOFSTAD 1978, SOUZA, 1998), daí a importância do diagnóstico diferencial baseado no exame laboratorial. Além disto, não raro pode ocorrer a co-infecção de *Plasmodium* e outros patógenos como espiroquetas, coccídios e vermes.

Técnicas de biologia molecular também podem ser utilizadas para o diagnóstico da malária aviária, mas em geral esta técnica é mais laboriosa e cara em relação às análises hematológicas e imunológicas, é utilizada quando se há dúvida a respeito da espécie de plasmódio em questão ou em estudos de filogenia. Para isto, podem ser utilizados o gene da região *Ssu-rDNA* sub-unidade menor do ribossomo nuclear (gene18s) e gene citocromo B mitocondrial (*citb*) para a caracterização molecular do parasito (ELISEI, 2005).

2.1.7. Tratamento, Vacinação e Profilaxia

Assim como na malária humana, os principais tratamentos da malária aviária são os derivados do quinino, como a cloroquina (VASHIST et al. 2009). A cloroquina é a droga mais comumente utilizada no tratamento da malária, é um fármaco pertencente ao grupo das 4- aminoquinolinas (Figura 1) e se tornou a principal substituta da quinina após a Segunda Guerra Mundial. Possui eficácia contra plasmódios humanos e de outros animais, é barata e acessível (KRETTLI et al., 2001).

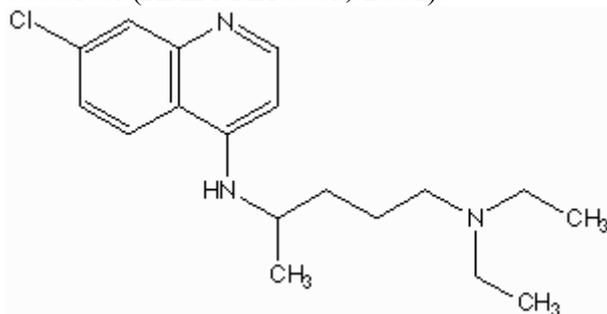


Figura 1. Estrutura química da cloroquina
(<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c802.htm>)

Segundo Mc Ghee et al. (1988), os primeiros modelos utilizados para testes de potenciais antimaláricos foram canários infectados por *Plasmodium relictum*. Bishop et al. (1947) utilizaram este modelo para testar a eficácia da pamaquina, quinina e mepacrina em estágios eritrocíticos do parasito. *P. gallinaceum* também já foi utilizado para testes de drogas sobre formas sanguíneas e *P. juxtannucleare* já foi utilizado em testes com a quinina. A droga foi administrada oralmente por gavagem. As aves jovens tratadas com a quinina não apresentaram infecção eritrocítica significativa, mas morreram duas semanas após a inoculação pela oclusão dos capilares cerebrais devido aos parasitos, ou seja, a quinina não teve atuação sobre as formas exoeritrocíticas de *P. juxtannucleare* (PARAENSE, 1947).

Amaral (2005) testou a cloroquina e os flavonóides, quercetina e rutina, em infecções experimentais por *P. juxtannucleare* em pintos da raça Leghorn Branca e observou que apenas a cloroquina teve atividade antimalárica sobre o parasito, entretanto, em relação ao ganho de peso das aves e variações do hematócrito, destacou-se a quercetina como droga que tendeu a melhorar o estado clínico das aves.

Vashist et al. (2009) testaram um derivado da cloroquina, produzido experimentalmente em laboratório, a quinolina/6-thiopurina conjugada e relataram que esta droga foi mais eficaz no combate ao *P. juxtannucleare* que a cloroquina, além disto não foi observado nenhum efeito colateral nas aves submetidas ao tratamento.

O controle deve ser feito principalmente pela erradicação dos mosquitos vetores (HOFSTAD, 1978) e uso de telas nos criatórios de aves.

2.2. *Borrelia anserina*

Dentre as espiroquetas, *B. anserina* é a única que acomete aves (HOLT et al, 1994). Sakharoff, 1891 foi o primeiro a descrever o organismo do sangue de gansos que sofriam de uma doença febril severa no Caucasus, uma região da antiga União Soviética, nomeando a espiroqueta encontrada de *Spirochaeta anserina*.

As borrelias já foram consideradas protozoários (BRUMPT, 1927), entretanto a falta de polaridade destes organismos os diferencia claramente dos demais protozoários, assim em

1948, os bacteriologistas sistematas colocaram-nas em um grupo especial de bactérias (PESSOA, 1963; KRIEG & HOLT, 1984), sendo a espécie tipo *B. anserina*.

Durante o início do século XX, *B. anserina* foi denominada de diferentes maneiras (KNOWLES et al., 1932). Encontram-se no Manual Bergey de Bacteriologia Determinativa, edição de 1948, as seguintes sinonímias: *Spirochaeta gallinarum*, *Treponema anserinum*, *Spirochaeta anserina* e *Spirochaeta anatis* (MC NEIL et al., 1949). Estas diferentes nomeações justificavam-se principalmente devido aos resultados negativos obtidos em testes de imunidade cruzada executados em aves de laboratório com cepas geográficas diferentes. Hoje em dia são conhecidos diferentes tipos antigênicos de *B. anserina* e a imunidade ativa pode ser sorotipo – específica (DAMASSA & ADLER, 1979; SONI & JOSHI, 1980; NOPPA et al., 1995; SAMBRI et al., 1999).

Morfológicamente, as espiroquetas do gênero *Borrelia* se caracterizam por serem maiores, possuírem maior número de flagelos periplasmáticos (15-20) e menor número do que as bactérias dos outros gêneros desta família (PFISTER et al., 1994; QUINN et al., 1994), embora dentro de uma mesma espécie possa existir pleomorfismo de acordo com a cepa (BENNET, 1995). São bactérias gram-negativas, microaerófilas e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993). O comprimento varia entre 6 e 30 µm, sendo em média 14 µm, com seis espirais, e pode ocorrer uma grande variação em uma mesma ave, devido aos estágios de divisão (MC NEIL et al., 1949). *B. anserina* possui células de formato helicoidal, móveis, cilindro protoplasmático envolvido e limitado pela membrana celular interna, pelos flagelos e por uma membrana celular externa (BARBOUR & HAYES, 1986).

A posição sistemática de *B. anserina* segundo classificações de bactérias (BARBOUR & HAYES, 1986; NCBI, 2005):

Reino - Procaryotae
Classe - Spirochaetes
Ordem - Spirochaetales
Família - Spirochaetaceae
Gênero - *Borrelia*
Espécie - *Borrelia anserina*

2.2.1. Distribuição

No Brasil o primeiro surto desta espiroquetose foi relatado em galinhas por Marchoux e Salimbeni (1903), que apontaram *Argas persicus* como o artrópode vetor desta bactéria, o que foi confirmado por outros autores em vários continentes (PROWAZEK, 1909; KNOWLES et al., 1932; DIAB & SOLIMAN, 1977).

A espiroquetose aviária ocorre no mundo todo, especialmente em áreas tropicais e subtropicais. Já foi relatada como a maior causa de mortalidade em aves no Norte e Sul da África, Índia, Síria, Palestina, Turquia, estados Balcânicos, Grécia, Rússia, Austrália, Java, Brasil, Argentina e Estados Unidos (MC NEIL et al., 1949, LISBÔA, 2006).

2.2.2. Hospedeiros vertebrado e invertebrado

Há relatos de surtos naturais de borreliose aviária em galinhas, gansos, perus, patos, e canários. Experimentalmente já foram infectados corvos, pombos, aves da guiné, perdizes, cotovias, e pardais (MC NEIL et al., 1949).

Dentre as aves, os pombos são bastante resistentes à infecção. Coelho jovens foram infectados através de inoculação intraperitoneal (LEVADITI & LANGE, 1905), mas a infecção foi transitória. Lagartixas, rãs, sapos, esquilos, porcos, ratos, cachorros, macacos e mulas quando infectados por *B. anserina* resistiram à infecção, mostrando que esta verdadeiramente é um tipo de espiroqueta aviária (MC NEIL et al., 1949).

Os vetores de *B. anserina* são carrapatos do gênero *Argas*, servindo como reservatórios naturais, pois as borrelias desenvolvem-se como simbiontes nestes artrópodes sobrevivendo por longos períodos, mas atuam como parasitos nas aves. A infecção é transmitida, na maioria dos países da Europa e África, por *Argas persicus*, na América do Norte e do Sul por *Argas miniatus*, no Sul da Europa por *Argas reflexus*, e na Austrália por *A. persicus* var. *victorensis* (HUTYRA et al., 1947).

O modo de transmissão das borrelias pode ser transovariano (vertical) e/ou transestadial (horizontal). Nas espécies transmitidas pelos argasídeos ocorre primordialmente a forma transovariana, o que é bem caracterizado no gênero *Argas* com *B. anserina*, embora ocorra também transmissão horizontal, principalmente com as borrelias do grupo da febre recorrente para *Ornithodoros* (HOOGSTRAAL, 1979, 1985; BARBOUR & HAYES, 1986). Contudo nos argasídeos, o modo de transmissão está intrinsecamente relacionado à cepa do carrapato, à região fisiográfica, à espécie de borrelia e ainda à associação com outros patógenos (DIAB & SOLIMAN, 1977; ZAHER et al., 1977; HOOGSTRAAL, 1985). Nos argasídeos, todos os ínstares tem habilidade para transmitir *Borrelia* e, o tempo de fixação no hospedeiro não é relevante na eficiência da transmissão, isto porque, nesta família a principal forma de transmissão de *Borrelia* é através do líquido coxal, ocorrendo raramente a transmissão por via salivar. Após os carrapatos adultos alimentarem-se em galinhas infectadas, as espiroquetas atravessam o intestino e ganham o celoma, após três dias já podem ser encontradas no líquido coxal. Há relato de espiroquetas que penetraram a parede do intestino e foram observadas na hemolinfa de carrapato 2 horas depois da alimentação infecciosa. Após 14 dias, as espiroquetas já se multiplicaram o suficiente para estarem em todo o organismo do carrapato, principalmente nas glândulas salivares e tubos de Malpighi, nesta fase os carrapatos são extremamente infecciosos (BIER, 1985). Knowles et al. (1932) encontrou espiroquetas ao longo dos tecidos do carrapato, evidenciando a elevada infectividade destas bactérias.

LaBruna et al. (1997) testaram a transmissão de *B. anserina* pelo carrapato *Amblyomma cajennense* e verificou que este não transmitiu a espiroqueta para as aves, no estágio de ninfa, nas condições experimentais.

2.2.3. Vias de inoculação, período pré-patente e pico máximo de espiroquetemia

O período pré-patente, ou período de incubação de *B. anserina* inoculado experimentalmente em aves através de sangue infectado ou soro infectado, em geral é curto sendo em média de 2 a 4 dias, e pode estar relacionada à via de inoculação (SHOMMEIN & KHOGALI, 1974; BANDOPADHAY & VEGAD, 1983). Em galinhas o período de incubação é marcado por um aumento na temperatura para 43,3°C ou mais (MC NEIL et al., 1949).

Em espécimes jovens de *G. gallus* as inoculações intravenosa, intramuscular, e subcutâneas foram respectivamente as com maior mortalidade. Também foi possível estabelecer infecção em pintinhos com 6 dias de idade por inoculações nasal, oral e intraorbital, todos os espécimes jovens de *G. gallus* morreram dentro de 10 dias. Grupos de frangos com três semanas de idade foram inoculados com sangue infectado vias oral, retal,

nasal, intraorbital e subcutânea, o que resultou em 50% de mortalidade nos primeiros quatro grupos e 100% no último grupo. Espécimes jovens e adultos de *G. gallus* também foram infectados por inoculação intraperitoneal de baço macerado e tecido de fígado de aves infectadas (MC NEIL et al., 1949).

O período pré patente nas aves inoculadas a partir de carrapatos infectados é em média de três a oito dias (MC NEIL et al., 1949; BOERO, 1967; BIER, 1985, HUTYRA et al., 1947).

Em experimento com galinhas da linhagem Leghorn branca o pico máximo de espiroquetemia em geral ocorreu 96 horas após a inoculação, após 120 horas as aves morreram (SHOMMEIN & KHOGALI, 1974).

Lisbôa (2006) infectou *G. gallus* experimentalmente com *A. miniatus* infectados por *B. anserina* e encontrou período pré-patente de 5 dias, sendo que o pico máximo de espiroquetemia ocorreu entre 6 e 9 dias pós exposição das aves aos carrapatos.

Há relato de aves infectadas com sangue parasitado que permaneceram negativas até 9 dias pós inoculação. E aves que receberam macerados de tecidos infectados que permaneceram negativas até 28 dias pós infecção (DICKIE & BARRERA, 1964). Em geral a infecção por *B. anserina* não se mantém nas aves por muito tempo, após o pico da infecção as espiroquetas desaparecem da circulação sanguínea, sendo que as aves podem adoecer e/ou chegar ao óbito sem que se torne possível visualizar espiroquetas sanguíneas (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903).

2.2.4. Patogenias

As aves manifestam a doença em média 4 a 6 dias depois de terem sido picadas por um *Argas* infetado. As espiroquetas aparecem no sangue, onde se multiplicam ativamente durante uns 3 dias, findos os quais sobrevém uma crise, com baixa da temperatura e desaparecimento das espiroquetas do sangue circulante. As aves doentes manifestam diversos sintomas, dentre eles diarréia verde escura, enterite aguda, inapetência, sonolência, penas eriçadas, crista pálida, podendo ocorrer paralisia das asas ou patas. A temperatura corporal das aves durante a infecção oscila entre 42-43° C. Durante toda a duração da primeira fase, que dura 4 ou 5 dias, a temperatura se mantém elevada e depois fica abaixo de 41°C, se a ave não morrer. Caso a ave permaneça na fase caquética a temperatura continuará baixa e a morte sobrevém com a hipotermia. Quando o estado se agrava, em geral as aves deitam a cabeça por não possuírem mais força para levantar ou escondem a cabeça na asa. E quase sempre depois disto chegam ao óbito. As infecções são mais severas em animais jovens do que em adultos (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903; BOERO, 1967; BIER, 1985, LISBÔA, 2006).

Algumas vezes a doença apresenta a forma crônica, o animal apresenta uma melhora mas em seguida fica novamente prostrado e com paralisia das patas, posteriormente das asas, a ave emagrece consideravelmente e morre caquética em um período entre 8 e 15 dias. Em outros casos as aves curam-se completamente após o período crítico da infecção, e ainda raramente podem se curar depois de um quadro de paralisia, o estado geral melhora, o peso volta a aumentar e a temperatura se eleva. Mas raramente uma ave jovem é completamente refratária. Quando galinhas morrem desta espiroquetose no galinheiro as outras aves ficam susceptíveis à infecção (BANDOPADHAY & VEGAD, 1984). Mortalidade de 60-80% já foi relatada.

Os espécimes jovens de *G. gallus* adquirem a doença muito facilmente por inoculação. Os sintomas são os mesmos tanto nas galinhas novas quanto nas adultas. As aves de raças mais puras costumam ser mais severamente acometidas por esta espiroquetemia do que as

aves mestiças. Gansos e patos são muito sensíveis à espiroqueta da galinha. Eles morrem de 5 a 6 dias com todos os sintomas de uma infecção grave. As espiroquetas são encontradas em grande número no sangue. O pombo, através da inoculação do sangue infectado, apresenta durante algum tempo uma pequena elevação da temperatura e um pouco de prostração e inapetência, mas dificilmente são encontradas espiroquetas no sangue (LEVADITI & LANGE, 1905; MC NEIL et al., 1949).

Em galinhas inoculadas com cepa virulenta, durante a fase aguda podem ser encontradas formas da espiroqueta no fígado, baço, pulmões, rins e cérebro, mas sempre confinados no sistema (WENDY et al, 1964). A consistência do sangue é alterada. Quando se realiza necropsia de ave que morreu na fase aguda, o baço se apresenta tumefeito com hiperplasia, lesões severas, e aumento do tamanho em 4-6 vezes em relação ao normal. O fígado, em geral, apresenta-se com coloração escura, aumentado de volume, com hemorragia subcapsular, áreas necróticas que podem variar entre 1-2 mm em diâmetro, com degeneração gordurosa mais ou menos acentuada. Os outros órgãos não se apresentam seriamente lesados. O pericárdio contém frequentemente depósitos de fibrina e hemorragia petequial. O fluxo do coração apresenta-se fluido, cor de vinho. Os rins frequentemente ficam pálidos, inchados e degenerados. Os ureteres apresentam substância amarelada. Os intestinos possuem enterite catarral e outras lesões encontradas incluem ulcerações nas moelas e pró-ventrículo.

Em perus foi observado que os músculos do peito estavam congestionados e o coração frequentemente apresentava pericardite fibrosa. Os fígados apresentavam abscessos pequenos, com áreas de necrose periféricas não tão pronunciadas como nas galinhas. O baço quase sempre aumentado e os ovários congestionados com hemorragia. Os intestinos ficam esverdeados, com enterite mucóide, congestões marcadas do duodeno, e no reto são encontrados conteúdos manchados de verde amarelado por causa de uratos em excesso (Mc NEIL et al., 1949).

A causa de morte pela espiroquetemia pode ser devido à inibição de formação de hemácias, que leva ao decréscimo da absorção de oxigênio e resulta em asfixia. A inibição da formação de hemácias pode ser devido a uma toxina produzida pela espiroqueta, ou pelo funcionamento anormal de um dos órgãos internos, como por exemplo, o baço ou o fígado (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903).

Quando se examina o sangue de uma galinha doente durante a fase aguda encontram-se espiroquetas em quantidade elevada, de acordo com o estado do animal. Inicialmente as espiroquetas são visualizadas isoladas, mas à medida que a infecção aumenta, elas se reúnem em pequenos aglomerados que são encontrados em todo o esfregaço sanguíneo. Estes pequenos grupos se reúnem depois em grandes aglomerados que vão para as extremidades do esfregaço. Quando visualizado o soro infectado ao microscópio observa-se que as espiroquetas isoladas são muito móveis, rígidas e avançam rapidamente em torno do seu próprio eixo, como o movimento de um saca-rolha. Logo que elas começam a formar os aglomerados, o seu movimento de progressão fica mais lento, elas se fecham e se voltam para elas mesmas de maneira a apresentar formas em 0 ou 8. Depois elas se enlaçam, e se enovelam umas nas outras, e posteriormente apresentam apenas movimentos lentos e pouco energéticos (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903).

Estudos hematológicos da borreliose aviária, revelaram diminuição marcante do número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina do sangue (SHOMMENIN & KHOGALI, 1974). As alterações dos valores hematológicos podem ser também atribuídas aos produtos tóxicos lançados na circulação resultantes da multiplicação das espiroquetas (HUTYRA, 1947). LISBÔA et al. (2008) ao estudarem aspectos da transmissão biológica experimental de *B. anserina* por *Argas miniatus*, realizaram avaliações relativas aos parâmetros hematológicos em galinhas e concluíram que as aves infectadas demonstraram

elevada sensibilidade e alterações hematológicas compatíveis com a infecção bacteriana estudada.

De acordo com RUPLEY (1999) a anemia em aves é causada pelos mesmos mecanismos dos mamíferos tais como alterações na hematopoiese e conseqüente diminuição na produção de eritrócitos, na sua destruição ou na perda de sangue.

Em um estudo a respeito de alterações bioquímicas no sangue de galinhas infectadas por *B. anserina* realizado por Rivetz et al., 1977, foram avaliados os níveis séricos das enzimas fosfatases alcalina e ácida (ALP e AcP), transaminase glutâmico oxalacética (TGO ou AST), e também os níveis de ácido úrico, proteínas, globulinas, albumina, lipídios totais e colesterol. Quando comparados os grupos controle e infectado foi observado que a fosfatase alcalina diminuiu drasticamente nas aves infectadas, o que pode estar relacionado ao fato de que esta enzima se origina principalmente do estômago (BIDE, 1970) e seu nível é afetado por doenças como a enterite (RIVETZ et al., 1975) também causada por *B. anserina*. Outra possível causa para a redução desta enzima foi a anorexia e baixa ingestão de alimentos pelas aves infectadas (BIDE, 1972). O nível da enzima hepática TGO aumentou nas aves infectadas, o que possivelmente estava relacionado aos danos teciduais que as espiroquetas causaram no baço e especialmente no fígado das aves. Houve decréscimo no ácido úrico sérico, o que pode ser explicado pelos danos que as espiroquetas causaram ao tecido renal das aves e também pela diminuição da ingestão de alimentos. Os níveis de proteínas totais e globulina aumentaram nas aves infectadas, enquanto que o nível de albumina diminuiu, estes registros são característicos de uma resposta inflamatória à infecção bacteriana (BUTLER, 1971). Os níveis de lipídeos e colesterol também diminuíram nas aves infectadas, provavelmente devido à má absorção intestinal, causada pela presença das espiroquetas no intestino.

2.2.5. Criopreservação e passagens

Borrelia anserina tem sido tradicionalmente mantida em laboratório através de passagens em galinhas domésticas jovens e adultas ou em ovos de galinha embrionados (McNEIL et al., 1949; BARNES, 1997).

A criopreservação de *B. anserina* tem tido sucesso por longos períodos (DHAWEDKAR & DHANESAR, 1983; LABRUNA et al., 1999). *B. anserina* pode permanecer viável por 150 dias em soro de aves e sangue citratado com ou sem glicerol quando estocados em nitrogênio líquido (HART et al., 1970). Outro estudo aponta que *B. anserina* em sangue citratado, plasma e soro (com ou sem glicerol 15%) pode ser mantida viva e virulenta por 4-5 semanas a 4°C e por 8 semanas a -70°C (GINAWI & SHOMMEIN, 1980). Soros de aves experimentalmente infectadas, contendo espiroquetas viáveis acrescidos de glicerol na diluição de 1/2 (v/v), designado como soro com glicerol a 50% (GS), e dimetilsulfóxido na proporção de 1/10 (v/v), designado como soro com DMSO a 10% (DS), mantiveram a infectividade após 15 meses de estocagem em nitrogênio líquido, sendo o DMSO a 10% no soro de frango o mais satisfatório como criopreservante (LABRUNA, 1999).

Há relato do encontro de espiroquetas móveis em fluido corioalantóideo, as espiroquetas mantiveram a motilidade por 2 a 3 semanas quando mantidas a 4°C e estas foram capazes de infectar ovos embrionados e frangos jovens após serem inoculadas. Esta demonstração eliminou qualquer questão quanto ao efeito possivelmente deletério do líquido corioalantóideo sobre as espiroquetas. A viabilidade, baseada na motilidade, pareceu ser mantida por mais tempo nas espiroquetas mantidas no fluido corioalantóideo do que no sangue congelado de galinhas, mantidos sobre as mesmas condições. (McKERCHER, 1949).

Borrelia anserina pode ser mantida em meio Barbour–Stoenner–Kelly (BSK), mas um estudo relatou que as espiroquetas perdem sua virulência após 12 passagens (LEVINE et al., 1990). A preservação de *B. anserina* em meios de cultura não é utilizada rotineiramente, devido às exigentes necessidades nutricionais bacterianas. Colônias de *Argas* infectados com *B. anserina* têm sido utilizadas para manter a viabilidade e a patogenicidade bacterianas inalteradas, entretanto este é um método caro e requer um suprimento de aves susceptíveis alimentadas com dieta livre de antibióticos e alojamento especial (LISBÔA, 2006).

2.2.6. Técnicas de diagnóstico

Surtos são comumente reportados, mas a confirmação laboratorial é dificultada já que antibioticoterapia é procedida imediatamente na ocorrência de mortalidade nas criações.

O diagnóstico clínico é realizado durante a fase aguda, através de esfregaços sanguíneos periféricos, preferencialmente corados pelo Giemsa, e através de exames histopatológicos dos órgãos afetados, corados pela hematoxilina-eosina (SHOMMEIN & KHOGALI, 1974; RIVETZ, 1977).

A técnica direct fluorescent antibody (FA) é utilizada para detectar *Borrelia* em tecidos e sangue de aves experimentalmente infectadas (WENDY et al., 1964).

A relação *Borrelia*-carrapato é tão estreita, que a espécie pode ser isolada e identificada com o auxílio do xenodiagnóstico, utilizando-se a aposição de tecidos dos carrapatos como intestinais e glândula salivar, e ainda, exame de hemolinfa e de líquido coxal em microscopia de campo escuro (BIER, 1985; APPEL et al., 1993; SOARES et al., 2000).

O diagnóstico de infecções bacterianas em aves frequentemente requer os seguintes procedimentos: avaliação histórica do plantel, exame físico das aves, necropsia total para identificar lesões de órgãos, exame histopatológico, cultura bacteriana, sensibilidade antibiótica e sorologia. Certas infecções bacterianas entéricas podem ser diagnosticadas baseadas na história do plantel e exame físico de aves doentes no campo. Porém, na maioria dos casos um diagnóstico definitivo deveria ocorrer submetendo-se aves mortas e moribundas para um laboratório de diagnóstico veterinário onde provas mais específicas podem ser executadas. Em doenças bacterianas que afetam muitos órgãos, um exame superficial e diagnóstico no campo podem inadvertidamente negligenciar a área intestinal. Na realidade, um intestino que é normal a vista desarmada pode ter lesões inflamatórias que só podem ser descobertas através de avaliação microscópica. Exames histológicos e citológicos do intestino são essenciais para determinar a extensão do dano intestinal, considerando que a cultura bacteriana e sensibilidade antibiótica podem ser bastante úteis para tratamento direto da desordem entérica (PORTER, 1998).

2.2.7. Tratamento, Vacinação e Profilaxia

Alguns estudos sobre aspectos epizootiológicos da doença como também seu possível tratamento com antibióticos foi realizado em algumas partes do mundo (RUBINA et al., 1975; BORNSTEIN & SAMBERG, 1954; MCNEIL et al., 1949). Classicamente, a espiroquetose aviária era tratada com a injeção intramuscular de neosalvarsan (15 mg por quilo). Atualmente utilizam-se com bom resultado os antibióticos: penicilina (5.000 ui/kg), estreptomicina (50 mg/kg) e terramicina (2 mg/kg) (BIER, 1985). Cada um dos seguintes sete antibióticos produziram cura depois de um ou dois tratamentos com dosagens adequadas: aureomicina, bacitracina, cloromicetina, dihidroestreptomicina, penicilina G, estreptomicina

e terramicina (HSIANG & PACKCHANIAN, 1951). Aves tratadas com penicilina ou estreptomicina são resistentes à inoculação subsequente.

Segundo El-Dardiry (1945) muitos dos arsênicos tem resultados muito satisfatórios, mas nenhuma das sulfonamidas testadas por ele (sulfanilamida, sulfatiazole, sulfapiridina e sulfadiazina) teve qualquer resultado benéfico. Além disto, o lote de penicilina utilizada por ele não foi efetivo. Nobrega e Bueno (1945) relataram que o uso próspero de penicilina para a espiroquetose em galinhas adultas deve ocorrer à taxa de 10.000 unidades em 5 doses a intervalos de três horas, mas posteriormente em 1946 estes autores relataram que 5.000 unidades por quilograma foi suficiente para curar a espiroquetose em galinhas adultas, entretanto um total de 20.000 unidades por quilograma não foi suficiente para curar frangos jovens, e atribuíram isto ao fato de que nestes, nenhum anticorpo havia sido formado ainda naquela ocasião.

Em perus infectados naturalmente e experimentalmente o tratamento com penicilina foi efetivo, e um único tratamento intramuscular de 5 mg de Mapharsen® por quilograma foi efetivo contra as espiroquetas em 24 horas. Quando determinado à taxa de 12.5 mg por quilograma, colocado na água para beber, durante 40 horas, todas as aves morreram. Um grupo controle não infectado também recebeu o tratamento e não foi afetado por este.

Heilman (1945) informou uso bastante próspero da estreptomicina em *Borrelia novyi* em infecções em ratos, embora não tão próspero como a penicilina. Foi realizado um experimento com quatro frangos com 30 dias de idade inoculados subcutaneamente com *B. anserina*, dois demonstraram infecções agudas e outros dois infecções moderadas. Todas receberam 15.000 unidades (microgramas) de estreptomicina via intramuscular. Um dos quatro morreu, e dois dos quatro frangos controles que tinham os mesmos graus de infecção morreram (MC NEIL et al., 1949).

Em algumas partes do mundo são produzidas vacinas feitas a partir de tecidos e sangue. Nobrega e Reis (1941) obtiveram bons resultados com uma vacina feita a partir de ovos de galinha embrionados inoculados no 12º dia de incubação e colhidos cinco dias depois, e sugeriram que este é o método mais econômico de preparação de vacinas (MC NEIL et al., 1949).

Em um estudo a respeito da borreliose aviária sugeriu-se que o uso de acaricidas organofosfatados é mais econômico para controlar carrapatos aviários e que o controle deveria ser a intervalos não maiores do que uma semana (KAWTHER et al., 1982).

A profilaxia da espiroquetose compreende o combate ao carrapato, com a construção de galinheiros higiênicos, de madeira maciça e livre de frestas, com poleiros pendurados no teto, sem contato com o chão e pulverizado com inseticidas. A vacinação é feita mediante a inoculação de 1 ml de uma vacina preparada com sangue e órgãos (fígado, baço e pulmão) de galinhas infectadas (em glicerina a 50% e atenuada durante 16-18 dias na geladeira). O efeito da vacina contra a espiroquetose é dos mais nítidos, depois de 2 dias as aves são capazes de resistir à inoculação de sangue virulento. A vacina se conserva muito bem durante um prazo praticamente indefinido e a imunidade que ela confere perdura, pelo menos, durante um ano.

2.3. Associação de parasitoses

Nas aves, há relatos da ocorrência de *B. anserina* em conjunto com a rickettsia intraeritrocítica *Aegyptinella pullorum*, ambas transmitidas por *Argas* sp. (BRUMPT, 1927; HOOGSTRAAL, 1985). No Brasil, a descrição da malária neotropical das aves galiformes foi feita em 1941, quando os pesquisadores Versiani e Gomes ao estudarem a borreliose aviária, observaram e descreveram, casualmente *P. juxtannucleare* (VERSIANI & GOMES, 1941,

SOARES et al., 2000). A rickettsia intraeritrocítica das aves no Brasil é *Neitziella rezendei* foi descrita ao se pesquisar malária aviária (MASSARD et al., 1976).

Em humanos existem relatos de casos de parasitos do gênero *Plasmodium* e *Borrelia* ocorrendo simultaneamente, mas acredita-se que isto seja mais freqüente que o relatado. Tanto a malária como a borreliose humanas são caracterizadas por febre alta, dores de cabeça, mialgia, hepatoesplenomegalia e tendência ao cansaço. Ambas as doenças são transmitidas por picadas de artrópodos e geralmente diagnosticadas através de exames de sangue periférico, através de esfregaços sanguíneos (BERGER & DAVID, 2005). Quando ocorrem simultaneamente causam severa anemia hemolítica e levam rapidamente o indivíduo a morte. Ainda são poucos os casos mencionados na literatura desta co-infecção, talvez pelo erro no diagnóstico, já que ambas as infecções são comuns em determinadas localidades do mundo. O sinergismo entre as infecções causadas por *Plasmodium* e *Borrelia*, tanto em humanos quanto em animais foi bem pouco estudado até o presente momento (MIRON et al., 2004).

2.4. Importância econômica do *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina*

Plasmodium juxtannucleare pode ser causa de morbidade e mortalidade, sendo responsável por perdas econômicas no setor da avicultura, em especial na produção de ovos (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; MASSARD, 1982; SOUZA, 1998; SOARES et al., 1999).

Borrelia anserina já foi responsável por grandes perdas econômicas para a indústria avícola em diversas partes do mundo (SHOMMEIN & KHOGALI, 1974). Nos sistemas de produção avícolas, as aves precisam ter um saudável funcionamento intestinal para manter garantir o aproveitamento nutricional dos alimentos. Mais da metade dos custos envolvidos na avicultura se destinam à alimentação, e por isso, qualquer dano na área intestinal, mesmo pequeno, causados por bactérias patogênicas pode acarretar na diminuição do ganho de peso nas aves elevando os custos totais de produção. Já as enterites mais severas, causadas por infecção bacteriana, causam mortalidade alta em um plantel avícola (PORTER, 1998).

Atualmente, a indústria avícola está muito avançada com respeito à globalização, industrialização, integração vertical e agregação, tal que algumas das principais companhias de agroindústria controlam a indústria avícola virtualmente em diversos países. Estas modificações diminuíram as possibilidades de estabelecimento de carrapato em criações intensivamente administradas. Em muitos países onde a espiroquetose já foi relatada como a doença mais severa das criações de aves no passado (ARAGÃO, 1911; KNOWLES et al., 1932; GORRIE, 1950; SA'IDU et al., 1995) já não é mais assim, a doença foi limitada a criações pequenas mantidas para consumo pessoal ou venda local muito limitada, sem impacto econômico significativo para o país (CAB Internacional, 2002). Isto poderia ser explicado pelo constante uso de antibióticos em níveis subterapêuticos em rações de animais, com o objetivo de proporcionar aumento no ganho de peso, melhora da conversão alimentar e redução da mortalidade.

Porém, os sistemas de criações orgânicas, especialmente de produção de ovos, desde alguns anos estão ressurgindo em diversos países, e atualmente tornando-se uma tendência mundial em grupos de pessoas que se preocupam com a boa saúde pessoal e com o bem-estar animal em relação aos complexos de grandes fazendas. Isto gera uma tendência para o estabelecimento de populações de *Argas* e, por conseguinte, a reemergência das espiroquetoses das aves nestes sistemas orgânicos (CAB Internacional, 2002), além disto, as aves criadas de forma “alternativa” ou orgânica ficam expostas aos mosquitos vetores de plasmódio aviário. Além da importância histórica da espiroquetose aviária, o agente é ainda amplamente prevalente e sua reemergência como um patógeno veterinário importante

poderia acontecer em um futuro próximo. Esta reemergência depende basicamente de mudanças nos sistemas de criação que possam de alguma forma favorecer a introdução e estabelecimento do vetor carrapato (ATALIBA et al., 2007).

Embora o uso de antibióticos em rações comerciais seja uma boa alternativa como profilaxia e controle de doenças parasitárias nas aves, o uso desses produtos tem sido amplamente questionado pela comunidade científica devido à possível relação deles com a resistência aos antibióticos utilizados na antibioticoterapia humana.

Órgãos internacionais tais como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) tem registrado um aumento da frequência de casos de resistência bacteriana aos principais compostos antibióticos. Apesar de tal problema estar associado à utilização indiscriminada desses compostos na medicina humana, a rapidez e a amplitude de disseminação de alguns isolados resistentes indicam que a dispersão dessas bactérias não pode ser inteiramente atribuída à transmissão entre seres humanos. Assim, a atenção recai sobre os alimentos e a forma como são produzidos (DEMATTE FILHO & MENDES, 2001).

Alguns governos, em especial os europeus, adotaram medidas legais para o controle do uso de antibióticos na produção animal. Apesar da incerteza sobre a relação direta entre o uso de certos antibióticos na produção animal e o aumento de resistência a estes em humanos, a proibição de seu uso é considerada pelo Tribunal Europeu como medida legal, dada à necessidade de proteger a saúde pública, segundo o pretexto de que “questões do gênero não podem ficar dependentes do resultado de pesquisas científicas” (AVISITE, 2010).

As dimensões de mercado interno e externo para os frangos diferenciados são difíceis de estimar, havendo pouca literatura a respeito. É um mercado que vem crescendo no Brasil, com aumento no número de consumidores de produtos orgânicos, naturais ou ecológicos. Portanto, estudos que visam compreender no maior espectro possível as parasitoses passíveis de ocorrer em frangos criados sem medicamentos e o sinergismo entre estas parasitoses podem e devem contribuir para a elaboração de novas estratégias de controle e prevenção destas doenças em sistemas de criação “alternativos”, já que este é um mercado em ascensão e com grandes chances de futuramente substituir grande parte dos sistemas de criação convencionais, com largo uso de antibióticos.

Capítulo I

***Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em aves no município de Seropédica, RJ e aspectos biológicos do isolado proveniente de aves ornamentais da raça Sedosa do Japão**

Capítulo 1- *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em aves no município de Seropédica, RJ e aspectos biológicos do isolado proveniente de aves ornamentais da raça Sedosa do Japão

RESUMO

Plasmodium juxtannucleare é um hemoparasito frequente em aves. O objetivo deste trabalho foi buscar e isolar *P. juxtannucleare* de aves do município de Seropédica, RJ, realizar análises morfológica, morfométrica (diâmetro maior - dM; diâmetro menor - dm; índice morfométrico - IM) e molecular do parasito, avaliar sua infectividade e virulência em aves de importância comercial. Foram realizados esfregaços sanguíneos de 120 galinhas, 32 patos, 15 marrecos, 35 gansos e 32 perus de criações rústicas do município de Seropédica. Os esfregaços sanguíneos foram fixados, corados e analisados em microscópio de luz, foram registradas as prevalências e parasitemias dos grupos de aves amostradas. Dentre as galinhas 18 eram da raça ornamental Sedosa do Japão. Com a amostra de *P. juxtannucleare* isolado de uma galinha da raça sedosa do Japão, foram inoculadas cinco aves jovens da mesma raça, cinco codornas e cinco patos, para avaliação da infectividade e virulência do isolado, a parasitemia foi acompanhada por meio de esfregaços sanguíneos feitos a cada três dias por período de trinta dias. As aves foram observadas quanto à presença de sinais clínicos decorrentes da infecção. As prevalências de *P. juxtannucleare* em galinhas, patos, marrecos, gansos e perus foi de 56%, 28%, 32%, 40% e 50%, respectivamente, e as parasitemias médias de 0,12%, 0,08%, 0,02%, 0,03% e 0,1%, respectivamente. Nos esfregaços sanguíneos de galinhas da raça Sedosa do Japão foram encontrados em maior frequência esquizontes, seguidos de trofozoítos e gametócitos. As análises morfológicas, morfométricas e moleculares confirmaram que o parasito isolado de ave da raça Sedosa do Japão para as inoculações experimentais era *P. juxtannucleare*. As jovens aves da raça Sedosa do Japão, codornas e patos inoculados se infectaram, sendo que as Sedosas do Japão exibiram maiores valores de parasitemia e sinais clínicos da infecção como prostração e diarreia, o que pode estar relacionado à alta predileção de *P. juxtannucleare* por *Gallus gallus*, as codornas e patos exibiram parasitemias baixas e infecções assintomáticas. Podemos concluir que *P. juxtannucleare* é frequente em galinhas, patos, marrecos, gansos e perus do município de Seropédica, RJ. Nas infecções experimentais realizadas, as galinhas da raça sedosa do Japão foram mais susceptíveis à infecção do que patos e codornas.

Palavras-chave: Malária aviária, plasmódio, aves ornamentais, aves comerciais.

Chapter 1- *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, in fowls of Seropédica city, RJ and biological aspects of the strain from ornamental fowls of Japan Silks breed.

ABSTRACT

Plasmodium juxtannucleare is a hemoparasite frequent in birds. The aim of this study was to find and isolate *P. juxtannucleare* from birds in Seropedica City, RJ, perform morphological, morphometric (higher diameter - dM; smaller diameter - dm; morphometric index - IM) and molecular analyses of parasite, evaluate its infectivity and virulence in commercial poultry. Blood samples were collected from 120 chickens, 32 ducks, 15 widgeons, 35 geese and 32 turkeys from Seropédica rustic creations. Blood smears were fixed, stained and examined under light microscope, the prevalence and parasitaemias of birds sampled groups were recorded. Among the hens, 18 were ornamental breed. The sample of *P. juxtannucleare* isolated from a chicken Japan silky was inoculated in five young birds in the same breed, five quails and five ducks, to evaluate the infectivity and virulence of the strain, the parasitemia was monitored through blood smears done every three days during thirty days. The birds were observed for the clinical signs presence resulting from infection. The prevalences of *P. juxtannucleare* in chickens, ducks, widgeons, geese and turkeys were 56%, 28%, 32%, 40% and 50%, respectively, and the parasitaemias were, in average, 0.12%, 0.08%, 0.02% 0.03% and 0.1% , respectively. The evolutive forms of *P. juxtannucleare* in blood smears of Japan silky fowl more frequently were schizonts followed by trophozoites and gametocytes. The morphological, morphometric and molecular analyses confirmed that the parasite from Japan silky fowl was *P. juxtannucleare*. The young birds Japan silky breed, quails and ducks inoculated became infected, and the Japan silky exhibited higher parasitaemia and clinical signs of infection such as diarrhea and prostration, which could be related to the high predilection of *P. juxtannucleare* for *Gallus gallus*, quails and ducks exhibited lower parasitaemias and asymptomatic infections. It is concluded that *P. juxtannucleare* is a common parasite in hens, ducks, widgeons, geese and turkeys in Seropédica, RJ. In the experimental infections performed, Japan silky fowl were more susceptible to infection than ducks and quails.

Keywords: avian malaria, *Plasmodium*, ornamental birds, commercial poultry.

1. INTRODUÇÃO

Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1943 é um hemoparasito frequente em aves de quase todos os estados do Brasil, especialmente em frangos, e ocorre ainda em outros países da América Latina, Ásia e África (BELTRÁN, 1941, 1943; CASSAMAGNAGHI, 1947; PARAENSE, 1949; ISHIGURO, 1957; AKIBA, 1959; DHANAPALA, 1962; BENNET et al., 1966; MANWELL, 1966; MOHAN & MANWELL, 1966; KRETTLI, 1972; SERRA-FREIRE & MASSARD, 1976, SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979, MASSARD & MASSARD, 1981; LOURENÇO DE OLIVEIRA & CASTRO, 1991; VASHIST et al. 2003; SANTOS-PREZOTO et al., 2004; VASHIST, 2006). Além da galinha doméstica, há registros de outras aves parasitadas por *P. juxtannucleare* como faisões, perus, perdizes e pinguins (DISSANAIKE, 1963; MANWELL, 1966; MOHAN & MANWELL, 1966; SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979; MASSARD & MASSARD, 1981; GRIM et al., 2003).

ELISEI et al. (2001) realizaram a caracterização morfológica e morfométrica do isolado MSS-47 de *P. juxtannucleare*, do município de Seropédica, RJ, proveniente de galinha sem raça definida, adulta e criada de forma rústica e observou que os trofozoítos possuíam formas puntiformes, ovais, piriformes, elípticas e arredondadas, com uma predominância de ovóides e elípticas. A média dos diâmetros maior (dM) e menor (dm) de 106 trofozoítos foi $1,802 \pm 0,313 \times 1,230 \pm 0,2 \mu\text{m}$, com índice morfométrico (IM) $0,623 \pm 0,110 \mu\text{m}$. Em 98 esquizontes foram observadas formas ovóides, elípticas, amebóides, e predominantemente ovais e piriformes. Os esquizontes tiveram diâmetros médios de $2,809 \pm 0,187 \mu\text{m} \times 1,820 \pm 0,386 \mu\text{m}$, com IM de $0,643 \pm 0,120 \mu\text{m}$. Dentre 18 macrogametócitos houve formas ovóides, redondas, elípticas e piriformes, com uma predominância de ovóides e elípticas, os diâmetros médios foram de $3,559 \pm 0,883 \mu\text{m} \times 2,363 \pm 0,207 \mu\text{m}$, com IM de $0,766 \pm 0,078 \mu\text{m}$. Em 34 microgametócitos, haviam formas ovóides, redondas, elípticas e piriformes, com uma predominância de ovóides e elípticas, os diâmetros médios foram de $3,891 \pm 0,946 \mu\text{m} \times 2,386 \pm 0,783 \mu\text{m}$, com IM de $0,505 \pm 0,103 \mu\text{m}$.

Os sintomas decorrentes das infecções causadas por *P. juxtannucleare* são variados de acordo com o grau de virulência das cepas, na literatura há registros desde infecções assintomáticas até quadros graves de anemia e distúrbios nervosos seguidos de morte (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998; SOARES et al. 1999; VASHIST et al., 2008, 2009). A patogenicidade de *P. juxtannucleare* está relacionada com a capacidade de produzir formas exoeritrocíticas teciduais ou livres (PARAENSE, 1950; KRETTLI, 1971; MASSARD, 1982).

A maior importância deste patógeno está relacionada aos sistemas de criações orgânicas ou rústicas, um mercado de subsistência antigo, e há alguns anos um mercado comercial ascendente em virtude da busca por melhores condições da saúde humana, animal e sustentabilidade ecológica. As aves criadas livre de remédios e probióticos, em espaços abertos, tornam-se mais vulneráveis às parasitoses pelo iminente contato com agentes vetores

O objetivo deste trabalho foi buscar e isolar *P. juxtannucleare* de aves do município de Seropédica, RJ, realizar análises morfológica, morfométrica e molecular do isolado encontrado, bem como avaliar sua infectividade e virulência em aves de importância comercial. O isolado estudado serviu como matéria prima para pesquisas mais aprofundadas a respeito da malária aviária, isoladamente e associada à borreliose aviária, tais estudos envolveram aspectos bioquímicos séricos e histopatológicos das aves infectadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Busca por aves infectadas por *Plasmodium juxtannucleare* e isolamento de ave doadora.

Entre os anos 2007 e 2008, cerca de vinte propriedades do município de Seropédica, RJ (22° 48' S; 43° 41' W), com criações avícolas foram visitadas para a coleta de amostras sanguíneas das aves. Foram amostradas 120 galinhas, 32 patos, 15 marrecos, 35 gansos e 32 perus. Dentre as galinhas, 18 eram da raça ornamental Sedosa do Japão¹ (Figura 1), adquiridas de um criador de aves do município de Seropédica, RJ e levadas para a Estação para Pesquisas Parasitológicas W.O. NEITZ, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



Figura 1. *Gallus gallus* da raça ornamental Sedosa do Japão.

Foram realizados esfregaços sanguíneos de todas as aves, por perfuração de capilares finos da face posterior das asas, patas ou carúnculas. Os esfregaços foram fixados em metanol absoluto e corados em Giemsa. Para avaliação da prevalência e da parasitemia, foram avaliados 100 campos por lâmina, uma lâmina de cada animal.

A prevalência foi calculada segundo MARGOLIS *et al.*, (1982):

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{nº de hospedeiros infectados} \times 100}{\text{nº de hospedeiros examinados}}$$

A parasitemia de cada ave foi calculada conforme proposto por SOUZA (1998):

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{nº de eritrócitos parasitados} \times 100}{10000} \therefore \frac{\text{nº de eritrócitos parasitados}}{100}$$

Dentre as aves amostradas, foram escolhidas as três com maiores parasitemias para serem imunossuprimidas pela administração do acetato de metilprednisolona, via intramuscular, dose de 26 mg/kg de acetato de metilprednisolona (SOUZA, 1998, AMARAL, 2004, VASHIST, 2008). Dentre

¹ As aves da raça Sedosa do Japão são originárias de várias partes da Ásia, não só do Japão. Tem como principais características as penas plumosas e macias semelhantes a pêlos. A cauda pode ter formato de cacho ou cascata. A carne é escura, azulada. Possuem entre seis e sete dedos. São de pequeno porte, as aves adultas não chegam a pesar um quilograma. Os machos possuem canto alto e estridente e as fêmeas são boas chocadeiras. Quase sempre são utilizadas como aves ornamentais, e possuem preço, em geral, superior aos das aves de postura e corte. São exigentes quanto à alimentação (texto adaptado retirado do site www.flam.sites.uol.com.br/gsjapao).

as aves imunossuprimidas a que teve parasitemia mais elevada foi escolhida como ave doadora de *P. juxtannucleare* para a realização deste estudo.

2.2. Caracterização morfológica, morfométrica e molecular do isolado de *Plasmodium juxtannucleare* estudado

Foram realizadas análises morfológicas descritivas e morfométricas, utilizando-se os esfregaços sanguíneos que apresentaram maior grau de parasitemia das aves avaliadas (G1- galinha, G2- galinha, G3- galo). Foram mensurados o diâmetro maior (dM) e diâmetro menor (dm), ambos utilizados para o cálculo do índice morfométrico ($IM=dm/DM$) (ELISEI et al. 2001). As formas evolutivas foram observadas em microscópio de luz Olympus BX 51, medidas com auxílio do programa Image Pro-plus 5.0 e fotografadas com câmera Sony Cyber shot.

Foram utilizadas técnicas moleculares para auxiliar na identificação taxonômica dos parasitos encontrados, já que a associação de critérios morfológicos e moleculares pode fornecer subsídios para a correta identificação destes. Para as análises moleculares foram coletadas amostras de sangue das três aves com maiores valores de parasitemia, por meio de venopunção basilica (veia alar), usando-se anticoagulante EDTA (ácido etileno-diaminotetraacético de sódio), na proporção de 50µL para 2,0 a 3,0ml de sangue. Todas as amostras foram armazenadas em microtubos com 1,5mL de capacidade e mantidas em “freezer” a -20°C no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. NEITZ do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Para a extração do DNA genômico, as amostras de sangue foram descongeladas e 350µL de sangue de cada amostra foram transferidos para um tubo de microcentrífuga de 2mL e incubados com 50µL de Proteinase K[®] (20mg/mL) a 65°C em banho-maria por 15 minutos. Em seguida, foram acrescentados 500µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% e homogeneizado por inversão para deixar incubar novamente a 65°C por 6 minutos; após, 800µL de clorofórmio foram adicionados e os tubos foram homogeneizados vigorosamente em *vortex*. Quatrocentos µL Solução de precipitação protéica (11% de ácido acético e 5M de acetato de potássio) foi adicionada e os tubos foram homogeneizados em *vortex* novamente. Após esta etapa, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos e, a fase sobrenadante pipetada para outro tubo de microcentrífuga. Etanol absoluto gelado foi adicionado (1mL) e homogeneizou-se por inversão, esperando entre 30 e 60 segundos para a precipitação do DNA. Nova centrifugação foi realizada a 13.000rpm por 5 minutos, desprezando o sobrenadante, adicionado 1mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente e centrifugado em 13.000 rpm por 1 minuto. Os resíduos de etanol foram removidos com o auxílio de uma pipeta e os tubos foram invertidos para secagem em estufa à 37° C. Após a secagem, o *pellet* de DNA foi ressuscitado em 100µL de água ultrapura, para uma última incubação a 65°C por 5 minutos. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro Life Science Analyser (Boeco[®]), sob absorvância de 280nm, para a obtenção da concentração e grau de pureza do DNA extraído. A leitura a 260nm de absorvância (A_{260nm}) medida sob comprimento de onda de luz U.V. permite o cálculo da concentração dos ácidos nucleicos na amostra. Uma densidade óptica (DO) de 1 corresponde aproximadamente a 50µg.mL⁻¹ para DNA fita dupla. A relação entre A_{260nm} e A_{280nm} (DO_{260}/DO_{280}) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. As amostras de DNA foram diluídas em água do tipo Mili-Q na razão de (1:100). A concentração foi determinada pela mensuração em 260nm contra um branco e depois calculada via um fator ($A_{260nm} \times QF/\text{fator de diluição} = \mu\text{g/mL}$, onde $QF=50$ para DNA fita dupla). Com base nas concentrações obtidas das quantificações, foram preparadas alíquotas de 20µL diluídas com água ultrapura estéril, em uma concentração final estimada de aproximadamente 100ng/µL, para utilização na PCR. Para confirmar a espécie de *Plasmodium* detectada, as reações de PCR foram preparadas utilizando o tampão de PCR na concentração 1X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl - pH 8,5) (Ludwig-Biotec[®]), 3,0mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 0,25mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTP) (Ludwig-Biotec[®]), 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador para a

amplificação da espécie *Plasmodium juxtannucleare* #1202 (5'-GACCTATCAGCTTTGGATAGGGTATTG-3') e # 1518 (5'- ATCTTTCAAATCGGTAGGAGC-3') (Invitrogen®) (KISSINGER et al., 1998; KISSINGER et al., 2002; ELISEI, 2005) 0,3U de Taq DNA polimerase (Ludwig-Biotec®), 1,0µL da amostra de DNA diluída (100ng), em um volume final de 25µL completado com água ultrapura estéril. As misturas (mix da PCR) foram preparadas em câmara de fluxo laminar vertical (Trox® technik), a fim de evitar riscos de contaminação. Foi realizado um teste gradiente de temperatura para definir a melhor temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. As reações foram realizadas em aparelho termociclador Gradiente (Axygen®) com o seguinte programa de amplificação: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 2 minutos, e um passo extensão final a 72°C por 7 minutos. As extrações foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 0,7% (Invitrogen®). Foram aplicados 1µl de cada DNA total, 7µl de água ultrapura estéril e 2µl de tampão da amostra do tipo III (6X) (SAMBROOK et al., 1989) por canaleta do gel. Todos os produtos amplificados gerados nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen®), sendo aplicados 5µl ou 8µl do produto da amplificação junto com 1µl ou 2µl de tampão da amostra do tipo III (6X), respectivamente, por canaleta do gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal, por aproximadamente uma hora a 90 volts em fonte de alimentação de energia 'Power Pac Universal' para eletroforese e sistema de transferência (Biorad®), com tampão tris – EDTA – acetato, pH 8,0 (TAE - 1X) como fluido condutor de corrida. Na primeira canaleta de cada gel foi adicionado um padrão de massa molecular 1Kb Ladder plus de 100 a 12.000pb (Invitrogen®) ou Ladder 1Kb de 250 a 10.000pb (Ludwig Biotec®). Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 5µg/µL (Ludwig-Biotec®) por 10 minutos, colocados em água destilada por mais 10 minutos e por fim, visualizados e fotografados sob luz ultravioleta (U.V.) em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia®).

2.3. Infectividade e parasitemia de *Plasmodium juxtannucleare* isolado de *Gallus gallus* da raça Sedosa do Japão em aves de importância comercial

Para se avaliar a infectividade e parasitemia da amostra de *P. juxtannucleare* proveniente de um galo da raça Sedosa do Japão, foram subinoculados 5 frangos com cerca de 15 dias de idade, da raça Sedosa do Japão incubados em chocadeira, 5 codornas com cerca de 20 dias de idade e 5 patos adultos. As aves foram submetidas à inoculação experimental por via intraperitoneal com 0,5mL de sangue infectado, heparinizado, obtido da ave doadora (KRETTLI, 1971; SOUZA, 1998, VASHIST et al., 2008, 2009). A cada três dias foram feitos esfregaços sanguíneos das aves por um período de 30 dias. Os esfregaços foram examinados em microscópio fotônico em objetiva de imersão, 100 campos por lâmina de cada ave. Foi observado o número total e diferencial de formas evolutivas de *P. juxtannucleare* (trofozoítos, esquizontes e gametócitos) nos esfregaços de sangue, e calculada a parasitemia. Foram observados, ainda, o período pré-patente, os picos e pico máximo de parasitemia.

2.4. Sintomatologia associada às infecções causadas pelo isolado de *Plasmodium juxtannucleare* estudado

As aves foram observadas quanto à presença de sinais clínicos decorrentes das infecções como prostração, palidez, paralisia, incoordenação motora, flacidez muscular, falta de propriocepção, presença de higromas, penas eriçadas e aparência das fezes (presença de sangue, coloração, consistência e mancha d'água).

3. RESULTADOS

3.1. Encontro de *Plasmodium juxtannucleare* nas aves

As prevalências e parasitemias médias de *P. juxtannucleare* nos grupos de aves amostradas constam na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalência e parasitemia média de *Plasmodium juxtannucleare* em galinhas, patos, marrecos, gansos e perus de criações do município de Seropédica, RJ.

Aves	Número de aves	Prevalência	Parasitemia Média
Galinhhas	120	56%	0,12%
Patos	32	28%	0,08%
Marrecos	15	32%	0,02%
Gansos	35	40%	0,03%
Perus	32	50%	0,1%

Dentre as galinhhas, 18 eram da raça Sedosa do Japão e as outras 102 eram caipiras, sem raça definida. Houve diferença significativa entre a prevalência e a parasitemia média destes dois grupos de aves, conforme consta na Tabela 2.

Tabela 2. Prevalência e Parasitemia média de *Plasmodium juxtannucleare* em galinhhas caipiras e da raça Sedosa do Japão do município de Seropédica, MG.

Aves	Número de aves	Prevalência (%)	Parasitemia Média (%)
Galinhhas caipiras	102	49 a	0,05 a
Galinhhas Sedosas do Japão	18	100 b	0,19 b

Para a escolha da ave doadora de *P. juxtannucleare* para as inoculações experimentais seguintes, foram imunossuprimidas as três aves que apresentaram maiores valores de parasitemia, sendo um galo e duas galinhhas da raça Sedosa do Japão. Os valores de parasitemia antes e após a imunossupressão das aves constam na Tabela 3. Por exibir a maior parasitemia pós-imunossupressão G3, o galo, foi escolhido como doador da amostra sanguínea infectada.

Tabela 3. Valores da parasitemia de *Gallus gallus* da raça Sedosa do Japão antes e após imunossupressão com acetato de metilprednisolona.

Aves	Parasitemia anterior à imunossupressão	Parasitemia posterior à imunossupressão
G1	0,34%	4%
G2	0,32%	4%
G3	0,35%	7%

3.2. Caracterização morfológica, morfométrica e molecular do isolado de *Plasmodium juxtannucleare* estudado

Foram encontrados nos esfregaços sanguíneos das aves trofozoítos e esquizontes predominantemente (Figura 2) e poucos gametócitos (Figura 3).

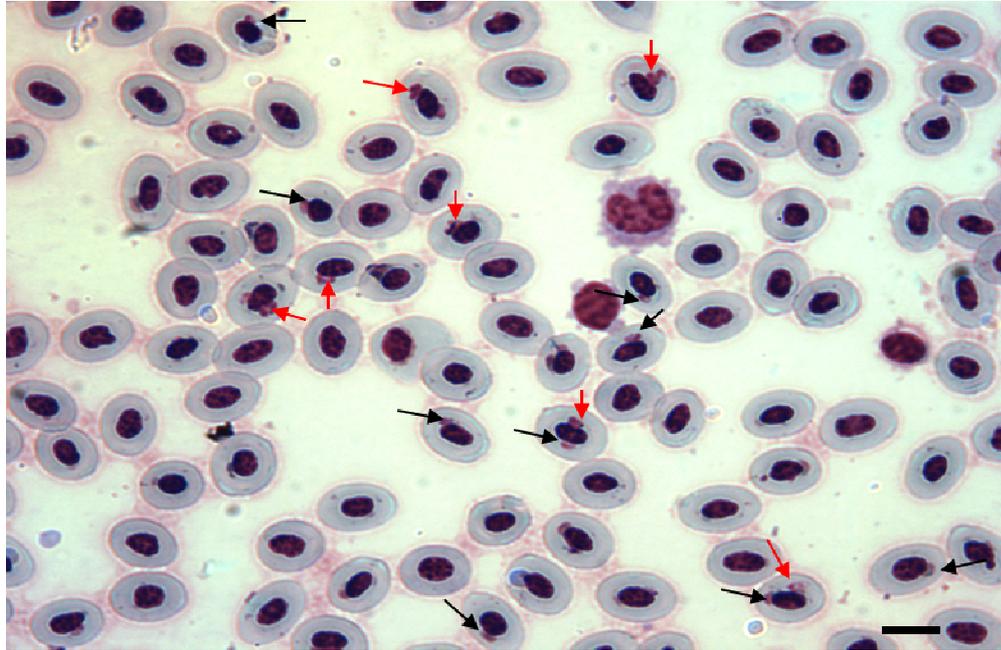


Figura 2. Trofozoítos (setas pretas) e esquizontes (setas vermelhas) de *Plasmodium juxtannucleare* encontrados em eritrócitos de *Gallus gallus* (barra = 10 μ m)

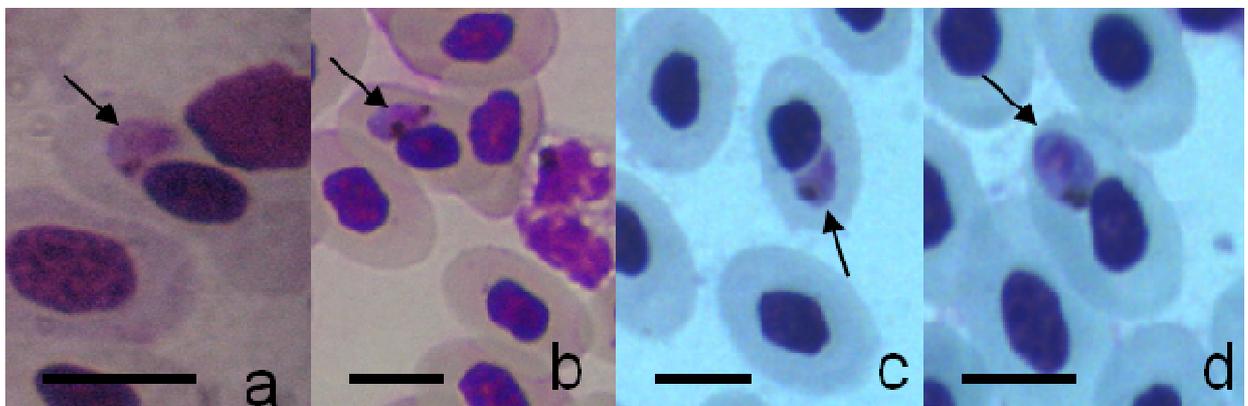


Figura 3. Gametócitos (setas pretas) de *Plasmodium juxtannucleare* encontrados em eritrócitos de *Gallus gallus* (barra = 10 μ m). (a) Gametócito de formato elíptico, (b) Gametócito com formato amebóide, (c) Gametócito com formato elíptico e (d) Gametócito com formato ovóide.

As caracterizações morfológicas e morfométricas das formas evolutivas de *P. juxtannucleare* no sangue das aves seguem na Tabela 4.

Tabela 4. Morfologia e morfometria de *Plasmodium juxtannucleare* em *Gallus gallus* da raça Sedosa do Japão. dM= diâmetro maior, dm= diâmetro menor, IM= índice morfométrico (dm/dM).

Formas evolutivas	Morfologia	Morfometria (médias)		
		dM	dm	IM
Trofozoítos	Redondos e ovóides	1,902 µm	1,331 µm	0,70 µm
Esquizontes	Arredondados, ovóides, amebóides	2,933 µm	1,525 µm	0,52 µm
Macrogametócitos	Alongados, ovóides, arredondados, elípticos e amebóides	3,904 µm	2,498 µm	0,64 µm
Microgametócitos	Alongados, ovóides, arredondados, elípticos e amebóides	3,986 µm	2,431 µm	0,61 µm

Os resultados das quantificações do DNA total de amostras sanguíneas da ave controle negativa e das 3 aves da raça Sedosa do Japão com maiores valores de parasitemia seguem na Tabela 5.

Tabela 5. Quantificações do DNA total das amostras sanguíneas de *Gallus gallus* da raça Sedosa do Japão infectados (1,2,3).

Amostra	Concentração (µg/µl)	Absorbâncias		A260/A280	Fator de diluição	Constante
		A260	A280			
G1	1017	0,188	0,064	2,93	100	50
G2	1291	0,260	0,133	1,95	100	50
G3	877	0,178	0,093	1,91	100	50

Na PCR das amostras avaliadas, a amostra da ave G3, amplificou banda entre 1.500 e 2.000pb (Marcador Ludwig), sendo um produto de aproximadamente 1.843pb, o que leva a crer que trata-se do material nuclear de *P. juxtannucleare*. As demais amostras foram negativas (Figura 4).

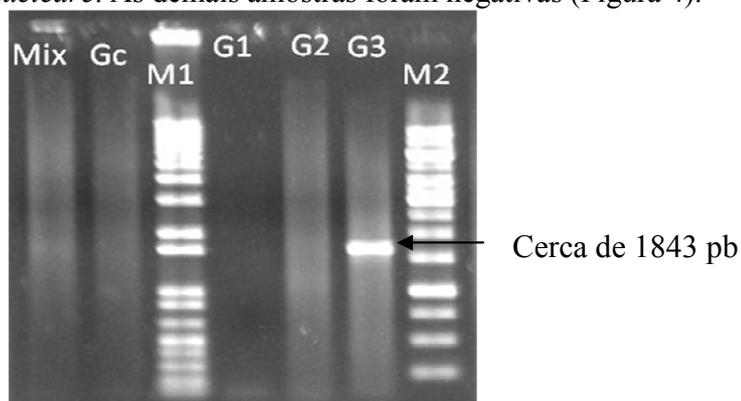


Figura 4. Perfil de bandas da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores do gene 18S (região *Ssu-rDNA*, sub-unidade menor do ribossomo nuclear) de *Plasmodium juxtannucleare*. Mix - mix da reação

sem DNA, Gc – DNA da Galinha controle negativo, M1 – Marcador de massa molecular da marca Invitrogen® 1Kb plus, G1 – DNA da Galinha 1, G2 – DNA da Galinha 2, G3 – DNA da Galinha 3 e M2 - Marcador de massa molecular da marca Ludwig® 1 Kb.

3.3. Infectividade e parasitemia do isolado de *P. juxtannucleare* estudado em aves de importância comercial

As aves dos três grupos inoculados foram infectadas por *P. juxtannucleare*. Como mostra a Figura 5, o número médio de formas evolutivas de *P. juxtannucleare* encontrado nos grupos experimentais manteve-se baixo nos grupos das codornas e patos, permanecendo crônica ao longo de todo o experimento, já nos grupos das galinhas Sedosas do Japão a parasitemia começou a se elevar a partir do 21º dia pós inoculação, tornando-se aguda. Ao fim do experimento o número médio de formas evolutivas de *P. juxtannucleare* nas galinhas Sedosas do Japão permanecia elevado, mas em decréscimo. Do total de formas evolutivas de *P. juxtannucleare* encontrado nos esfregaços sanguíneos das aves examinadas, 94% ocorreram no sangue das galinhas Sedosas do Japão (Figura 6), o que mostra a grande disparidade entre o grupo das aves Sedosa do Japão e os demais grupos de aves estudadas. Em relação ao número de formas evolutivas encontradas em cada grupo experimental, a análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre o grupo de patos e codorna ($p=0,1682$). Entretanto houve diferença significativa entre o grupo das galinhas Sedosas do Japão e o grupo das codornas ($p<0,05$) e entre o grupo das galinhas Sedosas do Japão e o grupo dos patos ($p<0,05$).

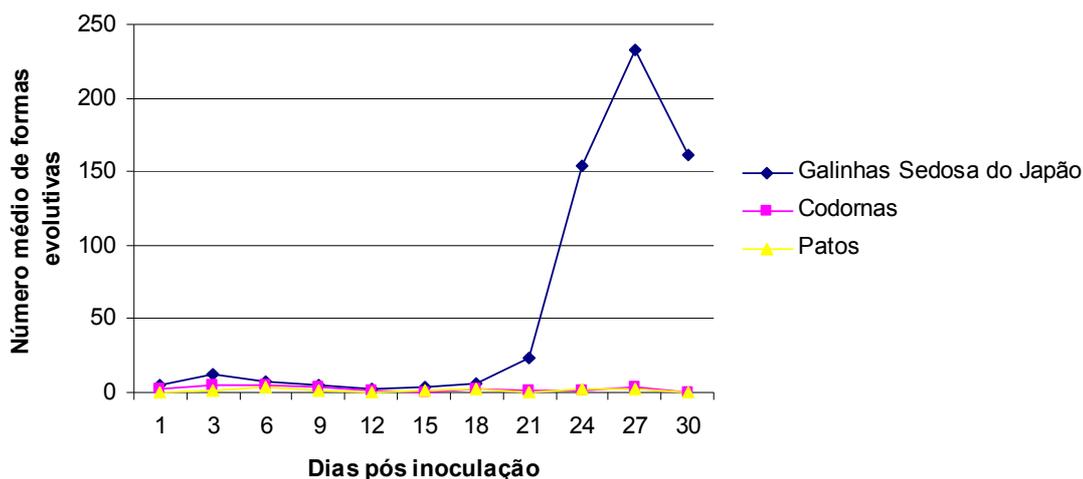


Figura 5. Número médio de formas evolutivas de *Plasmodium juxtannucleare* encontrado em galinhas da raça Sedosa do Japão, codornas e patos ao longo de 30 dias pós-inoculação.

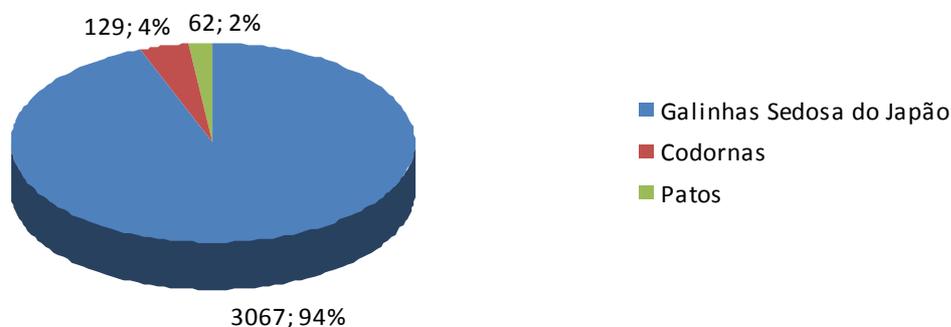


Figura 6. Número total e percentual de formas evolutivas de *Plasmodium juxtannucleare* encontrado em galinhas da raça Sedosa do Japão, codornas e patos ao longo de 30 dias pós-inoculação.

Em todos os grupos experimentais o período de pré-patência foi inferior a três dias. O pico máximo de parasitemia no grupo das galinhas Sedosa do Japão ocorreu no 27º dia pós-inoculação. Nos grupos das codornas e patos a parasitemia se manteve demasiadamente baixa para ressaltar um pico de parasitemia.

3.4. Sintomatologia associada às infecções causadas pelo isolado de *P. juxtannucleare* estudado

Foi verificada diarreia acentuada e palidez em alguns indivíduos do grupo das galinhas Sedosa do Japão (Figuras 7 a, b). É importante ressaltar que os dias de diarreia e palidez mais acentuada coincidiram com os dias de maior índice de parasitemia.



Figuras 7. (a) e (b) Fezes diarreicas em *Gallus gallus* da raça Sedosa do Japão infectado por *Plasmodium juxtannucleare*.

4. DISCUSSÃO

As prevalências e parasitemias de *P. juxtannucleare* relatadas para os grupos de aves deste estudo variam quando comparadas aos dados de estudos realizados em outras regiões do Brasil (SERRA FREIRE & MASSARD, 1979; MOTA, 1999; VASHIST, 2003), SANTOS-PREZOTO et al. (2004) por exemplo, encontraram prevalência de 100% em *G. gallus* do município de Santa Bárbara do Tugúrio, MG. Embora os valores de prevalência e parasitemia variem entre as regiões do país, este hemoparasito é muito frequente, e neste aspecto os dados deste estudo corroboram esta informação constante na literatura associada. A maior ou menor prevalência de plasmódios aviários pode estar relacionada à presença de vetores, de criatórios (coleções d'água) e condições climáticas favoráveis à disseminação destes agentes. Já o grau de parasitemia pode estar associado ao grau de virulência da cepa e ao estado imunológico da ave hospedeira.

A morfologia, morfometria e análise molecular dos parasitos encontrados, isolados de *G. gallus* da raça Sedosa do Japão, definem a espécie *P. juxtannucleare*. Embora as formas evolutivas (trofozoítos, esquizontes e gametócitos) encontradas tenham sido um pouco maior do que aquelas mencionadas na literatura, não diferiram significativamente destas, além disto, a morfologia foi semelhante ao relatado por demais autores (GARNHAM, 1966; ELISEI, 2001, AMARAL, 2005). Na PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores do gene 18 S de *P. juxtannucleare*, o produto amplificado em torno de 1843 pb na amostra sanguínea da ave G3 está de acordo com a espécie indicada, para estudo mais detalhado que visasse a caracterização do isolado seria necessário a purificação e sequenciamento, mas para fins diagnósticos a associação dos aspectos morfológicos, morfométricos e PCR foram suficientes. Ressalta-se que no isolado estudado a forma mais frequentemente encontrada foram os esquizontes e não os trofozoítos como amplamente citado na literatura para este patógeno

(SANTOS-PREZOTO, 2004; AMARAL, 2005, VASHIST, 2009,2010), o que parece ser uma característica peculiar deste isolado.

Estes resultados definem que o grupo das galinhas Sedosas do Japão foi mais suscetível a infecção por *P. juxtannucleare*, o que pode estar relacionado à alta especificidade deste parasito por *G. gallus* (VERSIANI & GOMES, 1941). Segundo KRETTLI (1971) os índices de parasitemia, obtidos a partir da inoculação de formas sanguíneas, mesmo na fase aguda são muito baixos, o que também foi observado neste trabalho em relação às codornas e aos patos. Entretanto, o observado no grupo das galinhas Sedosas do Japão corrobora o observado por PARAENSE (1949) e MASSARD & MASSARD (1981) que notaram alta parasitemia no primeiro mês após inoculação experimental e após este período registraram seu decréscimo, iniciando-se um período de cronicidade. Em todos os grupos experimentais o período de pré-patência foi inferior a três dias. Há na literatura períodos de pré-patência entre 4 e 20 dias (VERSIANI & GOMES, 1943; KRETTLI, 1971; MASSARD & MASSARD, 1981; ELISEI, 2001,2005). Segundo MASSARD (1976) o período de pré-patência pode estar relacionado à virulência de cada cepa e à imunidade ou resistência dos animais inoculados. Foi verificada diarreia acentuada e palidez em alguns indivíduos do grupo das galinhas Sedosa do Japão. Ressaltamos que os dias de diarreia e palidez mais acentuada coincidiram com os dias de maior índice de parasitemia. Estes sinais já foram observados por outros autores (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998; VASHIST, 2006). Nos demais grupos as aves não demonstraram sinais clínicos da infecção provavelmente pela baixa parasitemia destes animais.

5. CONCLUSÕES

- *Plasmodium juxtannucleare* é frequente em criações rústicas de galinhas, gansos, patos, marrecos e perus do município de Seropédica, RJ.
- Nas condições estudadas o parasitismo por *P. juxtannucleare* em codornas e patos experimentalmente infectados com amostras procedentes de galinha da raça Sedosa do Japão criadas no município de Seropédica, RJ não provoca infecção aguda. Já nas galinhas Sedosas do Japão ocasiona infecção aguda.
- Em relação ao número médio de parasitos, período de pré-patência e pico máximo de parasitemia, a infecção por *P. juxtannucleare* em galinhas Sedosas do Japão difere muito do que há registrado na literatura para este parasitismo em galinhas de outras raças. As galinhas Sedosa do Japão suportam uma maior carga parasitária e retardam o pico máximo de parasitemia.
- As galinhas Sedosas do Japão são mais suscetíveis a infecção por *P. juxtannucleare* quando comparadas com as codornas e patos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIBA, K. Studies on avian malaria. On the species of *Plasmodium* from chicken in Japan (*P. japonicum* Ishiguro, 1957 a synonym for *P. juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941). *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 21, p.18, 1959.

AMARAL, K. B. *Atividade anti-malárica da cloroquina e dos flavonóides quercetina e rutina em indivíduos jovens de Gallus gallus Linnaeus, 1758 infectados experimentalmente com Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae)*. 2005. 67 f. Dissertação (mestrado em Biologia e Comportamento Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 2005.

BELTRÁN, E. Hallazgo de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Furtado en gallinas de Chiapas. *Revista do Instituto de Salud y Enfermagen Tropical do Mexico*, v.2, p. 353-354, 1941.

BELTRÁN, E. Características de uma cepa Mexicana (14B) de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Revista do Instituto de Salud y Enfermagen Tropical do Mexico*, v. 4, p. 265-272, 1943.

BENNET, F.G.; WARREN, M.; CHEONG, W.H. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. II. The sporogonic stages in *Culex (culex) sitiens* Wiedmann. *Journal of Parasitology*, v. 52, p. 647-652. 1966.

CASSAMAGNAGHI, A. *Malaria en las aves del Uruguay*. 93f. 1947. Montivideo, Facultad Veterinaria. 1947.

DHANAPALA, S.B.. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. *Revista de Malariologia*, v. 41, p.39-46, 1962.

DISSANAIKE, A.S. On some blood parasites of wild animals in Ceylon. *Ceylon Veterinary*, 14, p. 29-37, 1963.

ELISEI, C.O. *Criopreservação e caracterizações morfológica, morfométrica e ultra-estrutural de Plasmodium (Novyella) juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae)*. 2001. 64f. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2001.

ELISEI, C.; SOUZA, P. C. A. ; MASSARD, C. L.; OLIVEIRA, C. S. Caracterización morfológica y morfométrica de *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Boletín chileno de parasitología*, Chile, v. 25, n. 1-2, p. 12-18, 2001.

ELISEI, C. O. 2005 *Morfologia, Morfometria, Biologia Molecular, Filogenia de Plasmodium juxtannucleare e uma nova proposta filogenética dos Gêneros Plasmodium, Haemoproteus e Hepatocystis*. 2005. 105f. (doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

ELISEI, C. ; FERNANDES, K. R. ; M. ; MADUREIRA, R. C. ; SCOFIEL, A. ; YOTOKO, K. ; SOARES, C. O. ; ARAUJO, F.R. ; MASSARD, C.M. Morphology and morphometry of

three *Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae) isolates. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, p. 139-144, 2007.

GRIM, K.C.; van der MERWE, E.; SULLIVAN, M. B.A.; PARSONS, N.; Mc CUTCHAN, T.F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguin (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.34, n. 3, p. 250-253, 2003.

ISHIGURO, H. *Plasmodium japonicum*, a new specie of malaria parasite pathogenic for the domestic fowl. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Yamaguti University*, v. 8, p. 723-732, 1957.

KRETLI, A.U. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.14, p. 235-245, 1972.

KISSINGER, J.C.; COLLINS, W.E.; LI, J.; McCUTCHAN, T.F. *Plasmodium inui* is not closely related to other quartan *Plasmodium* species. *Journal of Parasitology*, v.84, n. 4, p. 278-282, 1998.

KISSINGER, J.C.; SOUZA, P.C.A.; SOARES, C.O.; PAUL, R.; WAHL, A.M.; RETHORE, D.; McCUTCHAN, T.F.; KRETLI, A.U. Molecular phylogenetic analysis of the avian malarial parasite *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare*. *Journal of Parasitology*, v.88, n. 4, p. 769-773.

LOURENÇO DE OLIVEIRA, R.; CASTRO, F.A. *Culex saltanensis* Dyar, 1928 – Natural vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p. 87-94, 1991.

MANWELL, R.D. *Plasmodium japonicum*, *Plasmodium juxtannucleare* and *Plasmodium nucleophilum* in the far east. *Journal of Protozoology*, v.13, p. 8-11. 1966.

MARGOLIS, L.; ESCH, G.W.; HOLMES, J.C. KURIS, A.M. & SCHAD, G. A. 1982. The use of ecological terms in parasitology (reports of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists) *Journal of Parasitology* v. 68, n. 1, p. 131-133. 1982.

MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 3-23, 1981.

MASSARD, C.L. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidida: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* da raça Leghorn Branca. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 5, p. 141-146, 1982.

MOHAN, R.N.; MANWELL, R.D. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Francolinus sp*). *Journal of Parasitology*, v. 55, p. 543, 1966.

PARAENSE, W.L. Um inquérito sobre o ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (estado de Minas Gerais). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 47, n. 3-4, p. 361-365, 1949.

PARAENSE, W.L. Differences among some strains of *Plasmodium juxtannucleare* concerning the production of exorythrocytic forms in a single species of host. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA, p.185, 1950, Rio de Janeiro. *Anais...*, Rio de Janeiro: CIM,1950.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Appendix B: Preparation of Reagents and Buffers Used in Molecular Cloning. In: **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Book 3, p. B.24.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Rapid isolation of mammalian DNA. In: **Molecular cloning - a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 628-629.

SANTOS-PREZOTO, H.H.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. *Parasitologia Latino americana*, v. 59, p. 14-20, 2004.

SERRA-FREIRE, N.M.; MASSARD, C.L. Ocorrência e Incidência de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em Belém- Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, Belém. **Anais...** Belém. 1976.

SERRA-FREIRE, N.M.; MASSARD, C.L. *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasito de *Gallus gallus* L. e *Crysolophus spp* na região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, v. 20, p.45-48, 1979.

SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; SOUZA, P.C.A. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Parasitologia al dia*, v. 23, p. 87-90, 1999.

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

VASHIST, U.; SILVEIRA, P.; D'AGOSTO, M. *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* no município de Juiz de Fora, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.1, p. 244. 2003.

VASHIST, U. *Atividade malaricida da quercetina em aves Gallus gallus Linnaeus, 1758 da raça Leghorn Branca experimentalmente infectados por Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae) e imunossuprimidos*. 2006. 27f. Monografia de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 2006.

VASHIST, U. ; SILVEIRA, P. ; CABRAL, A. ; AMARAL, K. B. ; SOARES, G. L. G. ; DAGOSTO, M. . *Atividade malaricida da quercetina em Gallus gallus L. 1758*

imunossuprimidos infectados por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani & Gomes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 220-223, 2008.

VASHIST, U. ; CARVALHAES, R. ; D' AGOSTO, M. ; DA SILVA, A. D. Antimalarial Activity of the Novel Quinoline/6-Thiopurine Conjugate in *Linnaeus*, Infected Experimentally by *Plasmodium juxtannucleare* in *Gallus gallus*. *Chemical Biology & Drug Design* , v. 74, p. 434-437, 2009.

Capítulo II

Aspectos biológicos e clínicos das infecções causadas por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus*, Linnaeus, 1758

Capítulo II- Aspectos biológicos e clínicos das infecções causadas por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus*, Linnaeus 1758

RESUMO

A malária aviária causada por *P. juxtannucleare* e a borreliose aviária causada por *B. anserina* são infecções comuns em aves de importância econômica, sendo mais frequente em aves criadas livre de medicamentos, as chamadas criações orgânicas ou mesmo as criações de subsistência, ainda muito comuns no Brasil. O objetivo deste trabalho foi realizar infecções experimentais de *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em *G. gallus* e avaliar o sinergismo entre estas, através de avaliação da parasitemia, espiroquetemia e sinais clínicos. Foram adquiridas aves de linhagem pura com um dia de idade, criadas com alimentação balanceada e livre de remédios. Aos 60 dias as aves foram separadas em quatro grupos experimentais com 12 aves por grupo, G1- aves controle não infectadas; G2- aves infectadas por *P. juxtannucleare*, G3- aves infectadas por *B. anserina* e G4- aves infectadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*. As aves foram avaliadas por um período de 42 dias quanto a parasitemia por *P. juxtannucleare* (Grupos 2 e 4) e espiroquetemia por *B. anserina* (Grupos 3 e 4) através de esfregaços sanguíneos. A cada três dias as aves foram pesadas e semanalmente foram realizadas coletas de sangue para hematócritos. Diariamente as aves foram observadas quanto à presença de sinais clínicos decorrentes das infecções. As infecções experimentais foram bem sucedidas nos Grupos 2, 3 e 4. Observou-se que a parasitemia por *P. juxtannucleare* e a espiroquetemia por *B. anserina* foram mais acentuadas nas aves do Grupo 4 do que nas aves dos Grupos 2 e 3. As aves dos Grupos 3 e 4 tiveram médias de peso corporal ao longo do experimento inferior as aves dos Grupos 1 e 2, o que pode estar relacionado ao quadro de intensa diarreia e desidratação, típicos da borreliose aviária. As aves dos Grupos 2 e 4 manifestaram sintomas da malária aviária, sendo estes mais severos nas aves do Grupo 4. As aves dos Grupos 3 e 4 manifestaram sintomas típicos da borreliose aviária sendo estes mais graves nas aves do Grupo 4. Análises histopatológicas de tecido cerebral de aves dos Grupos 2 e 4 que tiveram paralisia de membros inferiores e superiores, revelaram lesões teciduais, possivelmente relacionadas aos parasitos e conseqüente quadro de paralisia. Conclui-se que a infecção causada por *P. juxtannucleare* potencializa os danos causados pela infecção por *B. anserina* e vice-versa, sendo necessárias maiores investigações a respeito dos efeitos deste sinergismo no organismo hospedeiro.

Palavras-chave: malária aviária, borreliose aviária, galinhas.

Chapter II – Biological and clinical aspects of the infections caused by *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 and *Borrelia anserina anserina* (Sakharoff, 1891) in *Gallus gallus*, Linnaeus 1758.

ABSTRACT

The avian malaria caused by *P. juxtannucleare* and avian borreliosis caused by *B. anserina* are common infections in birds of economic importance, being more frequent in birds reared drugs free, the organic creations or the subsistence creations, very common in Brazil. The aim of this study was performed experimental infections of *P. juxtannucleare* and *B. anserina* in *Gallus gallus* and evaluate the synergism between them, through the parasitemia, spirochaetemia and clinical signs. Hens with one day old were acquired and created with a balanced diet drugs free. At 60 days old the hens were separated into four groups with 12 animals each, G1-uninfected control, G2-birds infected by *P. juxtannucleare*, G3- birds infected by *B. anserina* and G4-birds infected by *P. juxtannucleare* and *B. anserina*. The birds were evaluated along 42 days for parasitemia by *P. juxtannucleare* (Groups 2 and 4) and spirochaetemia by *B. anserina* (Groups 3 and 4) through the blood smears. Every three days the birds were weighed and weekly hematocrit were performed. Birds were observed daily for the presence of clinical signs resulting from infections. The experimental infections were successful in Groups 2, 3 and 4. It was observed that parasitaemia by *P. juxtannucleare* and spirochetemia by *B. anserina* were more pronounced for birds in Group 4 than in birds of Groups 2 and 3. The birds in Groups 3 and 4 had smaller mean body weight throughout the experiment than the birds of Groups 1 and 2, which could be related to the intense diarrhea and dehydration, typical of avian borreliosis. The birds of Groups 2 and 4 showed symptoms of avian malaria, which were more severe in birds in Group 4. The birds of Groups 3 and 4 showed typical symptoms of avian borreliosis which were more serious for birds in Group 4. Histopathological analysis of brain tissue from birds of Groups 2 and 4 which showed members paralysis, revealed tissue injury, possibly related to the parasites and consequent paralysis. We conclude that the infection caused by *P. juxtannucleare* enhances the damage caused by *B. anserina* infection and vice versa, further investigations regarding the effects of this synergism in the host organism are necessary.

Keywords: avian malaria, avian borreliosis, hens.

1. INTRODUÇÃO

Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) são hemoparasitos comuns em aves, especialmente em *Gallus gallus*, Linnaeus, 1758 criados de forma rústica ou orgânica, livre de medicamentos. Existem relatos na literatura de altas taxas de morbidade e mortalidade associada à presença destes patógenos de forma isolada (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; BANDOPADHAY & VEGAD, 1984; SA'IDU et al., 1995; SOUZA, 1998; SOARES et al. 1999; LISBÔA et al., 2009; VASHIST et al., 2008, 2009). As infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*, ainda não foram avaliadas de forma conjunta, e estas são passíveis de ocorrer naturalmente em aves, tanto que a descrição de *P. juxtannucleare* ocorreu quando pesquisadores brasileiros investigavam a borreliose aviária no estado de Minas Gerais (VERSIANI & GOMES, 1941), mas até o presente momento nenhum estudo foi feito para caracterizar os efeitos sinérgicos, os aspectos biológicos, a fisiologia e a bioquímica sérica desta interação parasitária em aves domésticas. Interessante notar que, em humanos, há relatos na literatura de pessoas que foram acometidas simultaneamente por parasitos dos gêneros *Plasmodium* e *Borrelia*. Os pacientes infectados apresentaram sintomatologia grave e alterações hematológicas, atribuídas a estes hemoparasitos. A gravidade dos sintomas foi relacionada diretamente aos efeitos sinérgicos destas infecções (MIRON et al., 2004), mas são poucos os estudos relacionados sobre esta co-infecção que pode ser mais comum do que se imagina, pois muitas vezes obtém-se um diagnóstico incorreto (BERGER & DAVID, 2005). Tendo em vista a crescente demanda da população humana, inclusive em países em desenvolvimento, por produtos de origem animal “naturais”, livres de antibióticos, probióticos ou quaisquer outros medicamentos, o mercado de animais orgânicos torna-se crescente, porém frágil diante do dilema de superação das parasitoses sem o uso de medicações alopáticas. O objetivo deste estudo foi realizar infecções experimentais de *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em *G. gallus* e avaliar o sinergismo entre estas, através de avaliação da parasitemia, espiroquetemia e sinais clínicos. Objetivou-se ainda relacionar os achados da interação *Plasmodium x Borrelia* aviários com a interação *Plasmodium x Borrelia* humanos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para este experimento foram adquiridas 48 galinhas da raça Cobb com um dia de idade já previamente vacinadas contra as doenças Pox, Gumboro e Marek. As aves de excelente linhagem foram gentilmente doadas pelas Granjas Planalto, de Uberlândia, MG.

As aves foram transportadas em caixas de papelão desde o estabelecimento comercial onde foram adquiridas até o laboratório para pesquisas parasitológicas W.O. NEITZ da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil, onde foram acondicionadas em caixas de amianto (2x1m) com bordas arredondadas forradas com maravalha, cobertas com tela e iluminadas com lâmpada incandescente, durante os primeiros quinze dias de idade (Figura 1). Nestas condições não houve risco das aves se esmagarem, sentirem frio ou serem picadas por mosquitos vetores de doenças parasitárias.



Figura 1. (a) Caixa de amianto de bordas arredondadas (caixa d'água) forrada com maravalha e (b) coberta com tela para o acondicionamento das aves.

Posteriormente as aves foram colocadas em galpão (5x 5m) previamente limpo e desinfetado com vassoura de fogo (Figura 2).



Figura 2. Aves da raça Cobb com aproximadamente 20 dias de idade em galpão.

Aos 45 dias de idade as aves foram transferidas para gaiolas suspensas (150x 90cm) (Figura 3 a) para não correr o risco de disseminação das espiroquetas, via feco-oral, entre os grupos experimentais, após as inoculações. As gaiolas foram teladas, não permitindo que mosquitos e/ou outros artrópodes picassem as aves. Abaixo das gaiolas foi colocada mistura de capim seco com “cal” para que as fezes e urina ao cair não provocassem mal cheiro no ambiente (Figura 3b), a cada três dias este material era renovado. Como o experimento foi realizado em estação quente do ano, primavera, foram colocados ventiladores no galpão em que estavam as gaiolas suspensas para que as aves não tivessem hipertermia.



Figura 3. (a) Aves da raça Cobb, com aproximadamente 45 dias de idade em gaiolas suspensas, (b) disposição das gaiolas teladas no galpão e “cama” de capim seco e “cal” para recolhimento das fezes e urina.

Durante todo o experimento as aves foram alimentadas com ração Purina® linha Natural, livre de antibióticos e cocidiostáticos e água “*ad libitum*”. Aos 60 dias de idade as aves foram separadas aleatoriamente em quatro grupos com doze aves cada, sendo Grupo 1- controle; Grupo 2- infectado por *P. juxtannucleare*; Grupo 3- infectado por *B. anserina* e Grupo 4- infectado por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*. As infecções ocorreram conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Grupos experimentais de *Gallus gallus*, inóculos e vias de infecção em experimento envolvendo *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina*.

Grupo Experimental	Quantidade e origem do inóculo	Via de infecção
Grupo 1	0,5 ml de soro fisiológico comercial	Intraperitoneal
Grupo 2	0,3 ml de sangue parasitado por <i>P. juxtannucleare</i> proveniente de galo da raça Sedosa do Japão de criação rústica do município de Seropédica, RJ, com parasitemia em torno de 7%.	Intraperitoneal
Grupo 3	0,5 ml de soro infectado por cepa de <i>B. anserina</i> proveniente do município de Pedro Leopoldo e criopreservada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro	Intraperitoneal
Grupo 4	Inóculo do Grupo 2 + Inóculo do Grupo 3	Intraperitoneal

As aves tiveram a parasitemia e a espiroquetemia acompanhadas através de esfregaços sanguíneos, que foram realizados pela retirada de uma gota de sangue pela perfuração de capilares finos da asa (Figura 4).

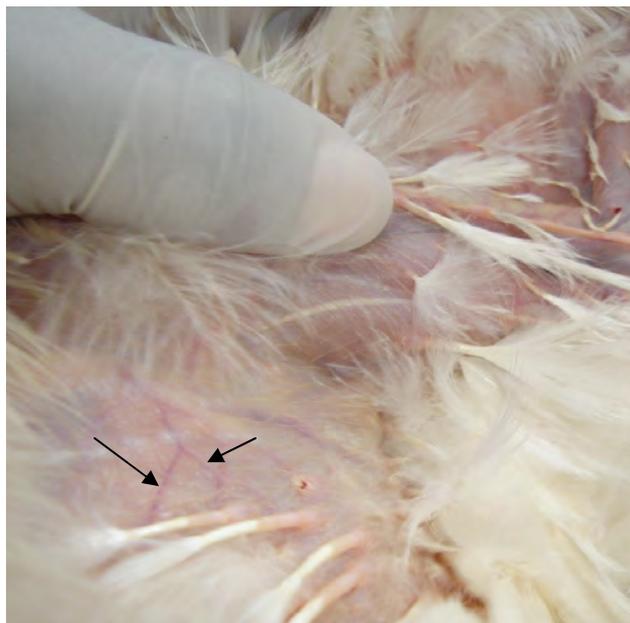


Figura 4. Capilares de asa de ave de onde se pode retirar sangue para esfregaços sanguíneos.

Durante os primeiros quinze dias pós inoculação os esfregaços foram realizados diariamente, pois segundo a literatura este é o período mais crítico para a infecção experimental causada por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903; BOERO, 1967; BIER, 1985, LISBÔA et al., 2009; VASHIST et al., 2008, 2009). Posteriormente, os esfregaços sanguíneos foram realizados a cada três dias até o 42º dia pós inoculação. Os esfregaços foram levados para o laboratório, fixados em metanol por 3 minutos, corados em Giemsa diluído em água destilada na proporção de 1:4, por 45 minutos. As lâminas com os esfregaços foram examinadas em microscópio de luz, no aumento de 1000x. Foram registrados o número total das formas evolutivas de *P. juxtannucleare* em 100 campos microscópicos, os valores de parasitemia foram expressos como número médio de parasitos encontrados nas aves. O cálculo da espiroquetemia foi realizado pela observação de 50 campos microscópicos e, quando a lâmina estava positiva foi calculado o número médio de espiroquetas por campo (SHOMMEIN & KHOGALI, 1974; LABRUNA et al., 1999, LISBÔA, 2009). Quando as espiroquetas encontravam-se aglomeradas, tornando a contagem impossível, foram anotados o número de aglomerados por campo.

A observação da curva de parasitemia e intensidade da espiroquetemia permitiram avaliar o período pré-patente, patência e picos máximos das infecções.

As aves foram diariamente observadas quanto à presença de sinais clínicos decorrentes das infecções. A cada três dias as aves foram pesadas e semanalmente foram realizadas coletas de sangue para a determinação do hematócritos de todas as aves.

3. RESULTADOS

O acondicionamento e cuidado com as aves desde o primeiro até os 60 dias de idade foram satisfatórios, pois nenhuma chegou ao óbito até então. Além disto, antes de serem realizadas as infecções experimentais todas as aves foram avaliadas quanto à presença de parasitos e todas estavam negativas. Após as infecções experimentais todas as aves do Grupo 2 infectaram-se por *P. juxtannucleare*, todas as do grupo 3 por *B. anserina* e todas as aves do grupo 4 por ambos os patógenos.

Todos os estádios eritrocíticos de *P. juxtannucleare* (trofozoítos, esquizontes e gametócitos) foram observados nos grupos 2 e 4 (Figura 5 a,b,c).

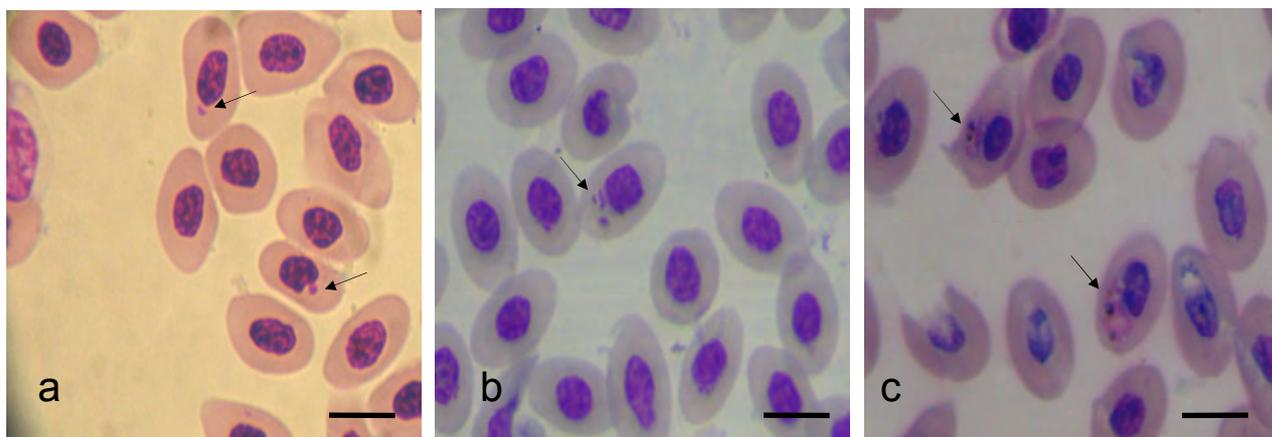


Figura 5. Forma evolutiva de *Plasmodium juxtannucleare* encontrado em sangue de *Gallus gallus* experimentalmente infectados; (a) trofozoítos, (b) esquizonte e (c) gametócitos (barra = 10 μ m).

As maiores parasitemias ao longo do experimento foram observadas no Grupo 4 e diferiram significativamente em relação aos valores de parasitemias observados no Grupo 2. O período pré-patente foi de dois dias nos Grupos 2 e 4 e o pico máximo da parasitemia ocorreu entre o sétimo e oitavo dia no Grupo 2, decrescendo em seguida já no Grupo 4 este pico ocorreu entre o quinto e sétimo dia, decrescendo em seguida (Figura 6).

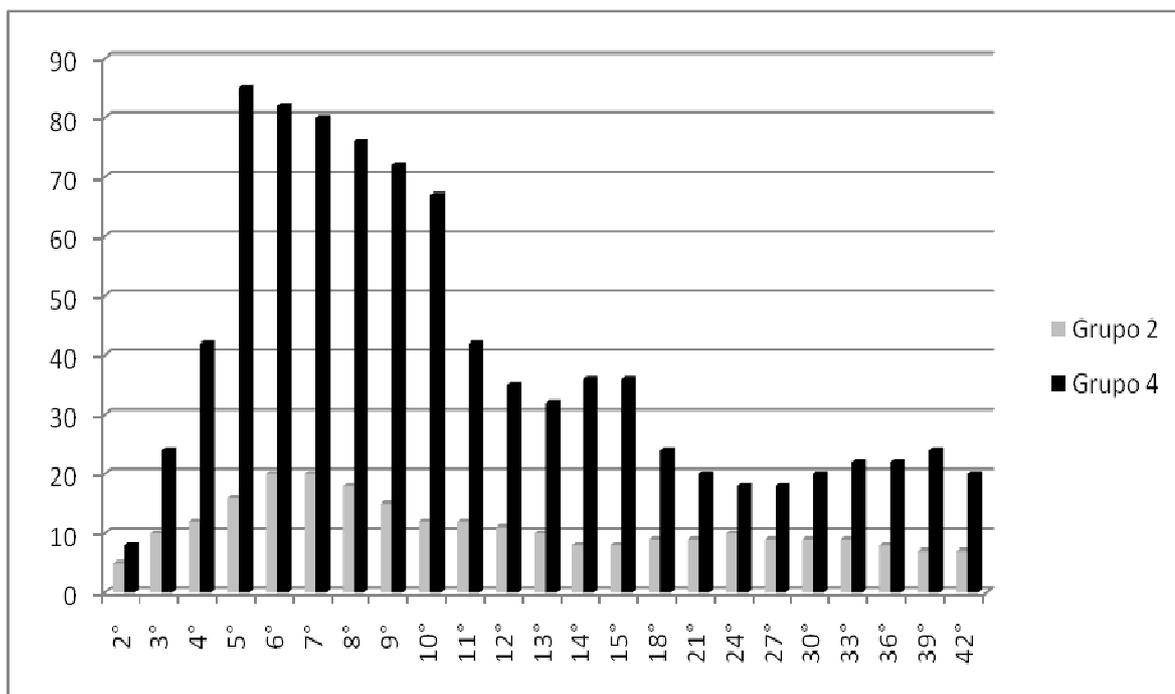


Figura 6. Número médio de *Plasmodium juxtanucleare* encontrados nas aves dos grupos 2 e 4 ao longo de 42 dias de experimento.

Nos grupos 3 e 4 foram observadas espiroquetas *B. anserina*, isoladas e aglomeradas (Figura 7 a,b). Grande quantidade de espiroquetas foram observadas nos Grupos 3 e 4, em algumas lâminas tornaram-se praticamente incontáveis, as aves do Grupo 4 exibiram espiroquetemias superiores as aves do Grupo 3. Os valores de espiroquetemia para os Grupos 3 e 4 podem ser visualizados na Tabela 1. Os parâmetros biológicos período pré-patente e período de patência foram de dois e sete dias, respectivamente para os Grupos 3 e 4. O pico de espiroquetemia ocorreu no quinto dia pós inoculação nos Grupo 3 e 4.

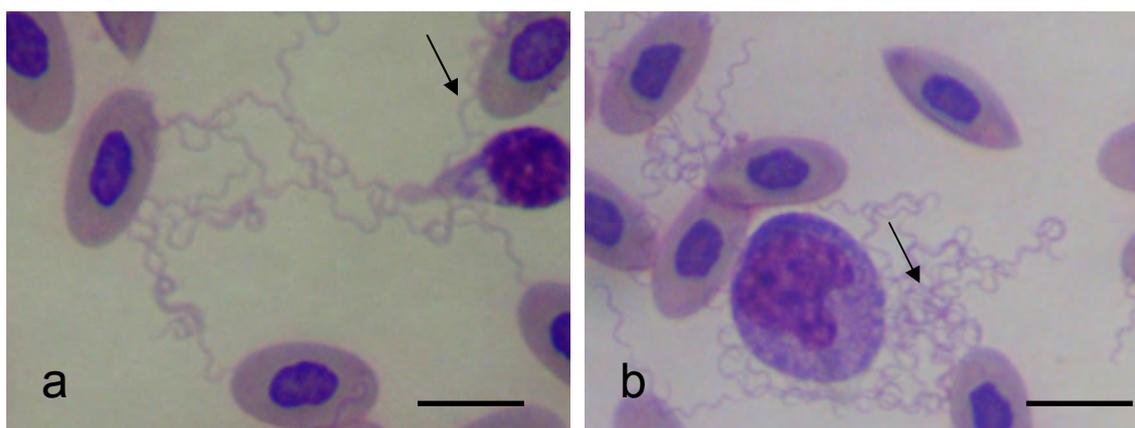


Figura 7. Espiroquetas encontradas em sangue de aves experimentalmente infectadas (a) isoladas e (b) aglomeradas (barra = 10 μ m).

Tabela 1. Número médio de espiroquetas por esfregaço sanguíneo, após a inoculação de *Borrelia anserina* em *Gallus gallus*, Grupo 3- infectado por *B. anserina* e Grupo 4- co-infectado por *P. juxtanucleare* e *B. anserina*.

Ave	Número médio de espiroquetas por campo* de esfregaço sanguíneo em dias pós-inoculação															
	Grupo 3								Grupo 4							
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°ao 15°	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°ao 15°
1	-	-	<1	17	29	14+	<1	-	-	-	2+	>50	>50++	>50	<1	-
2	-	-	2+	35+	50++	2+++	-	M	-	-	3+	>50	>50++	>50	<1	-
3	-	-	-	38+	9+	<1	-	-	-	-	5+	>50	>50+	32	<1	-
	-	-	2	16+	27+	6+	-	-	-	-	2+	>50+	18+	2+	1+	M
5	-	-	-	17	17	<1+	-	-	-	-	8+	>50++	>50	>50	1+	-
6	-	-	-	>50	>50	11+	-	M	-	-	12+	>50++	>50+	>50	<1	-
7	-	-	<1	20	23	2+	-	-	-	-	8+	>50	>50++	>50	<1	-
8	-	-	<1	22	20	<1++	-	-	-	-	7+	>50	>50+	12	<1	-
9	-	-	2	17	45	7+	-	-	-	-	30	>50	>50+	>50	+1	-
10	-	-	<1	9	2	-	-	-	-	-	22	>50	>50+	18	<1	-
11	-	-	2	40+	>50+++	12+	-	-	-	-	6+	>50	>50++	>50	+1	-
12	-	-	1	48+	>50	<1	-	-	-	-	9	>50	>50++	>50	<1	-

*: Média de 50 campos. Aumento de 1.500X.

+: pequenos aglomerados; ++: médios aglomerados; +++: grande aglomerado; - ; negativo; m- ave morreu

Os principais sintomas clínicos observados e número de óbitos decorrentes das infecções nas aves constam na Tabela 2 e podem ser visualizados nas Figuras 8 (a,b,c,d), 9 (a,b,c,d) e 10 (a,b,c,d).

Tabela 2. Sintomatologia e número de óbitos decorrentes das infecções causadas por *Plasmodium juxtancleare* e *Borrelia anserina* em *Gallus gallus* em 42 dias de experimento; Grupo 1- controle, Grupo 2- infectado por *P. juxtancleare*, Grupo 3- infectado por *B. anserina* e Grupo 4- co-infectado por *P. juxtancleare* e *B. anserina*.

Grupos experimentais	Sintomas clínicos	Número de óbitos
Grupo 1	Nenhum	0
Grupo 2	Apatia, palidez suave, falta de propriocepção, paralisia de membros.	3
Grupo 3	Prostração, sonolência, anorexia, palidez, diarreia acentuada, esverdeada e fétida, desidratação, baixo peso.	2
Grupo 4	Prostração, sonolência, coriza, anorexia, palidez, penas eriçadas, diarreia acentuada, desidratação, paralisia de membros, baixo peso.	1

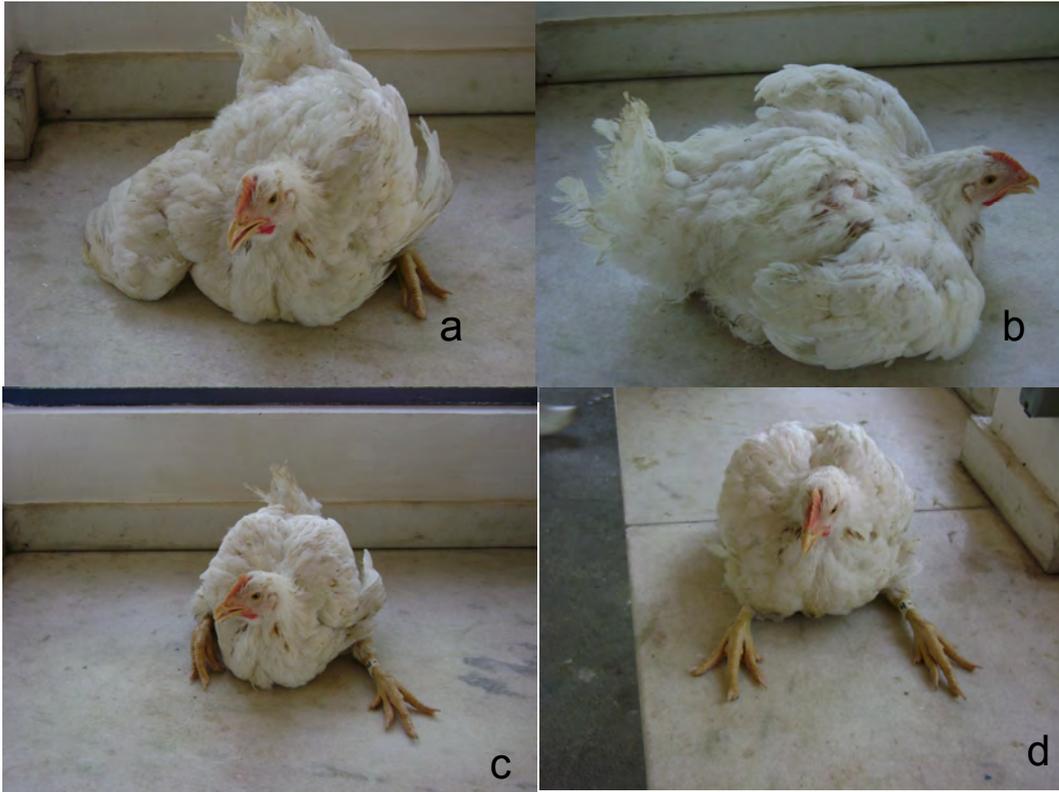


Figura 8. *Gallus gallus* do Grupo 2 infectados por *Plasmodium juxtannucleare* exibindo (a) paralisia das pernas e asa direita, (b) dificuldade em equilibrar-se, (c) paralisia da perna esquerda e (d) paralisia das pernas.

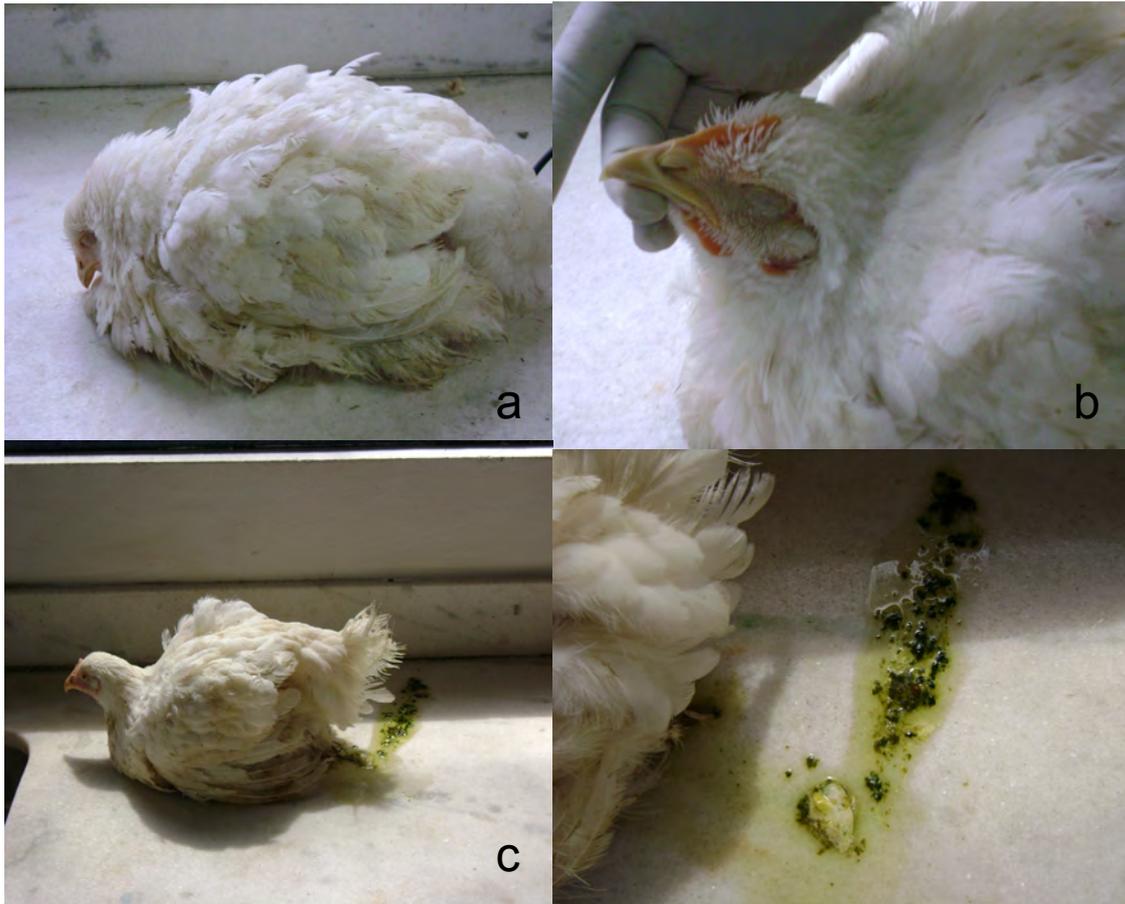


Figura 9. *Gallus gallus* do Grupo 3 infectados por *B. anserina* exibindo (a) e (b) prostração, sonolência, penas eriçadas e palidez; (c) e (d) diarréia intensa oleosa e esverdeada.

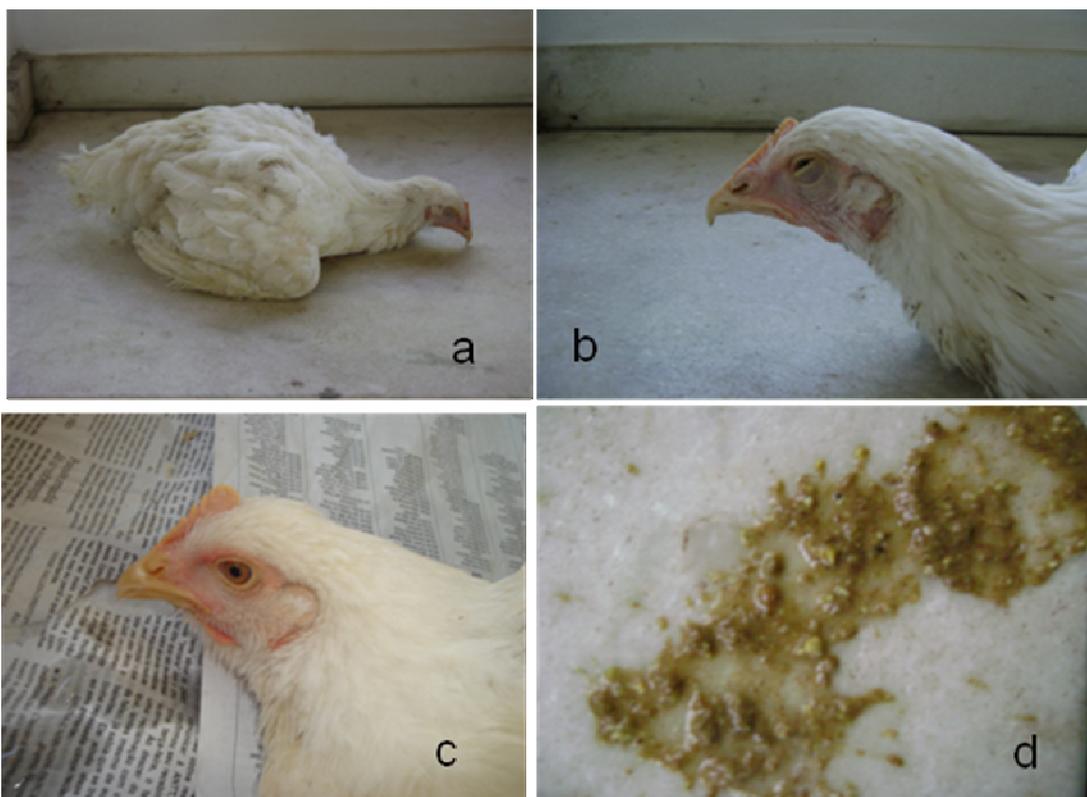


Figura 10. *Gallus gallus* do Grupo 4 infectados por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina* exibindo (a) e (b) prostração, sonolência e palidez; (c) coriza e (d) diarreia intensa, mas não oleosa.

Nos grupos infectados os sintomas foram mais intensos no final da primeira semana pós-inoculação e início da segunda semana, que coincide com os picos de espiroquetemia e parasitemia. As aves do Grupo 3 e 4 tiveram diarreia desde o 3º dia pós inoculação, já as aves do Grupo 2 não manifestaram este sintoma. Aves dos grupos 2 e 4 manifestaram paralisia de membros em maior ou menor intensidade e houve correlação desta intensidade com os valores de parasitemia, as aves com maiores parasitemias por *P. juxtannucleare* foram as mais acometidas por paralisia de membros. Interessante notar que, algumas aves do Grupo 2 no final do experimento conseguiram recuperar-se das paralisias, o que não ocorreu com as aves do Grupo 4 que tiveram membros paralisados. Em virtude das paralisias observadas optou-se por retirar tecido cerebral das aves dos grupos 2 e 4 que chegaram ao óbito para investigações histopatológicas, e foram verificados danos ao tecido nervoso. As três aves que chegaram ao óbito do Grupo 2 foram aquelas com maiores valores de parasitemia e com quadros severos de paralisia de membros, passaram ao menos 10 dias sem conseguir ficar de pé. As duas aves que chegaram ao óbito do Grupo 3 estavam desnutridas e desidratadas em virtude da diarreia intensa, também constavam entre as aves com maiores espiroquetemias. A ave que chegou ao óbito do Grupo 4 encontrava-se anteriormente bastante abatida, desidratada e com membros inferiores paralisados.

Os valores percentuais de hematócrito constam na Figura 11, na primeira, segunda, quarta, quinta e sexta semana estes valores não diferiram significativamente entre os grupos, entretanto na terceira semana houve diferença significativa entre os grupos 1 e 3, 1 e 4, 2 e 3, 2 e 4. Os hematócritos foram sempre realizados no início das semanas, e ao início da terceira semana as aves dos grupos infectados acabavam de superar os picos de parasitemia e espiroquetemia. Embora na quarta semana os valores tenham sido bem semelhantes ressaltasse que o grupo controle exibiu media superior em pelo menos 3 pontos percentuais.

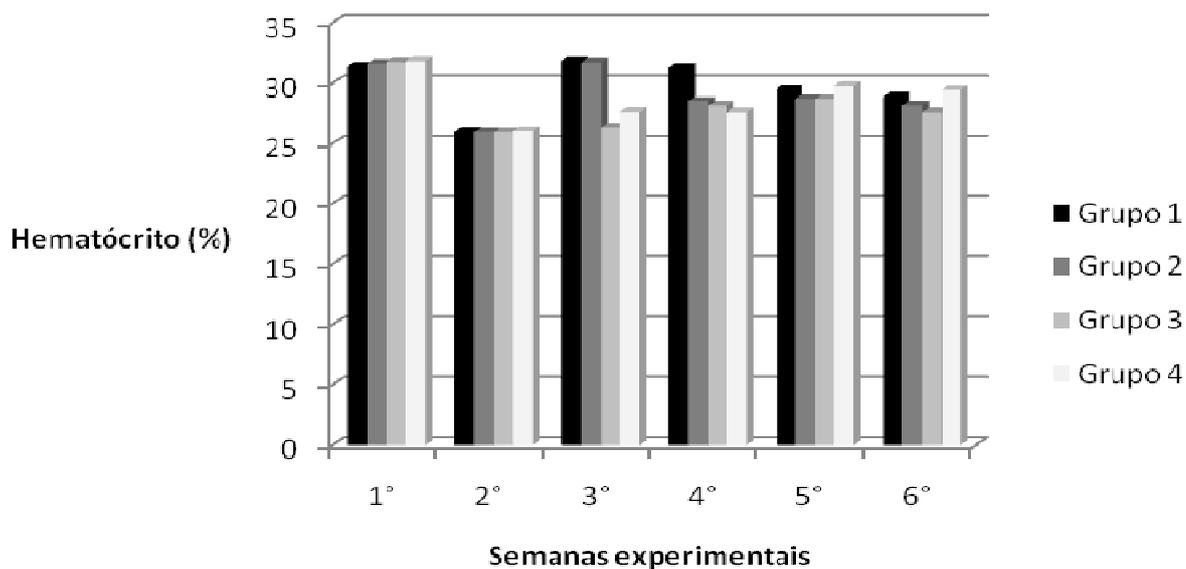


Figura 11. Valores percentuais médios de hematócritos de *Gallus gallus* dos grupos experimentais, Grupo 1- controle; Grupo 2- infectado por *Plasmodium juxtannucleare*, Grupo 3- infectado por *Borrelia anserina* e Grupo 4 co-infectado por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*.

As médias do peso corporal das aves ao longo do experimento constam na Figura 12. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os pesos médios de aves dos Grupos 1 e 2 ao longo do experimento. Mas houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos 1 e 3, 1 e 4, 2 e 3, 2 e 4 ao longo de quase todo o experimento. Destaca-se que as maiores diferenças entre as médias de pesos dos Grupos 1 e 2 em relação aos Grupos 3 e 4 ocorreram nas três últimas pesagens que correspondem aos 35°, 38° e 41° dias pós inoculação.

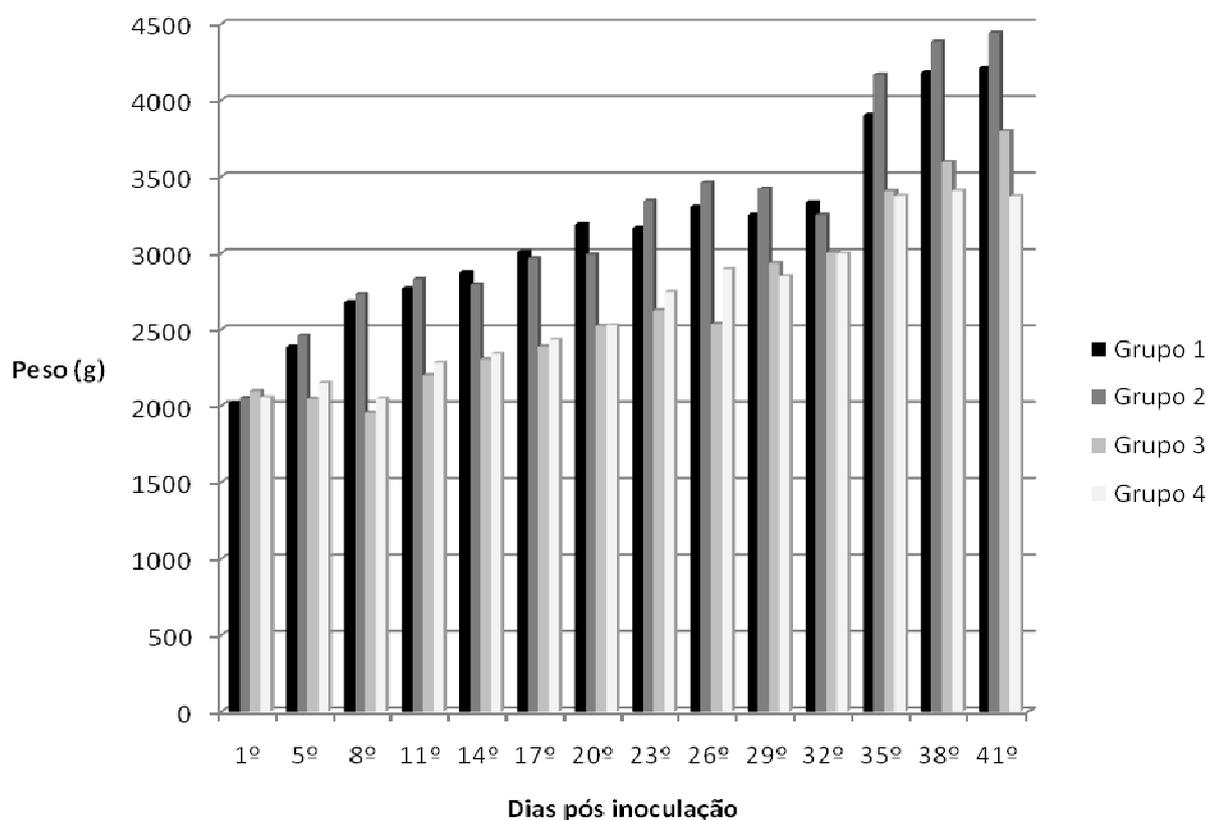


Figura 12. Valores médios de peso corporal de *Gallus gallus* dos grupos experimentais, Grupo 1- controle; Grupo 2- infectado por *Plasmodium juxtanucleare*, Grupo 3- infectado por *Borrelia anserina* e Grupo 4 co-infectado por *P. juxtanucleare* e *B. anserina*.

4. DISCUSSÃO

Quando analisados os quatro grupos experimentais, fica evidente que as aves do Grupo 4, co-infectado, tiveram maiores prejuízos à saúde, e de fato, houve um sinergismo entre as infecções, de modo que um parasito potencializou os efeitos do outro. Isto fica claro quando se observa que tanto a parasitemia quanto a espiroquetemia das aves do Grupo 4 foram superiores à parasitemia registrada no Grupo 2 e a espiroquetemia registrada no Grupo 3. Possivelmente, em virtude da co-infecção, as aves do Grupo 4 tiveram o sistema imunológico abalado de forma mais severa que as aves dos Grupos 2 e 3. Entretanto, os períodos de pré-patência e picos máximo de parasitemia não variaram entre os Grupos 2 e 4, bem como o período pré-patente, patente e pico máximo de espiroquetemia não variaram entre os Grupos 3 e 4. Possivelmente estes parâmetros biológicos estão mais relacionados às cepas dos parasitos do que com as condições imunológicas dos hospedeiros. A curva da parasitemia nos grupos 2 e 4 estão de acordo com relatos de outros autores que afirmam que os picos máximos de parasitemia ocorrem em geral no primeiro mês pós inoculação e após este período há um decréscimo no número de parasitos encontrados na circulação periférica (KRETTLI, 1971; MASSARD & MASSARD, 1981; SOUZA, 1998). Foi possível verificar que tanto as aves do Grupo 2 como do as Grupo 4 manifestaram sintomas característicos da malária aviária, como anemia, palidez, apatia, falta de apetite e paralisia de membros, também já observados por demais autores (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD &

MASSARD, 1981; SOUZA, 1998; SOARES et al. 1999; VASHIST et al., 2008, 2009). Embora já tenha sido relatada diarreia associada à malária aviária, esta não é tão comum e nem tão grave quanto a diarreia associada à borreliose aviária, que é grave e leva a ave a desidratação intensa. Segundo BANDOPADHYAY & VEGAD (1984) as fezes diarréicas e esverdeadas características de aves infectadas por *B. anserina* podem ser conseqüências de quadros de enterite e hemossiderose. As aves do Grupo 4 manifestaram diarreia característica da borreliose aviária e uma delas, bastante desidratada e com membros paralisados chegou ao óbito. As alterações clínicas determinadas pela borreliose podem evoluir para quadro de hipotermia, podendo ocorrer transtornos nervosos e morte (HUTYRA et al., 1947; MARCHOUX & SALIMBENI, 1903). Os sintomas manifestos nas aves do Grupo 4 também indicam um sinergismo e potencialização dos patógenos inoculados. As paralisias de membros observadas em aves dos Grupos 3 e 4, podem estar relacionadas aos quadros de lesões teciduais nervosas, observados nos cortes histológicos de cérebro das aves. Algumas espécies de plasmódios como o *P. falciparum* possuem a capacidade de produzirem malária cerebral, cujos principais sintomas são ligeira rigidez na nuca, perturbações sensoriais, desorientação, sonolência ou excitação, convulsões, vômitos e dores de cabeça, podendo o paciente chegar ao coma. Tudo isto causado pela oclusão de capilares cerebrais, pois os eritrócitos são deformados pelo plasmódio o que impossibilita sua passagem nos finos capilares e também adesão de plaquetas às paredes dos vasos sanguíneos (FIOCRUZ, 2010). Possivelmente, estes eventos também ocorrem com as aves infectadas por *P. juxtenucleare*. Os valores percentuais de hematócrito variaram entre os grupos mas ficaram dentro da faixa de normalidade para *Gallus gallus*. As médias de peso corporal das aves dos Grupos 3 e 4 foram as menores ao longo do experimento, o que pode ser explicado pela grande perda d'água destes animais em virtude da diarreia intensa, relacionada à presença das espiroquetas nos intestinos, bem como pela quadro de anorexia das aves nas fases agudas das infecções e ao quadro de paralisia de membros que dificultava o acesso à alimentação. Nos Grupos 1 e 2, a médias de peso corporal ao longo dos dias foi de acordo com o esperado para a linhagem de frangos utilizada. Tais achados clínicos motivaram a pesquisa bioquímica clínica e histopatológica das aves infectadas para melhor compreensão da relação parasito x hospedeiro e parasito x espiroqueta.

5. CONCLUSÕES

- *Gallus gallus* infectados por *P. juxtenucleare* e *B. anserina* concomitantemente exibem valores de parasitemia, espiroquetemia e sinais clínicos destas parasitoses mais pronunciados do que os observados nas aves parasitadas por cada um destes patógenos isoladamente, podendo-se afirmar que uma infecção potencializa a outra.
- O quadro de paralisia de membros ocasionado pela infecção por *P. juxtenucleare* está relacionado às lesões causadas por estes parasitos no tecido nervoso encefálico.
- Em *G. gallus*, a borreliose aviária compromete mais o ganho de peso do que a malária aviária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDOPADHAY, A. C.; VEGAD, J. L. Enteritis and green diarrhea in experimental avian spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*, v. 37, p. 381–382, 1984.
- BERGER, S.A.; DAVID, L. Pseudo Borreliosis in Patients with Malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n.1, p. 207-209, 2005.
- BIER, O. Microbiologia e Imunologia. 24 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
- BOERO, J.J. 1967. Parasitosis Animales. Buenos Aires: Universidade de Buenos Aires, 1967. 498p.
- DHANAPALA, S.B.. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. *Revista de Malariologia*, v. 41, p.39-46, 1962.
- FIOCRUZ, 2010. Malária. www.fiocruz.br (acessado em 25 de Novembro de 2010).
- HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNINGER, R. *Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos*. Vol.1. Editorial Labor, S.A., 1947, 739p.
- KRETLI, A.U. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.14, p. 235-245, 1972.
- LABRUNA, M.B., RESENDE, J.S., MARTINS, N.R.S., JORGE, M.A. Cryopreservation of an avian spirochete strain in liquid nitrogen. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.51 n.6, 1999.
- LISBÔA, R.S.; TEIXEIRA, R.C., RANGEL, C.P; SANTOS, H.A; MASSARD, C.L; FONSECA, A.H. Avian spirochetosis in chickens following experimental transmission of *Borrelia anserina* by *Argas (Persicargas) miniatus*. *Avian Diseases*,v. 53, n.2, p.166-1688. 2009.
- MARCHOUX, E.; SALIMBENI, A. La spirillose des poules. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 17, p. 569–580, 1903.
- MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 3-23, 1981.
- MIRON, D.; OLSHINSKY, A.; ASSY, N.; ZUKER, M.; EFRAT, M.; HUSSEIN, O. *Plasmodium* and *Borrelia* co-infection. *Journal of Travel Medicine*, v.11, n. 2, p. 115- 116, 2004.
- SA'IDU, L.; AGBEDE, R.I.S.; ABDU, A.P. Prevalence of avian spirochetosis in Zaria. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 50, p. 39–40, 1995.

SHOMMEIN, A.M; KHOGALI, A. Fowl spirochaetosis. Haematological and histopathological studies. *Bulletin of epizootic diseases of Africa*, v.22, p. 255-261, 1974.

SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; SOUZA, P.C.A. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Parasitologia al dia*, v. 23, p. 87-90, 1999.

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

VASHIST, U. ; SILVEIRA, P. ; CABRAL, A. ; AMARAL, K. B.; SOARES, G. L. G. ; D'AGOSTO, M. . Atividade malaricida da quercetina em *Gallus gallus* L. 1758 imunossuprimidos infectados por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani & Gomes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 220-223, 2008.

VASHIST, U. ; CARVALHAES, R. ; D' AGOSTO, M. ; DA SILVA, A. D. Antimalarial Activity of the Novel Quinoline/6-Thiopurine Conjugate in Linnaeus, Infected Experimentally by *Plasmodium juxtannucleare* in *Gallus gallus*. *Chemical Biology & Drug Design* , v. 74, p. 434-437, 2009.

VERSIANI, V.; GOMES, B.F. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* (nota prévia). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 1, p. 231-233, 1941.

Capítulo III

Níveis séricos de enzimas e histopatologia hepática *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891).

Capítulo III – Níveis séricos de enzimas e histopatologia hepática de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891).

RESUMO

Uma das espécies causadoras da malária aviária é o hemoprotozoário *P. juxtannucleare*, comumente encontrado em aves domésticas no Brasil. A espiroqueta *B. anserina* também é freqüente em aves de diversos países. Tendo em vista que, a avicultura industrial e orgânica tem ganhado cada vez mais espaço no cenário mundial e que atualmente existem poucos estudos que abordem parâmetros clínicos tanto de aves saudáveis como aves parasitadas, este trabalho teve por objetivo avaliar se *Gallus gallus* infectados por *P. juxtannucleare* e/ou *B. anserina* apresentam alterações nos níveis séricos de enzimas hepáticas e tecido hepático. Para isto, foi analisada a atividade da ALT e da AST ao longo de cinco semanas e realizadas análises histológicas de cortes do fígado de quatro grupos de aves, Grupo 1- aves controle não infectadas, Grupo 2- aves infectadas por *P. juxtannucleare*, Grupo 3- aves infectadas por *B. anserina*, Grupo 4- aves infectadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*. A atividade da ALT foi significativamente elevada nos Grupos 2, 3 e 4 em relação ao Grupo 1 a partir da segunda semana pós inoculações, sendo que o Grupo 4 exibiu os valores mais elevados. A atividade da AST oscilou, mas não variou significativamente entre os grupos. Ambas as enzimas também serviram como marcadoras de estresse das aves. Nos cortes histológicos de fígado das aves do Grupo 1 não foram evidenciadas alterações marcantes, já nos Grupos 2, 3 e 4 foram evidenciados infiltrados inflamatórios, hepatócitos vacuolizados e tumefeitos, hemorragias extensas, proliferação de tecido conjuntivo fibroso no espaço porta, congestão e dilatação de sinusóides e colestase intrahepática. Conclui-se que, as infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em *G. gallus* provocam alterações hepáticas, indicadas pelo aumento da atividade da enzima ALT e pelos achados histopatológicos hepáticos.

Palavras-chave: malária aviária, borreliose aviária, aminotransferases, fígado, histopatologia, galinhas.

Chapter III- Hepatic enzyme serum levels and histopatology of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected with *Plasmodium juxtanucleare* Versiani & Gomes, 1941 and *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891).

ABSTRACT

One species that cause avian malaria is the haemoprotozoan *Plasmodium juxtanucleare*, commonly found in poultry in Brazil. The spirochete *Borrelia anserina* is also widespread in poultry in several countries. The industrial and organic poultry has been increasingly more space on the world. There are few studies about clinical parameters of healthy birds and infected birds, this study aimed to evaluate changes in the hepatic profile of *Gallus gallus* infected by *P. juxtanucleare* and / or *B. anserina*. For this, we analyzed the ALT and AST activity over five weeks and conducted histological liver sections of four birds groups, Group 1 - control non-infected birds, Group 2 - birds infected by *P. juxtanucleare*, Group 3 – birds infected by *B. anserina*, Group 4 - birds infected by *P. juxtanucleare* and *B. anserina*. The activity of ALT was significantly higher in Groups 2, 3 and 4 compared to Group 1 from the second week after inoculation, and Group 4 exhibited the highest values. AST activity fluctuated but did not vary significantly between groups. Both enzymes also served as a marker of stress in birds. In histological liver sections of birds of Group 1 did not show marked changes, as in Groups 2, 3 and 4 were demonstrated inflammatory infiltrates, swollen and vacuolated hepatocytes, extensive hemorrhages, proliferation of fibrous tissue in the portal space, congestion and dilation sinusoids and intrahepatic cholestasis. It is concluded that the infections caused by *P. juxtanucleare* and *Borrelia anserina* in *G. gallus* cause liver abnormalities, as indicated by increased activity of the enzyme ALT and liver histopathology.

Key words: avian malaria, avian borreliosis, aminotransferases, liver, histopatology, hens.

1. INTRODUÇÃO

Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941, causador da malária aviária em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758, foi observado pela primeira vez no Brasil em galinhas de um mercado municipal. Os pesquisadores ao examinarem o sangue colhido destas aves observaram um parasito de pequenas dimensões, com formas arredondadas ou irregulares sempre vistas junto ao núcleo das hemácias, e por isso foi nomeada *P. juxtannucleare* (VERSIANI & GOMES, 1941).

O grau de patogenicidade de *P. juxtannucleare* pode estar relacionado à capacidade das cepas em produzir estádios exoeritrocíticos, que podem ser encontrados principalmente no baço, e também no fígado, pulmão, medula óssea e cérebro (PARAENSE, 1947; KRETTLI, 1972).

A espiroqueta *Borrelia anserina*, causadora da borreliose aviária foi descrita por Sakharoff (1891) ao pesquisar o sangue de gansos febris no Caucasus. O primeiro surto desta espiroquetose no Brasil foi relatado em galinhas por Marchoux e Salimbeni (1903), que apontaram *Argas persicus* como o artrópode vetor desta bactéria. As aves infectadas por *B. anserina* em geral manifestam a doença logo na primeira semana pós inoculação, os principais sintomas são diarreia verde escura, febre, enterite aguda, inapetência, sonolência, penas eriçadas, crista pálida, podendo ocorrer paralisia das asas ou patas (MARCHOUX & SALIMBENI, 1903; BOERO, 1967; BIER, 1985, LISBÔA, 2006).

Curioso que no Brasil, a descrição da malária neotropical das aves galiformes foi feita em 1941, quando os pesquisadores Versiani e Gomes ao estudarem a borreliose aviária, observaram e descreveram, casualmente *P. juxtannucleare* (VERSIANI & GOMES, 1941, SOARES, 2000). Embora pouco citado na literatura, não raro estas parasitoses mencionadas podem ocorrer naturalmente em conjunto.

Em humanos existem relatos de casos de parasitos do gênero *Plasmodium* e *Borrelia* ocorrendo simultaneamente, causando severa anemia hemolítica e morte. O sinergismo entre as infecções causadas por *Plasmodium* e *Borrelia*, tanto em humanos quanto em animais foi bem pouco estudado até o presente momento (MIRON et al., 2000, VASHIST, 2010).

Há algumas décadas a avicultura destaca-se como uma das principais atividades criatórias mundialmente, gerando grande movimentação de capital, além de aumentar a oferta de emprego no campo através da mão de obra rural (MOTA, 1998). Além disto, alguns fatores da atualidade como o exagerado crescimento demográfico e o surgimento de problemas ecológicos relacionados à bovinocultura, como compactação dos solos e emissão de grande quantidade de gás metano por parte do gado, levam a crer que o setor da avicultura terá ainda mais destaque nos próximos anos, por se tratar de animais de ciclo curto que exigem menor infraestrutura e custos na sua produção, e ainda assim são excelentes fontes de proteínas para a população humana. Por este motivo, fazem-se necessários o melhoramento de métodos diagnósticos e controle das doenças aviárias, bem como o estudo de como estas doenças podem interferir na saúde e produtividade das aves.

As variáveis bioquímicas têm sido usadas como ferramentas nos diagnósticos de doenças em animais de companhia e produção, entretanto existem poucos estudos sobre este assunto relacionado às aves (BORSA et al., 2006). Na literatura atual não existem estudos sobre o perfil hepático de aves infectadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*, sendo este um importante parâmetro para se avaliar a saúde de aves de produção.

As aminotransferases constituem um grupo de enzimas que catalizam a interconversão de aminoácidos em α -cetoácidos pela transferência dos grupos aminos (MOSS & HENDERSON, 1998). As aminotransferases tem um importante papel na ligação entre o metabolismo dos aminoácidos e o de carboidratos, sendo um grupo de enzimas essenciais na via de gliconeogênese, além de serem excelentes indicadores de lesões hepáticas.

Este trabalho teve por objetivo verificar alterações no perfil hepático em aves de produção *G. gallus* em resposta às infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas quarenta e oito *G. gallus* da raça Cobb Avian 48, com um dia de idade já previamente vacinadas contra as doenças Pox, Gumboro e Marek. Esta raça de frangos foi escolhida por responderem bem a diversos tipos de manejo e uma grande variedade de programas nutricionais.

As aves eram provenientes das Granjas Planalto, no município de Uberlândia, MG, elas foram transportadas em caixas de papelão até o laboratório para pesquisas parasitológicas W.O. NEITZ da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ Brasil. Até o décimo quinto dia de idade as aves foram acondicionadas em caixas de amianto (2x1m) com bordas arredondadas forradas com maravalha, para não se esmagarem, cobertas com tela, para não terem contato com agentes vetores e iluminadas com lâmpada incandescente (60W) para auxílio na regulação térmica corporal. Posteriormente as aves foram colocadas em galpão (5mx 5m) previamente limpo e desinfetado com vassoura de fogo. Aos 45 dias de idade as aves foram transferidas para gaiolas suspensas (150cm x 90cm) para não correr o risco de disseminação das espiroquetas, via feco-oral, entre os grupos experimentais, após as inoculações. As gaiolas foram teladas para que mosquitos e outros artrópodes não picassem as aves. Abaixo das gaiolas foi colocada mistura de capim seco com “cal” para que as fezes e urina ao caírem no chão não degradassem e provocassem mal cheiro no ambiente, a cada três dias este material era renovado. Foram colocados ventiladores no galpão em que estavam as gaiolas suspensas para que as aves não tivessem hipertermia. Durante todo o experimento as aves foram alimentadas com ração Purina® linha Natural, livre de antibióticos e coccidiostáticos e água “ad libitum”. Aos 60 dias de idade as aves foram separadas em quatro grupos com doze aves cada, sendo Grupo 1- controle; Grupo 2- infectado por *P. juxtannucleare*; Grupo 3- infectado por *B. anserina* e Grupo 4- infectado por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*. As infecções ocorreram conforme o Quadro 1.

Quadro 1 . Grupos experimentais, quantidade e origem dos inóculos e via de infecção do experimento realizado com *Gallus gallus* infectados por *Plasmodium juxtannucleare* e/ou *Borrelia anserina*.

Grupo Experimental	Quantidade e origem do inóculo	Via de infecção
Grupo 1	0,5 ml de soro fisiológico comercial	Intraperitoneal
Grupo 2	0,3 ml de sangue parasitado por <i>P. juxtannucleare</i> proveniente de galo da raça Sedosa do Japão proveniente de criação rústica no município de Seropédica, RJ, com parasitemia em torno de 7%.	Intraperitoneal
Grupo 3	0,5 ml de soro infectado por cepa de <i>B. anserina</i> proveniente do município de Pedro Leopoldo e criopreservada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro	Intraperitoneal
Grupo 4	Inóculo do Grupo 2 + Inóculo do Grupo 3	Intraperitoneal

As aves tiveram a parasitemia e a espiroquetemia acompanhadas através de esfregaços sanguíneos ao longo de todo o experimento. Semanalmente foram colhidas amostras de sangue, cerca de 1mL de cada ave, via punção de veias da perna ou da asa para a realização de análises das atividades das enzimas AST e ALT.

Para as análises das aminotransferases, 0,5 mL de substrato ALT ou AST (uma solução de L-alanina 0.2M ou L-aspartato 0.2M, respectivamente, α -cetoglutarato 0.002M, e tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.4) foi incubado a 37°C por 2 min. Em seguida, 100 μ l ou 200 μ l de soro (para ALT ou AST, respectivamente), foi adicionado, homogeneizado e novamente incubado a 37°C por 30 min. Posteriormente, 0.5ml de 2.4-dinitrofenilhidrazina 0.001M foi adicionado e mantido a 25°C por 20min. A reação foi finalizada pela adição de 5ml de NaOH 0.4M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 505nm e os resultados expressos como URF/mL (KAPLAN & PESCE, 1996).

Para o estudo dos possíveis tipos de lesões hepáticas decorrentes da infecção causada por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*, foram coletados fragmentos do fígado de duas aves de cada grupo experimental ao fim do experimento que durou 45 dias. Para isto, as aves foram necropsiadas, os fragmentos com cerca de 1 cm da região do lobo direito do fígado de cada ave foram retirados (Figura 7), fixados em formalina 4% por 24h a 4°C e mantidos em etanol 70%.

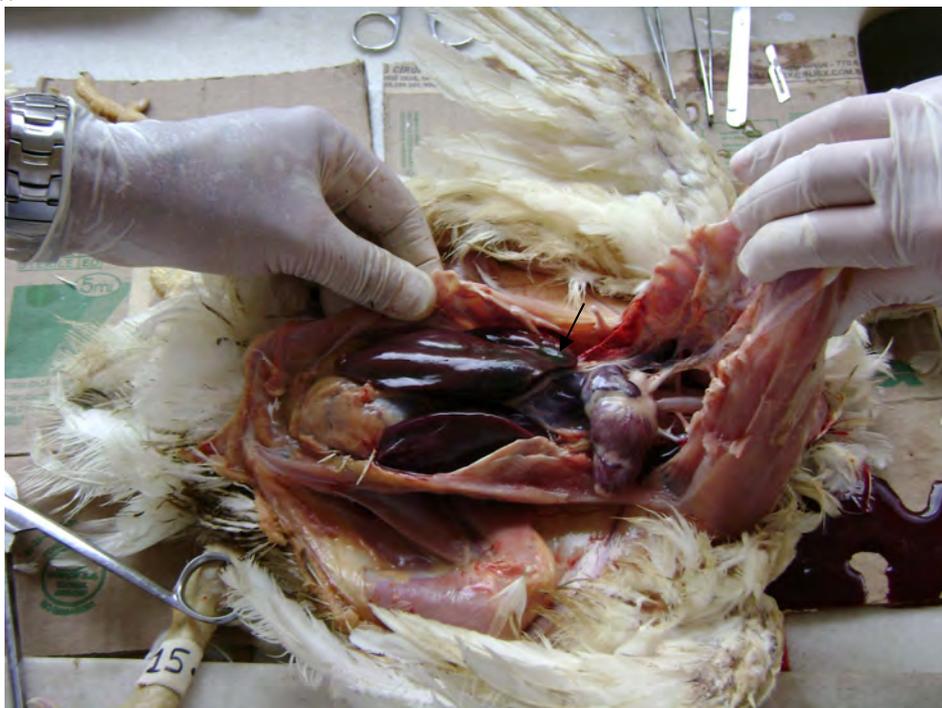


Figura 1. *Gallus gallus* infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina* necropsiado com indicação da região hepática retirada para as análises histopatológicas.

Estes tecidos foram processados de acordo com técnicas histológicas de rotina, incluídos em parafina, cortados em secções com 5 μ m de espessura com uso do micrótomo e montados em lâminas de vidro. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina, observadas em microscópio HUND WETZLAR H600 e as imagens do material foram capturadas com uso da câmera digital NIKON COOLPIX 4300. Todas estas etapas foram realizadas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Valores das atividades da AST e da ALT mensurados nas aves ao longo do experimento foram expressos como média e erro padrão da média ($X \pm SEM$), submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5 % de significância e ao teste de Tukey para comparação de médias.

3. RESULTADOS

Todos os estágios eritrocíticos de *P. juxtannucleare* (trofozoítos, esquizontes e gametócitos) foram observados nos grupos 2 e 4.

Nos grupos 3 e 4 foram observadas espiroquetas *B. anserina*, isoladas e aglomeradas.

Em relação a atividade da ALT (Figura 2), na primeira semana pós infecções foi observado em todos os grupos um aumento dos valores em relação ao valor basal (semana 0, $13,83 \pm 1,57$), mas sem diferenças significativas entre os grupos e destes em relação ao valor basal. Em todas as semanas experimentais os valores mensurados para a atividade da ALT no grupo controle, nenhum deles foi significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao valor basal. O Grupo 2 apresentou atividade da ALT mais elevada que o Grupo 1 durante todas as semanas experimentais, exceto na última, quando os valores dos Grupos 1 e 2 foram bem próximos. Os valores mais elevados da atividade da ALT no Grupo 2 ocorreram na primeira e segunda semana pós inoculações. No Grupo 3, a atividade da ALT foi mais elevada nas segunda e terceira semanas pós inoculações. O Grupo 4 demonstrou a atividade da ALT significativamente elevada em relação ao Grupo 1 nas segunda, terceira e quarta semanas pós inoculações. Dentre todos os grupos, o Grupo 4 demonstrou os maiores valores de atividade da ALT, com pico desta atividade na quarta semana, quando os Grupos 2 e 3 já demonstravam valores praticamente normalizados.

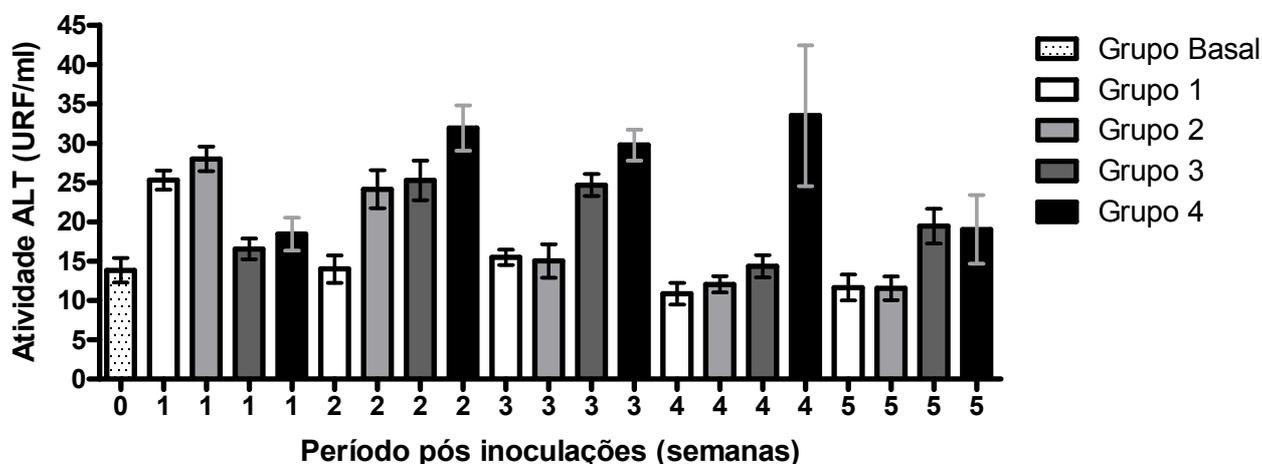


Figura 2. Atividade da alanina transaminase (ALT) no Grupo 1- Controle, Grupo 2- Infectados por *Plasmodium juxtannucleare*, Grupo 3- infectado por *Borrelia anserina* e Grupo 4 co-infectado por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* nas semanas experimentais. 0) semana anterior às inoculações, 1) primeira semana pós inoculação, 2) segunda semana pós inoculação, 3) terceira semana pós inoculação, 4) quarta semana pós inoculação, 5) quinta semana pós inoculação.

Na Figura 3 estão demonstrados os valores médios da atividade da AST nos grupos experimentais. Embora tenham ocorrido oscilações dos valores da atividade da AST entre os grupos ao longo das semanas experimentais, estatisticamente não houve diferenças entre os grupos a cada semana ($p < 0,05$) e entre os grupos e o valor basal.

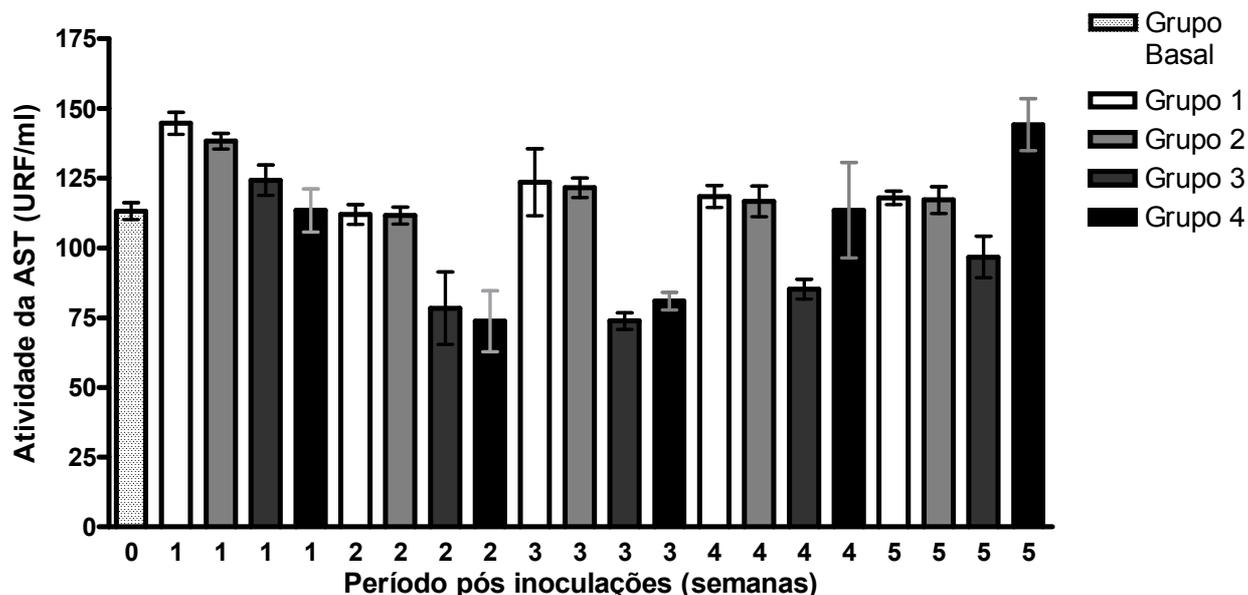


Figura 3. Atividade da aspartato aminotransferase (AST) no Grupo 1- Controle, Grupo 2- Infectados por *Plasmodium juxtannucleare*, Grupo 3- infectado por *Borrelia anserina* e Grupo 4 co-infectado por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* nas semanas experimentais. 0) semana anterior às inoculações, 1) primeira semana pós inoculação, 2) segunda semana pós inoculação, 3) terceira semana pós inoculação, 4) quarta semana pós inoculação, 5) quinta semana pós inoculação.

Macroscopicamente foi observado que os fígados das aves infectadas dos grupos 2, 3 e 4 exibiam áreas com coloração mais escura que o normalmente observado como exemplificado na Figura 4.

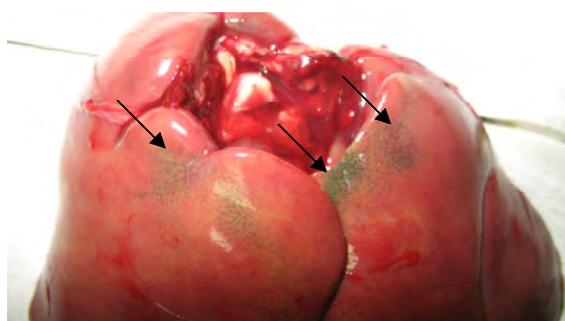


Figura 4. Fígado com focos de coloração escura de *Gallus gallus* infectado por *Plasmodium juxtannucleare*.

O exame microscópico de lâminas com fragmentos do tecido hepático de aves do Grupo 1 não revelou alterações marcantes. Em lâminas com tecido hepático de aves dos Grupos 2, 3 e 4 revelou a presença de hepatócitos vacuolizados e tumefeitos, hemorragias extensas, proliferação de tecido conjuntivo fibroso no espaço porta, infiltrado inflamatório (linfoplasmocitário) multifocal e difuso subcapsular, nas áreas portais e periportais e no

parênquima. Além de congestão e dilatação de sinusóides e colestase intrahepática (Figuras 5 a 10).

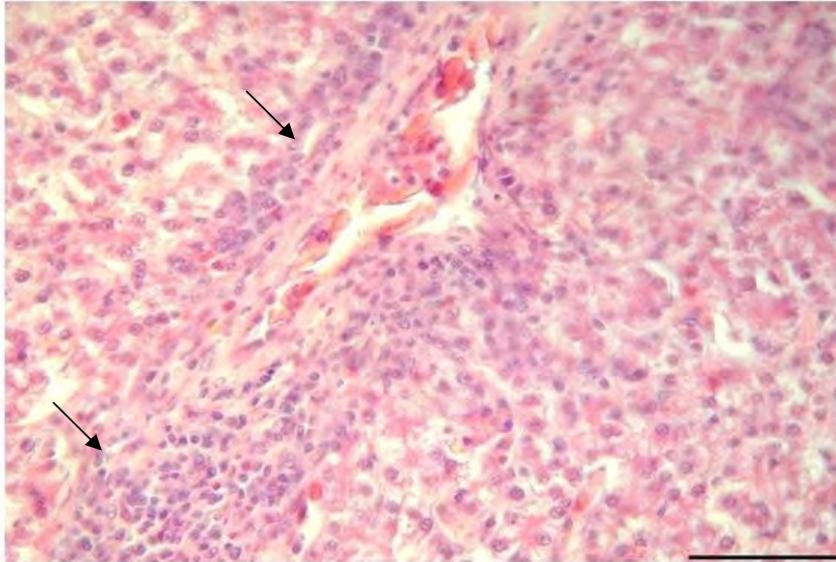


Figura 5. Tecido hepático de *Gallus gallus* infectado por *Plasmodium juxtannucleare* com infiltrados inflamatórios (barra = 50 μ m).

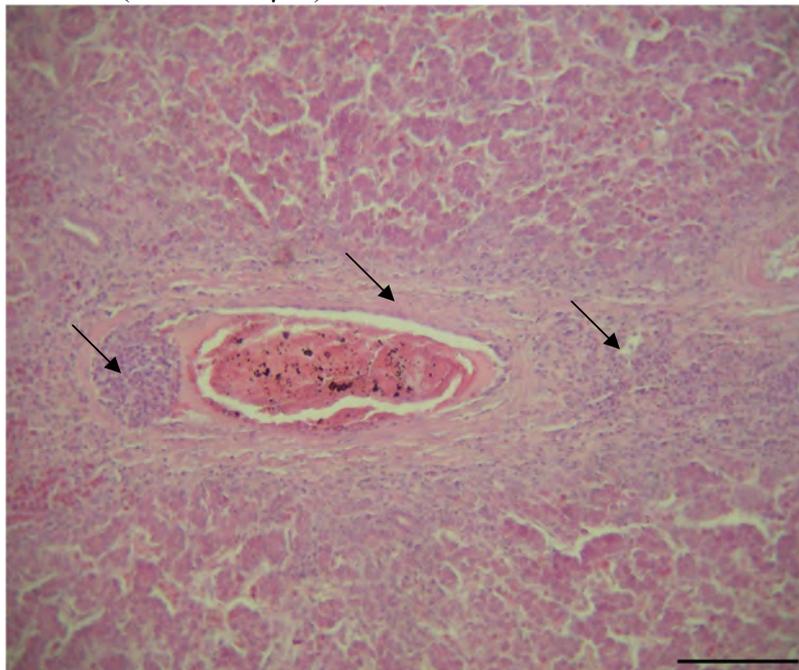


Figura 6. Tecido hepático de *Gallus gallus* infectado por *Borrelia anserina* com proliferação de tecido conjuntivo no espaço porta e infiltrado linfoplasmocitário focal e difuso. Obj. 40x. (barra = 50 μ m)

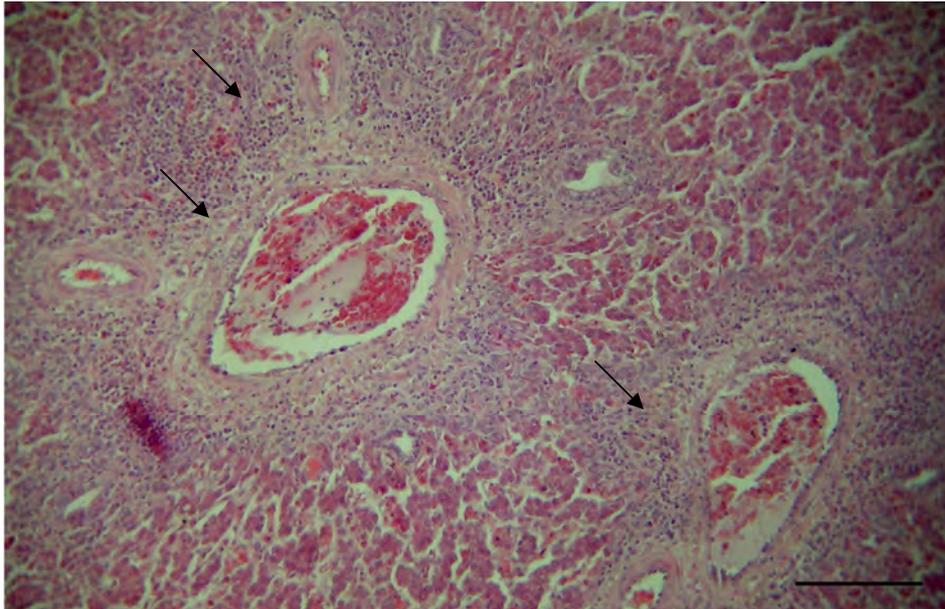


Figura 7. Tecido hepático de *Gallus gallus* infectado por *Borrelia anserina* com infiltrado linfoplasmocitário no espaço porta. Obj. 40x (barra = 50 μ m).

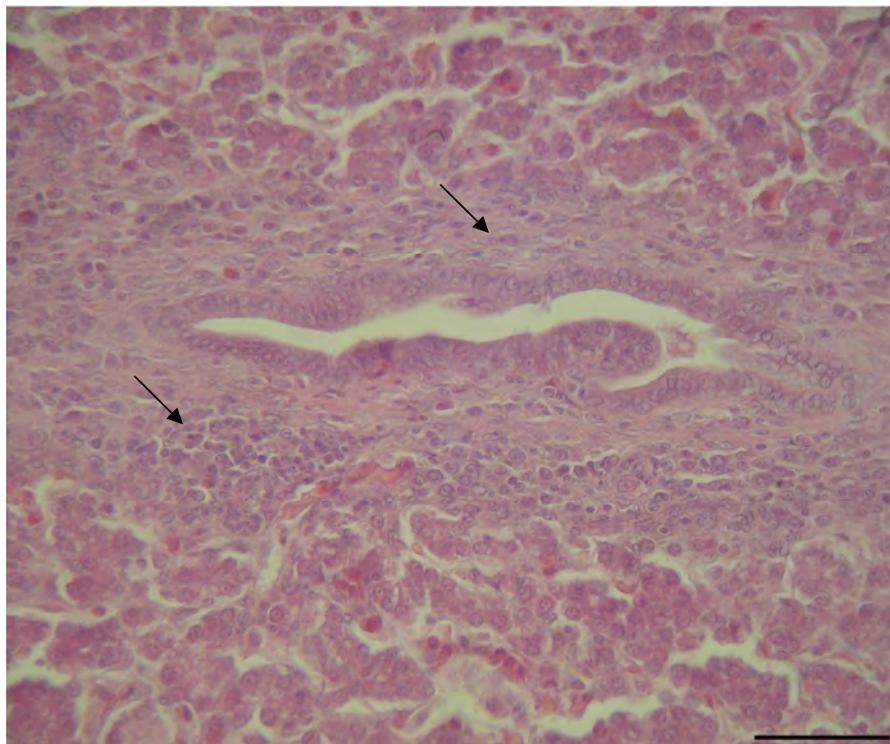


Figura 8. Tecido hepático de *Gallus gallus* infectado por *Plasmodium juxtannucleare* com infiltrado linfoplasmocitário periductal e vasos sinusóides com presença de hemácias. Obj. 40x. (barra = 50 μ m)

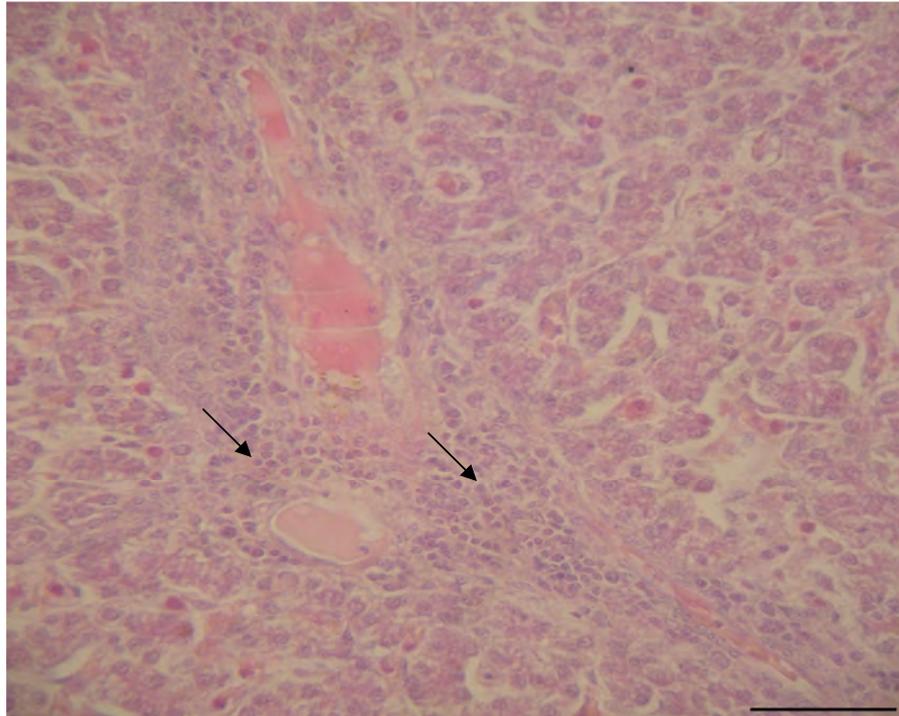


Figura 9. Tecido hepático de *Gallus gallus* infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina* com infiltrado linfoplasmocitário perivascular, vaso sanguíneo com material de natureza eosinofílica e hepatócitos vacuolizados. Obj. 40x. (barra = 50 μ m)

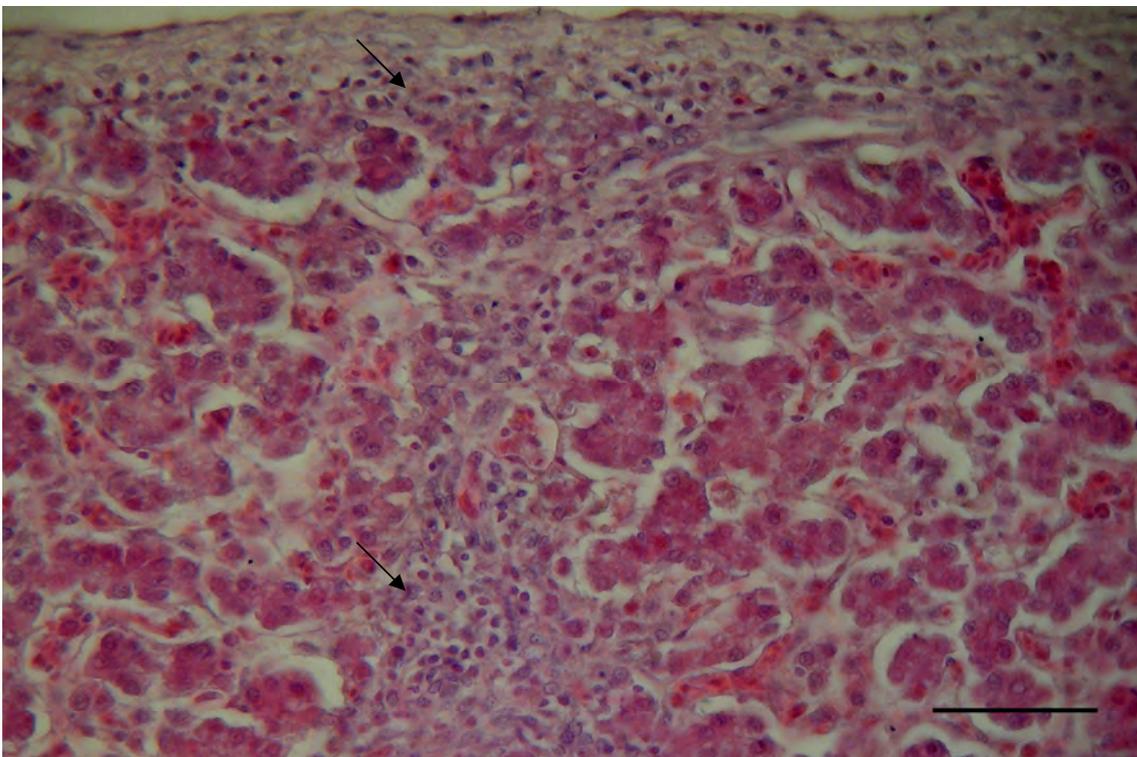


Figura 10. Tecido hepático de *Gallus gallus* infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina* com infiltrado linfoplasmocitário subcapsular, estendendo-se para o parênquima. Obj. 40x. (barra = 50 μ m).

4. DISCUSSÃO

Em relação às atividades das enzimas hepáticas ALT e AST é mencionado na literatura que fatores relacionados ao clima, tipo de alimentação e manejo podem influenciar os resultados destas análises (BORSA et al., 2006). Na primeira semana do experimento, os grupos 1, 2, 3 e 4 demonstraram aumento das atividades da AST e ALT em relação às outras semanas. Deve-se levar em conta que as aves estavam ainda em fase de adaptação à manipulação para as coletas de sangue e possivelmente ficaram estressadas, mas ao longo do experimento estes parâmetros não mais foram afetados pelo estresse e somente pela infecção.

A partir da segunda semana pós inoculações ocorreram as elevações significativas da atividade da ALT nos Grupos 2, 3 e 4 em relação ao Grupo 1. Isto ocorreu possivelmente pelo fato de que nesta altura do experimento ambas as infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* já estavam estabelecidas nos organismos hospedeiros, causando danos às aves. A atividade desta enzima em pequenos animais, como galinhas, é amplamente utilizada na determinação de hepatopatologias (KRAMER, 1989). Estudos revelaram que patos inoculados com vírus da hepatite apresentaram aumento da atividade da ALT (AHMED et al., 1975). A elevação dos níveis séricos destas enzimas atribuídas a disfunção hepática pode ser devido a ruptura de hepatócitos, resultantes de necroses, ou alterações na permeabilidade da membrana celular ou processo de colestase (KANECO, 1989), conforme visualizado nos cortes histológicos.

A atividade da AST não variou significativamente nos Grupos 2,3 e 4 em relação ao Grupo 1 ao longo do experimento. Alguns autores mencionam casos de danos hepáticos crônicos que produziram sutis rupturas nas células hepáticas, mas sem alterar os valores normais da atividade sérica da AST (FUDGE, 2000). Esta enzima é considerada um marcador não específico por ser encontrada em vários tecidos, mas altamente sensível indicador de lesão tecidual, estando mais relacionada a lesão tecidual recente e diminuição da função do órgão (LUMEIJ, 1997). A atividade basal da enzima no plasma é geralmente um reflexo do acúmulo e da mudança sofrida pelo tecido que contém esta enzima. Análise da atividade da AST é freqüentemente utilizada como complemento no método diagnóstico e não como parâmetro principal. O fato da atividade da AST neste estudo não ter variado significativamente entre os grupos possivelmente ocorreu pela inespecificidade desta enzima como indicador de lesão hepática

A coloração escura do fígado das aves, associado aos achados histopatológicos nos cortes de fígado de aves dos grupos 2, 3 e 4 confirmaram a ocorrência de danos hepáticos, e que as infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *Borrelia anserina* pode influenciar substancialmente na saúde do animal. Estudos com probióticos, aflatoxinas e dietas adicionadas em frangos também validaram o uso do perfil hepático com indicador de saúde dos animais (KANASHIRO et al., 2001; CASSOCK et al., 2005; ARIETA-MENDONZA et al., 2007).

5. CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram que a infecção causada por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em *G. gallus* provoca alterações hepáticas, indicadas pelo aumento da atividade da enzima ALT e pelos achados histopatológicos nos cortes histológicos de fígado de aves infectadas. Além disso, pode se observar que a atividade da ALT é um parâmetro fiel para predizer o estado de saúde de aves infectadas por *P. juxtannucleare* e/ou *B. anserina* neste estudo, e que as enzimas ALT e AST podem ser usadas como marcadores de estresse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.A.S., EL-ABDIN, Y.Z., HAMZA, S., SAAD, F.G.,1961. Effect of experimental duck virus hepatitis infection on some biochemical constituents and enzymes in the serum of white pekin ducklings. *Avian Dis.* 19, 305-310.
- ARRIETA-MENDOZA,D., PEREZ-AREVALO, M.L., LUENGO, A., HERNÁNDES, J.P., LISTA-ALVES, D., MOSQUER, J., 2007. Alteraciones histológicas hepáticas e incremento de proteínas séricas en pollos de engorde alimentados con dietas suplementadas con *Saccharomyces cerevisiae*. *Invest. Clin.* 48(4), 431 – 443.
- BENNET, F.G.; WARREN, M., CHEONG, W.H. 1966. Biology of the Malaysan strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiane & Gomes, 1941. II. The sporogonic stages in *Culex (culex) sitiens* Wiedmann. *J. Parasitol.* 52, 647-652.
- BORSA, A., KOHAYAGAWA, A., BORETTI, L.P., SAITO, M.E., KUIBIDA,K., 2006. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. *Arq.Bras.Med.Vet. Zootec.* 48 (4), 675-677.
- CAMPBELL, T.W.; DEIN, F.J., 1984. Avian Hematology. The Basics. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 14 (2), 223-248.
- DHANAPHALA, S.B., 1962. The ocorrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. *Rev. Malar.* 41, 39-46.
- DISSANAIKE, A.S.1963. On some blood parasites of wild animals in Ceylon. *Cey. Vet.* 14, 29-37.
- FUDGE, A. M.. 2000. **Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets**. Ed. Laboratory , Saunders, Philadelphia, 486pp.
- GARNHAM, P.C.C., 1966. Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell Sci. Public. Oxford. 1114pp.
- KANASHIRO, A.M.I. , BOTTINO, J.A., FERREIRA, F., CASTRO, A.G.M. , FERREIRA, A.J. P., 2001. Influência da administração contínua de probiótico em frangos de corte sobre atividades enzimáticas séricas e concentração de colesterol sérico. *Arq. Inst. Biol.* 68(2), 11-17.
- KANECO, J.J. (4^a ed.), 1989. Clinical biochemistry of domestic animals. Academic , San Diego, 932pp.
- KAPLAN , L.A. & PESCE, A.J. (3^ªED), 2003. CHINICAL CHEMISTRY- THEORY, ANALYSIS AND Correlation. Mosby, St. Louis. 1179 pp.
- Kramer, J.W., 1989. Clinical enzymology. In: Kaneco, J.J. (4^a ed.), 1989. Clinical biochemistry of domestic animals. Academic , San Diego, 932pp.

KRETTLI, A.U., 1972. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo 14, 235-245.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., CASTRO, F.A. 1991. *Culex saltanensis* Dyar, 1928 – Natural vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86, 87-94.

LUCAS, A.M., JAMROZ, C., 1961. Atlas of avian haematology. U.S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C. 276pp.

LUMEIJ, J.T., WESTERHOF J., 1987. Blood chemistry for the diagnosis of hepatobiliary disease in birds. A review. Vet. Q. 9, 255-61.

MANWELL, R.D., 1966. *Plasmodium japonicum*, *Plasmodium juxtannucleare* and *Plasmodium nucleophilum* in the far east. J. Protozool. 13, 8-11.

MASSARD, C.L., MASSARD, C.A., 1981. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941) em aves do Brasil. Rev. Bras. Med. Vet. 4(3), 3-23.

MOHAN, R.N., MANWELL, R.D. 1969. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Fringilla* sp). J. Parasitol. 55, 543.

MOSS, D.W, HENDERSON, A.R., 1998. Clinical enzymology. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R., (3rd ed.) 1999. Textbook of Clinical Chemistry. W.B Saunders Company, Philadelphia. 1919 pp.

MOTA, R.A., CUNHA, E. L. P., SOARES, S, C., ALVES, L. C., MASSARD, C.L., 1998. Variáveis Hematológicas em *Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectadas com *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Versiani e Gomes, 1941). Ci. Vet. Trop. 1(1), 176-180.

OLIVEIRA, C.E., SOUZA, P.C.A., MASSARD, C.L., SOARES, C.O., 2001. Caracterización Morfológica y morfométrica de *Plasmodium juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). Parasitol. Latinoam. 25(1), 1-7.

PARAENSE, W.L., 1947. Observações preliminares sobre o ciclo exoeritrocítico do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 45 (4), 813-822.

PINHEIRO, J., GOMES, E. M., CHAGAS, G.M., 2001. Aminotransferases Activity in the Hemolymph of *Bradybaena similaris* (Gastropoda, Xanthonychidae) under Starvation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96 (8), 1161-1164.

SANTOS-PREZOTO, H.H., D'AGOSTO, M., DAEMON, E., 2004. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. Parasitol. Latinoam. 59, 14-20.

SERRA-FREIRE, N.M., MASSARD, C.L., 1979. *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941). Parasita de *Gallus gallus* L., *Meleagris gallopavo* L. e *Chrysolophus* sp. na

região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. Rev. Univ. Rur. Série Ciências da Vida 20, 45-48.

SILVEIRA,P., VASHIST, U., CABRAL, A., AMARAL,K.A., SOARES, G.L.G., D'AGOSTO,M., 2009. Effect of rutin and chloroquine on White Leghorn chickens infected with *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare*. Trop. An. Health. Prod. 41 (7), 110-115.

VASHIST, U., SILVEIRA, P., CABRAL, A., AMARAL, K. B., SOARES, G. L. G., D'AGOSTO, M., 2008. Atividade malaricida da quercetina em *Gallus gallus* L. 1758 imunossuprimidos infectados por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani & Gomes. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17, 220-223.

VASHIST, U., CARVALHAES, R., D'AGOSTO, M., SILVA, A.D., 2009. Antimalarial Activity of the Novel Quinoline/6-Thiopurine Conjugate in *Gallus gallus* Linnaeus, Infected Experimentally by *Plasmodium juxtannucleare*. Ch. Biol. Dr. Des. 74, 434-437.

VERSIANI, V., GOMES, B.F., 1941. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* (nota prévia). Rev. Bras. Biol. 1, 231-233.

Capítulo IV

Níveis séricos de proteínas, ácido úrico, creatinina e histopatologia renal de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891).

Capítulo IV - Níveis séricos de proteínas, ácido úrico, creatinina e histopatologia renal de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891).

RESUMO

Plasmodium juxtannucleare e *Borrelia anserina* são hemoparasitos de *Gallus gallus* de regiões tropicais, criados de forma rústica ou orgânica, livre de medicamentos. Perdas no setor avícola estão associadas à presença destes patógenos. Entre outros problemas fisiológicos, o comprometimento da função renal pode ocasionar prejuízos na produção animal. Este trabalho teve por objetivo verificar alterações nos níveis séricos de proteínas, ácido úrico, creatinina e tecido renal de aves de produção *G. gallus* em resposta às infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* isoladamente e em conjunto. Para isto, foram analisadas as concentrações séricas de proteínas, ácido úrico, creatinina e realizadas análises histológicas de cortes do rim de aves saudáveis e infectadas por *P. juxtannucleare*, *B. anserina* e ambos os patógenos. Houve variação significativa entre as concentrações de proteínas totais das aves infectadas por ambos os patógenos e aves saudáveis ou infectadas por cada um dos patógenos isoladamente. A concentração sérica do ácido úrico foi mais elevada no grupo infectado por *P. juxtannucleare* e as concentrações séricas de creatinina não variaram significativamente entre os grupos experimentais. As análises histológicas revelaram nefrites, glomerulonefrites, congestão e hemorragias em algumas áreas dos rins de aves dos grupos infectados. Podemos concluir que as infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* isoladas ou em conjunto causam danos renais às aves, o que pode comprometer a produção e que a interação de ferramentas como anamnese, análise parasitológica, bioquímica clínica e histopatologia no estudo de infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em aves retrata mais fielmente o estado de saúde das aves do que qualquer uma destas isoladamente.

Palavras-chave: malária aviária, borreliose aviária, ácido úrico, creatinina, proteínas totais, rim, histopatologia, galinhas.

Chapter IV – Serum levels of proteins, uric acid, creatinine and renal histopathology of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 and *Borrelia anserina* Sakharoff, 1891.

ABSTRACT

Plasmodium juxtannucleare and *Borrelia anserina* are frequent hemoparasites in rustic or organic creations of *Gallus gallus* in tropical countries. Losses in the poultry sector are associated with the presence of these pathogens. Among other physiological problems, kidney function damage can cause losses in poultry production. This study aimed to evaluate changes in serum levels of proteins, uric acid, creatinine and renal tissue of poultry production *G. gallus* in response to the infections caused by *P. juxtannucleare* and *B. anserina* alone and together. For this, concentrations of serum proteins, uric acid, creatinine and histological sections of kidney of healthy birds and infected by *P. juxtannucleare*, *B. anserina* and both pathogens, were analyzed. There were significant variations between the concentrations of total protein from birds infected with both pathogens and healthy birds and infected by each pathogen alone. The serum concentration of uric acid was higher in the group infected by *P. juxtannucleare* and serum creatinine did not differ significantly among groups. Histological analysis revealed nephritis, glomerulonephritis, congestion and hemorrhages in some areas of the kidneys of infected groups. It is concluded that infections caused by *P. juxtannucleare* and *B. anserina* alone or together can cause kidney damage to birds, which could affect them in production negatively. The interaction of different tools such as life history of birds, parasitological analysis, clinical chemistry and histopathology in the study of *P. juxtannucleare* and *B. anserina* infections is more accurately to determine the health conditions of birds than any of these alone.

Key words: avian malaria, avian borreliosis, uric acid, creatinine, total protein, kidney, histopathology, hens.

1. INTRODUÇÃO

Os hemoparasitos tem sido foco de diversos estudos em vertebrados, o que se deve principalmente aos prejuízos econômicos por eles causados, além da importância do conhecimento das interações parasito-hospedeiro (ELISEI, 2005). Dentre os hemoparasitos aviários destacam-se *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 e *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891), frequentes em diferentes famílias de aves, mas especialmente em *Gallus gallus*, Linnaeus, 1758 criados de forma rústica ou orgânica, livre de medicamentos (VERSIANI & GOMES, 1941; BELTRÁN, 1941; PARAENSE, 1947; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981). Perdas no setor avícola já foram e continuam sendo atribuídas à presença destes patógenos que podem causar dentre vários sintomas diarreia intensa, enterites, anorexia, prostração, anemia e paralisia de membros (DHANAPALA, 1962; KRETTLI, 1972; MASSARD & MASSARD, 1981; BANDOPADHAY & VEGAD, 1984; SA'IDU et al., 1995; SOUZA, 1998; SOARES et al. 1999; VASHIST et al., 2008, 2009, 2010; LISBÔA et al., 2009). *Plasmodium juxtannucleare* ocorre em quase todos os estados do Brasil, e ainda em outros países da América Latina, Ásia e África (BELTRÁN, 1941, 1943; CASSAMAGNAGHI, 1947; PARAENSE, 1949; ISHIGURO, 1957; AKIBA, 1959; DHANAPALA, 1962; BENNET et al., 1963; MANWELL, 1966; MOHAN & MANWELL, 1966; KRETTLI, 1972; SERRA-FREIRE & MASSARD, 1976, SERRA-FREIRE & MASSARD, 1979, MASSARD & MASSARD, 1981; LOURENÇO DE OLIVEIRA & CASTRO, 1991; VASHIST et al. 2003; SANTOS-PREZOTO et al., 2004; VASHIST, 2006). *Borrelia anserina* é cosmopolita, mas ocorre com maior frequência em zonas tropicais e subtropicais. (MC NEIL et al., 1949).

Há alguns anos o chamado *consumo consciente* tem se tornado cada vez mais comum, e evoca um consumidor que compra produtos que julga serem produzidos sob condições que preservem o meio ambiente e que são pautadas pela responsabilidade social (DEMATTE FILHO et al., 2008). O sistema de criação orgânico, vem suprir esse mercado, com uma série de diferenças, no que diz respeito ao procedimento de criação, dentre eles a ausência de antibióticos e outras drogas na alimentação fornecida às aves, o que as torna suscetíveis às parasitoses. Estima-se que o volume de produção orgânica no Brasil movimentava um mercado de US\$ 200 milhões/ano. A maior parte da produção orgânica brasileira (80%) encontra-se nos estados do Sul e Sudeste. Em torno de 85% da produção é exportada, sobretudo para a Europa, Estados Unidos e Japão. O restante (15%) é distribuído no mercado interno (CANAL RURAL, 2010), portanto estudos a respeito das parasitoses e seus efeitos nas aves hospedeiras são relevantes do ponto de vista biológico, veterinário e econômico, o conhecimento gerado contribui para a elaboração de estratégias de tratamento e controle adequadas ao sistema orgânico de criação avícola.

As infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*, ainda não foram avaliadas de forma conjunta, e estas são passíveis de ocorrer naturalmente em aves. As parasitoses em aves requerem a compreensão do processo patológico que altera as funções bioquímicas do organismo. Os sinais clínicos das doenças em aves são frequentemente sutis, sendo a bioquímica clínica necessária na avaliação das alterações fisiológicas (HOCHLEITHNER, 1994). A avaliação correta do perfil bioquímico associada aos dados de anamnese e exame físico é importante para o diagnóstico da maioria das organopatias (ROSSKOPF & WOERPEL, 1984; HOCHLEITHNER, 1994). Na maioria dos casos, o perfil bioquímico das aves é tomado como uma ferramenta que apenas é usada em trabalhos científicos e poucas vezes se considera como uma técnica diagnóstica útil para a clínica aviária (BOWES et al., 1989), entretanto na clínica aviária, como em outras espécies, os perfis laboratoriais devem

ser considerados como uma ferramenta que contribui ao diagnóstico de uma doença. O veterinário deve fazer uso destes resultados em combinação com o histórico do caso, o exame clínico e as lesões observadas (GONZÁLEZ & SILVA, 2006), tentando sempre fazer um diagnóstico integral.

As proteínas plasmáticas estão agrupadas em duas grandes categorias, albumina e globulinas, as quais tem muitas funções, embora as mais importantes estejam relacionadas com a manutenção da pressão coloidosmótica do plasma, o transporte de substâncias através do corpo (hormônios, minerais), a imunidade, a ação tamponante e a regulação da atividade das enzimas (SWENSON E O'REECE, 1996; BOETTCHER, 2004). A quantificação das proteínas plasmáticas totais ajuda o clínico na avaliação da severidade, natureza e o progresso da enfermidade.

As aves são animais uricotéicos, ou seja, excretam o nitrogênio sob a forma de ácido úrico, como principal produto do metabolismo de N, com perdas de pequenos volumes de água, enquanto que em outras espécies o produto excretado é a uréia (GONZÁLEZ E SILVA, 2006). O ácido úrico é sintetizado no fígado e nos rins, é excretado via secreção tubular em 90%, independente da reabsorção tubular de água, por isto, os distúrbios na função renal podem elevar a concentração do ácido úrico no soro ou no plasma nas aves (LUMEIJ, 1987; KANEKO et al., 1997; SCHMIDT et al., 2007).

A creatinina é eliminada pelos rins em velocidade relativamente constante, através de filtração glomerular e excreção tubular ativa. Sua concentração independe da ingestão de proteínas na alimentação e não é afetada pelo volume urinário. A concentração de creatinina sérica é sensível e específica no estudo da função renal. Valores aumentados indicam problemas de função renal. Geralmente o nível sérico de creatinina é proporcional à severidade da enfermidade.

Este trabalho teve por objetivo verificar se ocorrem alterações no perfil renal de aves de produção *G. gallus* em resposta às infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* isoladamente e em conjunto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para este experimento foram adquiridas 48 aves da raça Cobb, com um dia de idade já previamente vacinadas contra as doenças Pox, Gumboro e Marek. As aves foram transportadas em caixas de papelão desde o estabelecimento comercial onde foram adquiridas até o laboratório para pesquisas parasitológicas W.O. NEITZ da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, onde foram acondicionadas em caixas de amianto (2x1m) com bordas arredondadas forradas com maravalha, cobertas com tela e iluminadas com lâmpada incandescente, durante os primeiros quinze dias de idade. Posteriormente as aves foram colocadas em galpão (5x 5m) previamente limpo e desinfetado com vassoura de fogo. Aos 45 dias de idade as aves foram transferidas para gaiolas suspensas (150x 90cm) para não correr o risco de disseminação das espiroquetas, via feco-oral, entre os grupos experimentais, após as inoculações. As gaiolas foram teladas para que mosquitos e outros artrópodes não picassem as aves. Abaixo das gaiolas foi colocada mistura de capim seco com cal, a cada três dias este material era renovado. Durante todo o experimento as aves foram alimentadas com ração Purina® linha Natural, livre de antibióticos e cocidiostáticos e água “*ad libitum*”. Aos 60 dias de idade as aves foram separadas em quatro grupos com doze aves cada, sendo Grupo 1 – controle (não infectado); Grupo 2 - infectado por *P. juxtannucleare*; Grupo 3 -

infectado por *B. anserina* e Grupo 4 - infectado por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*. As infecções ocorreram conforme o Quadro 1.

Quadro 1 . Grupos experimentais, quantidade e origem dos inóculos e via de infecção do experimento realizado com *Gallus gallus* infectados por *Plasmodium juxtannucleare* e/ou *Borrelia anserina*.

Grupo Experimental	Quantidade e origem do inóculo	Via de infecção
Grupo 1	0,5 ml de soro fisiológico comercial	Intraperitoneal
Grupo 2	0,3 ml de sangue parasitado por <i>P. juxtannucleare</i> proveniente de galo da raça Sedosa do Japão proveniente de criação rústica no município de Seropédica, RJ, com parasitemia em torno de 7%.	Intraperitoneal
Grupo 3	0,5 ml de soro infectado por cepa de <i>B. anserina</i> proveniente do município de Pedro Leopoldo e criopreservada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro	Intraperitoneal
Grupo 4	Inóculo do Grupo 2 + Inóculo do Grupo 3	Intraperitoneal

Semanalmente foram colhidas amostras de sangue, cerca de 2mL de cada ave, por venopunção de veias da perna ou da asa, sem o uso de anticoagulantes (Figura 1) para a realização de análises das proteínas totais, ácido úrico e creatinina. O local da coleta sanguínea foi sempre desinfetado com álcool e utilizada uma agulha e seringa de 5 mL, estéreis, para cada ave. Em aves saudáveis é possível tirar uma quantidade de sangue até 3% de seu peso corporal sem efeito deletério. Quando se trabalha com aves doentes pode-se tirar um máximo de 1% do peso corporal do paciente. Na prática recomenda-se coletar o máximo 1 mL para aves pequenas e máximo 5 mL para aves maiores. Também se deve ter em conta que análises realizadas no plasma requerem maior quantidade de sangue (LUMEIJ, 1997). As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2000 rpm e o soro separado e armazenado em microtubos com 1,5mL de capacidade. As amostras de soro analisadas até 5 dias após a coleta foram refrigeradas, e os soros analisados posteriormente foram congelados a -20°C.

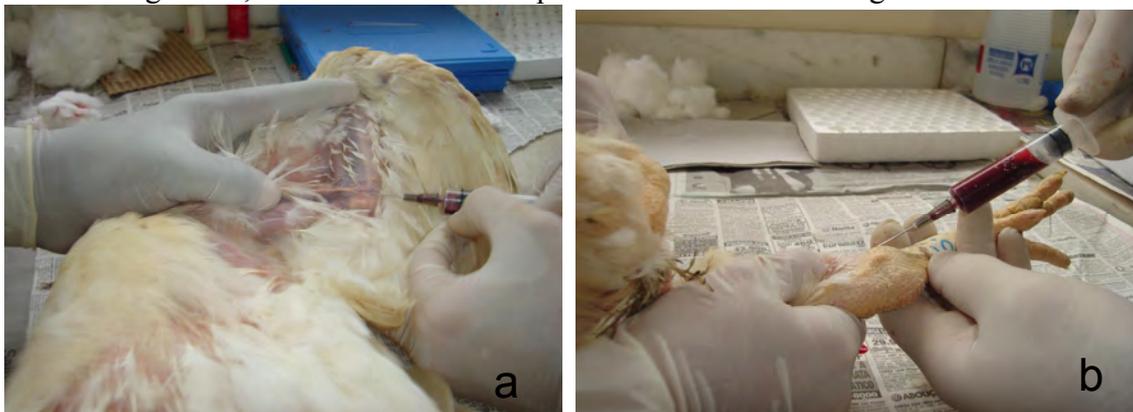


Figura 1. Principais locais para a coleta da amostra de sangue em *Gallus gallus*: (a) veia ulnar ou veia da asa, e (b) veia metatársica medial

Para o estudo dos possíveis tipos de lesões renais decorrentes da infecção causada por *P. juxtannucleare* e *B. anserina*, foram coletados fragmentos do rim de duas aves de cada grupo experimental ao fim do experimento que durou 45 dias. Para isto, as aves foram necropsiadas e os fragmentos renais foram retirados (Figura 2), fixados em formalina 4% por 24h a 4°C e mantidos em etanol 70%.

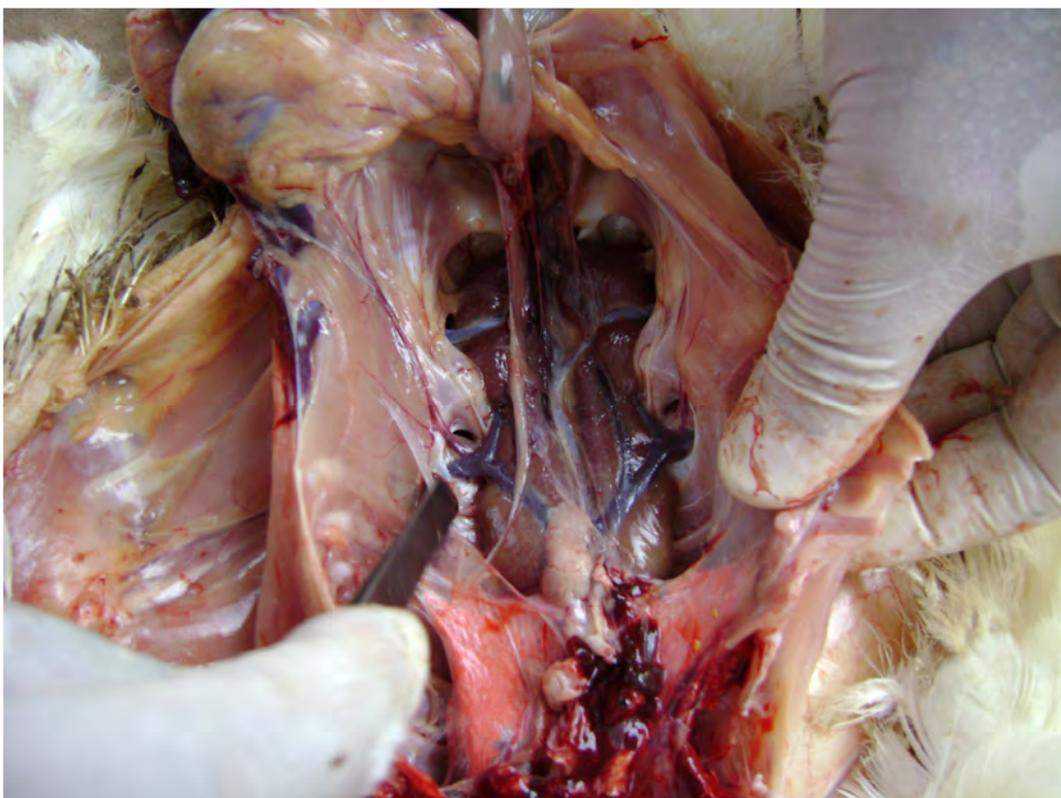


Figura 2. *Gallus gallus* necropsiado com indicação da região renal retirada para as análises histopatológicas.

Estes tecidos foram processados de acordo com técnicas histológicas de rotina, incluídos em parafina, cortados em secções com 5 μ m com uso do micrótomo e montados em lâminas de vidro. As secções foram coradas com hematoxilina-eosina, observadas em microscópio HUND WETZLAR H600 e as imagens do material foram capturadas com uso da câmera digital NIKON COOLPIX 4300.

As concentrações de ácido úrico, creatinina e proteínas mensurados nas aves ao longo das semanas experimentais foram expressos como média total ao fim do experimento e erro padrão da média total ($X \pm SEM$), submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5 % de significância e ao teste de Tukey para comparação de médias.

3. RESULTADOS

As infecções experimentais foram bem sucedidas. Todos os estágios eritrocíticos de *P. juxtannucleare* (trofozoítos, esquizontes e gametócitos) foram observados nos Grupos 2 e 4.

Nos Grupos 3 e 4 foram observadas espiroquetas de *B. anserina*, isoladas e aglomeradas.

As médias totais das concentrações de proteínas dos grupos experimentais constam na (Figura 3), não foi observada diferença significativa entre os Grupos 1, 2 e 3 ($p > 0,05$), mas o Grupo 4 apresentou média total significativamente maior do que as demais ($p < 0,05$).

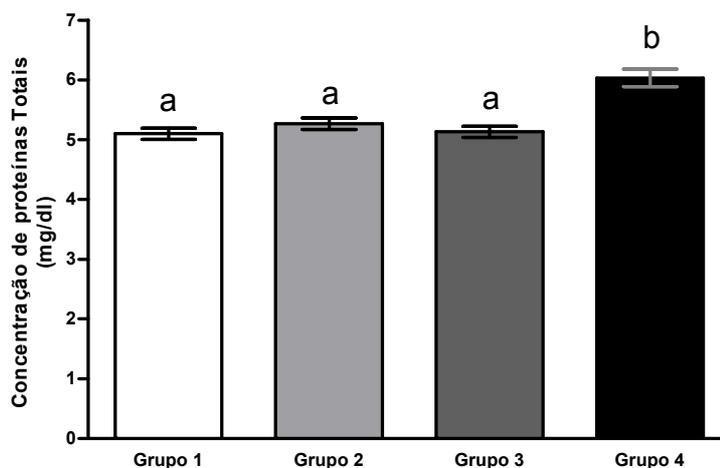


Figura 3. Concentrações médias totais de proteínas dos Grupos experimentais de *Gallus gallus* expressos como média total e erro padrão da média total ($X \pm SEM$). Grupo 1 – controle (não infectado); Grupo 2 - infectado por *Plasmodium juxtannucleare*; Grupo 3 - infectado por *Borrelia anserina*; Grupo 4 - infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina*.

As concentrações médias totais de ácido úrico para cada Grupo estão representadas na Figura 4. Observou-se que a média total da concentração de ácido úrico não variou significativamente entre os Grupos 1,3 e 4 ($p > 0,05$), mas houve um aumento significativo entre a média total do Grupo 2 e os demais Grupos ($p < 0,05$).

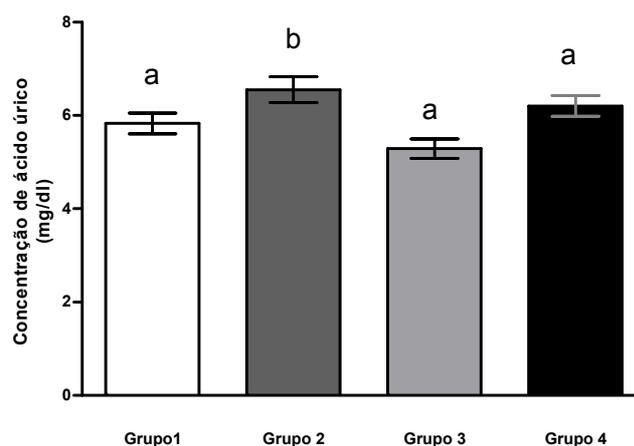


Figura 4. Concentrações médias totais de ácido úrico dos Grupos experimentais de *Gallus gallus*, expressos como média total e erro padrão da média total ($X \pm SEM$). Grupo 1 – controle (não infectado); Grupo 2 - infectado por *Plasmodium juxtannucleare*; Grupo 3 - infectado por *Borrelia anserina*; Grupo 4 - infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina*.

As concentrações médias totais de creatinina nos quatro Grupos estão expressas na Figura 5. Não houve diferença significativa entre os Grupos experimentais.

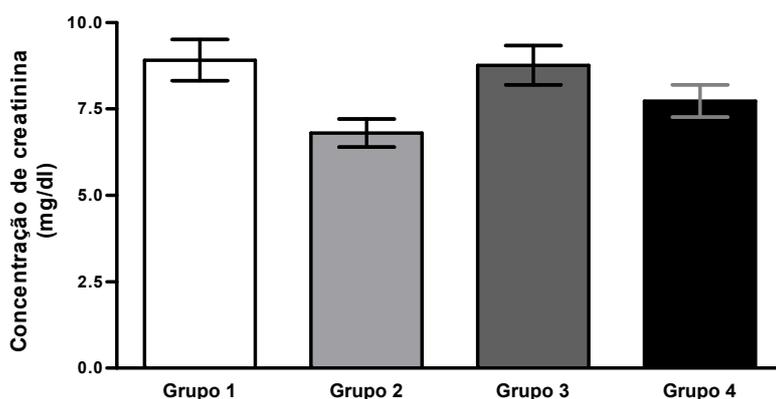


Figura 5. Concentrações médias totais de creatinina para cada Grupo experimental de *Gallus gallus*, expressos como média total e erro padrão da média total ($X \pm SEM$). Grupo 1 – controle (não infectado); Grupo 2 - infectado por *Plasmodium juxtannucleare*; Grupo 3 - infectado por *Borrelia anserina*; Grupo 4 - infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina*.

Nas análises histopatológicas, foi verificado que as secções histológicas renais das aves do Grupo 1 não apresentaram alterações marcantes (Figura 6), as aves do Grupo 2 exibiram infiltrado inflamatório intersticial mononuclear multifocal, autólise nos túbulos contorcidos e alguns glomérulos apresentaram aumento em sua celularidade (Figuras 7 a,b). No Grupo 3 foi observado discreto infiltrado inflamatório mononuclear entre os túbulos coletores que apresentaram em sua luz material de natureza acidófila, os glomérulos apresentaram aumento em sua celularidade, sugerindo uma glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial leve (Figura 8). E no Grupo 4 foi observado discreto infiltrado inflamatório mononuclear intersticial, leve congestão e áreas de hemorragias intersticiais (Figura 9).

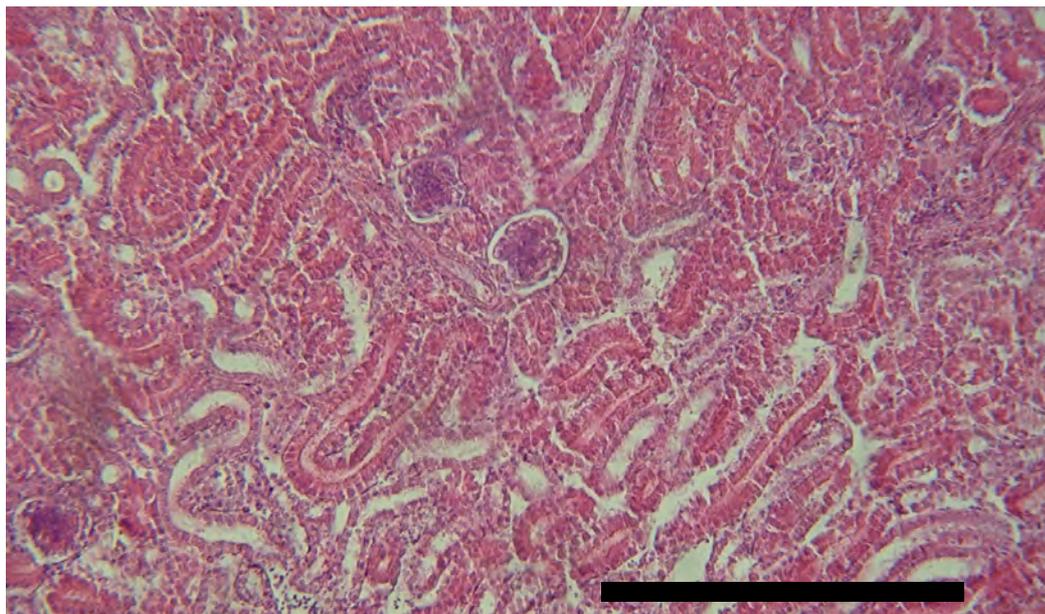


Figura 6. Cortes histológico de rim de *Gallus gallus* do Grupo 1- aves controle não infectadas, tecido normal sem alterações marcantes (barra = 50 μ m).

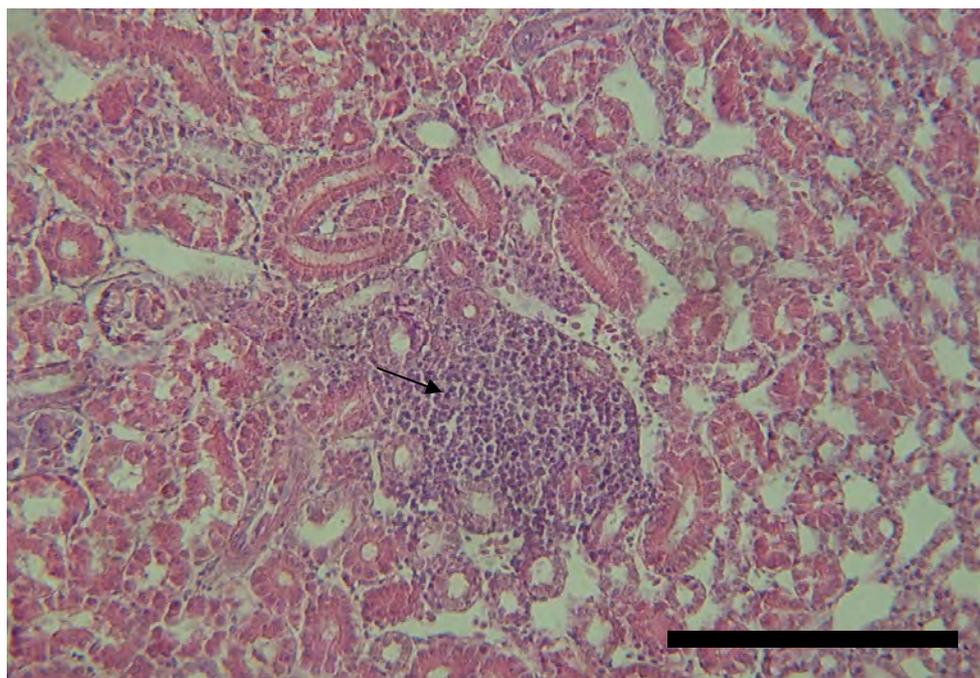


Figura 7. Cortes histológico de rim de *Gallus gallus* do Grupo 2- infectado por *Plasmodium juxtannucleare* exibindo infiltrados inflamatórios (barra = 50 μ m).

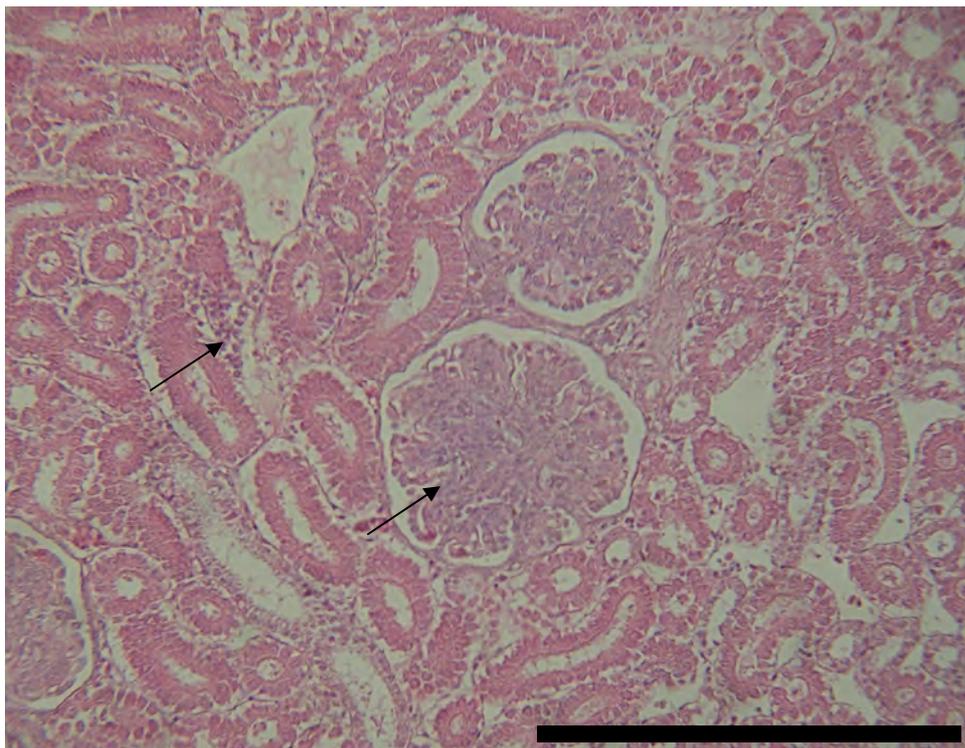


Figura 8. Corte histológico de rim de *Gallus gallus* do Grupo 3- infectado por *B. anserina*, tecido com discreto infiltrado inflamatório e glomerulos com aumento em sua celularidade, sugerindo uma glomerulonefrite proliferativa e nefrite intersticial leve (barra = 50 μ m).

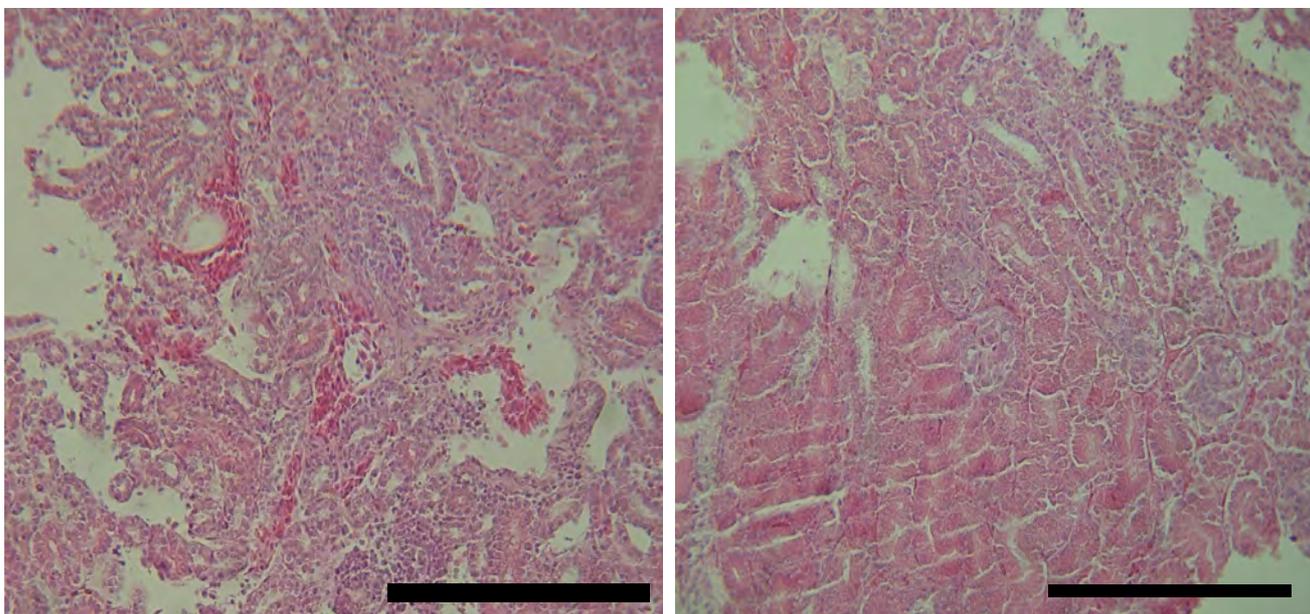


Figura 9. (a) e (b) Corte histológico de rim de *Gallus gallus* do Grupo 4- infectado por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina*, tecido com discreto infiltrado inflamatório mononuclear intersticial, leve congestão e áreas de hemorragias intersticiais (barra = 50 μ m).

4. DISCUSSÃO

O grande desafio na realização de trabalhos de patologia clínica em aves está na escassez de dados na literatura sobre este assunto, pois o senso geral ainda predominante pressupõe que esta ferramenta deveria ser empregada somente para casos relacionados com aves silvestres e animais de companhia, e especialmente para indivíduos e não para populações, o que dificulta a produção de referência para espécies aviárias (LANDINEZ, 2010). Em vista disto, buscou-se neste trabalho avaliar isoladamente todos os parâmetros bioquímicos referentes ao perfil renal das aves para que sirvam de parâmetros de referência, e de forma conjunta para que caracterizem os efeitos das infecções estudadas. Podemos ressaltar que o estudo das infecções parasitárias, envolvendo a busca por parasitos no sangue e tecidos, a avaliação de parâmetros bioquímicos séricos e a histopatologia são mais eficazes no diagnóstico e busca de estratégias de controle das doenças do que a utilização de somente uma destas ferramentas, pois o mesmo parasito pode causar diferentes quadros infecciosos em diferentes espécies aviárias, além disto podem ocorrer interações parasitárias, com quadros clínicos peculiares àquela situação.

A medição das proteínas plasmáticas totais ajuda ao clínico na avaliação da severidade, natureza e o progresso da enfermidade. Em relação às médias totais das concentrações de proteínas foi observado que o Grupo 4 apresentou média superior aos demais e superior ao nível considerado normal para aves saudáveis (LUMEIJ, 1990; LUMEIJ, 1997; KANEKO et al., 1997). De forma geral, os principais fatores que afetam as concentrações das proteínas totais nas aves são: idade, sazonalidade, condições de criação (manejo) e doenças (LUMEIJ, 1997). Elevações nos níveis das proteínas (hiperproteinemia) podem acontecer devido à desidratação ou durante doenças infecciosas que causam estimulação do sistema imunológico e, conseqüentemente, aumento nos níveis de imunoglobulinas (RATCLIFFE, 1996; EVANS & DUNCAN, 2003). Possivelmente, a co-infecção de *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em *G. gallus* do Grupo 4 induziu alterações nos padrões fisiológicos do hospedeiro diferentes daquelas observadas nas infecções individuais e estas modificações metabólicas podem ser decorrentes de uma provável resposta inflamatória de fase aguda provocada pelos parasitos estudados, o que explica uma concentração protéica elevada nestas aves.

A média total da concentração de ácido úrico não variou significativamente entre os Grupos 1, 3 e 4, mas houve diferença significativa entre a média total do Grupo 2 e os demais Grupos, que exibiram médias inferiores. Distúrbios na função renal podem levar ao aumento na concentração sérica ou plasmática do ácido úrico (LUMEIJ, 1997). Os níveis de ácido úrico normais para aves jovens podem ficar entre 1 até 2 mg/dL, enquanto que as aves em postura tem níveis entre 2 até 7 mg/dL. Embora as aves do Grupo 3 e 4 não tenham apresentado alteração significativa da concentração do ácido úrico em relação ao grupo controle deve-se levar em conta que a medição do ácido úrico não é um teste renal sensível em aves, mas sim um teste específico, pois 75% da função renal deve estar comprometida para que seja possível detectar o aumento da concentração sanguínea (LUMEIJ, 1997; SCHMIDT et al., 2007). Apesar dessas limitações, o ácido úrico é útil para monitorar o tratamento e a progressão da doença (GREGORY, 2003; LIERZ, 2003; CAMPBELL, 2004).

As concentrações médias totais de creatinina dos grupos experimentais não variou significativamente, e embora tenha sido realizada a medição da creatinina, esta não tem isoladamente grande valor diagnóstico nas aves porque a creatina é excretada pelos rins antes de ser convertida em creatinina. Assim, o ideal seria dosar as concentrações plasmáticas de creatina para detectar uma diminuição na taxa de filtração glomerular. No entanto, a grande

maioria dos laboratórios veterinários não possuem um método de rotina para a determinação deste metabólito (LIERZ, 2003; CAMPBELL, 2004). Dada a escassez de dados na literatura a respeito dos parâmetros bioquímicos em aves, optou-se neste estudo por avaliar todos os parâmetros relacionados à função renal, facilmente realizáveis em laboratórios de patologia clínica com o intuito de que pudessem servir como referências para a espécie de ave aqui estudada.

Nas análises histopatológicas, verificou-se as infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* isoladas ou em conjunto causaram danos teciduais aos rins das aves, o que pode comprometê-las na produção. Os infiltrados inflamatórios observados nos Grupos 2, 3 e 4, podem estar relacionados à presença dos parasitos desencadeando quadros graves de inflamações renais. É sabido que *Borrelia burgdorferi* causa nefrite, associada a proteinúria, azotemia, cilindrúria, piúria e hematúria; acarretando assim nefropatia severa, onde histologicamente observa-se aumento glomerular, adesão da cápsula de Bowman, proliferação mesangial, fibrose pericapsular, com focos de degeneração e necrose (GRAUER et al., 1988). Pela imunofluorescência do tecido é possível observar a borrelia no interstício renal (BURGESS et al., 1986a, GRAUER et al., 1988). No cão como no homem, pode ocorrer glomerulonefrite com espaçamento glomerular, decorrido da deposição de imunocomplexos (GREENE, 1990; DURAY, 1993). E o *Plasmodium falciparum* causa nefrite e nefrose, além de efeito imunossupressivo na formação de anticorpos (WHO, 2010). Os resultados desta pesquisa apontam que as aves assim, como mamíferos, têm comprometimento da função renal por conta da presença de espécies dos gêneros parasitários *Borrelia* e *Plasmodium*, em seus organismos, de forma isolada em especialmente de forma conjunta.

Por fim, ressalta-se a importância dos estudos de parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de aves domésticas e silvestres para o progresso da medicina veterinária. A realização de estudos que permitam a interpretação adequada das respostas do organismo hospedeiro aos parasitos, isto possibilitará melhora no diagnóstico, na produção e conservação animal.

5. CONCLUSÕES

- As infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* isoladas ou em conjunto causam danos renais às aves, o que pode comprometê-las na produção.
- A interação de ferramentas como anamnese, análise parasitológica, bioquímica clínica e histopatologia no estudo de infecções causadas por *P. juxtannucleare* e *B. anserina* em aves retrata mais fielmente o estado de saúde das aves do que qualquer uma destas isoladamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIBA, K. Studies on avian malaria. On the species of *Plasmodium* from chicken in Japan (*P. japonicum* Ishiguro, 1957 a synonym for *P. juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941). *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 21, p.18, 1959.
- BANDOPADHAY, A. C.; VEGAD, J. L. Enteritis and green diarrhea in experimental avian spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*, v. 37, p. 381–382, 1984.
- BELTRÁN, E. Hallazgo de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Furtado en gallinas de Chiapas. *Revista do Instituto de Salud y Enfermagen Tropical do Mexico*, v.2, p. 353-354, 1941.
- BELTRÁN, E. Características de uma cepa Mexicana (14B) de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Revista do Instituto de Salud y Enfermagen Tropical do Mexico*, v. 4, p. 265-272, 1943.
- BENNETT, G.F.; EYLES, D.E.; WARREN, M.C.; CHEONG, W.H. *Plasmodium juxtannucleare* a newly discovered parasite of domestic fowl in Malasya. *Singapore Medical Journal*, v. 4, p. 172-173, 1963.
- BOETTCHER, A. Valores bioquímicos sanguíneos del cisne de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*, (Molina 1782), en una población silvestre, de Valdivia, Chile. Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. 2004
- BOWES, V; JULIAN, R; STIRTZINGER, T. Comparison of Serum Biochemical Profiles of Male Broilers with Female Broilers and White Leghorn Chickens Can J Vet Res 1989; 53: 7-11.
- BURKE, W; Reprodução das aves. Em Swenson, M; O'Reece, W. Fisiologia dos animais domésticos. Cornell University Press, 1996.
- CAMPBELL, T. Blood biochemistry of lower vertebrates. 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), ACVP and ASVCP (Eds.) Publisher: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton WI, USA. 2004.
- CASSAMAGNAGHI, A. *Malaria en las aves del Uruguay*. 93f. 1947. Montivideo, Faculd Veterinaria. 1947.
- DEMATTÊ FILHO, L.C.; C.M.I MENDES,. Viabilidade técnica e econômica na criação alternativa de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001. p.255-266.

DHANAPALA, S.B.. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. *Revista de Malariologia*, v. 41, p.39-46, 1962.
DURAY, 1993

ELISEI, C. O. 2005 *Morfologia, Morfometria, Biologia Molecular, Filogenia de Plasmodium juxtannucleare e uma nova proposta filogenética dos Gêneros Plasmodium, Haemoproteus e Hepatocystis*. 2005. 105f. (doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

GONZÁLEZ, F; SILVA, S. Introdução à bioquímica clínica veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2a edição. 2006.

GRAUER G.F., BURGESS E.C., COOLEY A.J. & HAGEE J.H. 1988. Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193(2):237-239.

GREENE R.T. 1990. An update on the serodiagnosis of canine Lyme borreliosis. *J. Vet. Intern. Med.* 4:167-171.

GREGORY, C.R. Urinary System. **In:** LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. *Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Pathology*, 4th ed. Blackwell Publishing, p. 231-259, 2003.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. **In:** RITCHIE, B. W.; et al. **Avian Medicine: Principles and Application**. Florida: Wingers Publishing, 1994. Cap. 11. p. 223-245.

ISHIGURO, H. *Plasmodium japonicum*, a new specie of malaria parasite pathogenic for the domestic fowl. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Yamaguti University*, v. 8, p. 723-732, 1957.

KANEKO, J; HARVEY, J; BRUSS, M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed., San Diego, Academic Press, 1997, 932p.

KRETLI, A.U. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.14, p. 235-245, 1972.

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

LISBÔA, R.S.; TEIXEIRA, R.C., RANGEL, C.P; SANTOS, H.A; MASSARD, C.L; FONSECA, A.H. Avian spirochetosis in chickens following experimental transmission of *Borrelia anserina* by *Argas (Persicargas) miniatus*. *Avian Diseases*,v. 53, n.2, p.166-1688, 2006.

LOURENÇO DE OLIVEIRA, R.; CASTRO, F.A. *Culex saltanensis* Dyar, 1928 – Natural vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p. 87-94, 1991LUMEIJ, 1987

LUMEIJ, J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals 5th edition. San Diego, Academic Press, 1997. 932p.

MANWELL, R.D. *Plasmodium japonicum*, *Plasmodium juxtannucleare* and *Plasmodium nucleophilum* in the far east. *Journal of Protozoology*, v.13, p. 8-11. 1966.

MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 3-23, 1981.

MOHAN, R.N.; MANWELL, R.D. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Francolinus sp.*). *Journal of Parasitology*, v. 55, p. 543, 1966.

MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 3-23, 1981.

PARAENSE, W.L. Observações preliminares sobre o ciclo exoeritrocítico do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 47, p. 361-365, 1947.

PARAENSE, W.L. Um inquérito sobre o ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (estado de Minas Gerais). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 47, n. 3-4, p. 361-365, 1949.

RATCLIFFE, M. J. H. Chicken immunoglobulin isotypes and allotypes. In: HERZENBERG, L. A. et al. Handbook of experimental immunology. 5.ed. Cambridge: Blackwell science, 1996. Cap. p.241-247.

ROSENTHAL, K. L. Avian protein disorders. In: FUDGE, A. M. Laboratory medicine:avian and exotic pets. 1.ed. 2000. Cap. 18. p. 171-173.

SA'IDU, L.; AGBEDE, R.I.S.; ABDU, A.P. Prevalence of avian spirochetosis in Zaria. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 50, p. 39-40, 1995.

SANTOS-PREZOTO, H.H.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. *Parasitologia Latino americana*, v. 59, p. 14-20, 2004.

SERRA-FREIRE, N.M.; MASSARD, C.L. Ocorrência e Incidência de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em Belém- Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, Belém. **Anais...** Belém. 1976.

SERRA-FREIRE, N.M.; MASSARD, C.L. *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasito de *Gallus gallus* L. e *Crysolophus spp* na região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, v. 20, p.45-48, 1979.

SCHMIDT, E; LOCATELLI -DITTRICH, R; SANTIN, E; PAULILLO, A. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. Archives of Veterinary Science, v 12, n.3. 2007. p.9-20.

SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; SOUZA, P.C.A. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Parasitologia al dia*, v. 23, p. 87-90, 1999.

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

SWENSON, M; O'REECE, W. DUKES. Fisiologia dos animais domésticos. Cornell University Press. 1996.

VASHIST, U. ; SILVEIRA, P. ; CABRAL, A. ; AMARAL, K. B. ; SOARES, G. L. G. ; DAGOSTO, M. . Atividade malaricida da quercetina em *Gallus gallus* L. 1758 imunossuprimidos infectados por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani & Gomes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 220-223, 2008.

VASHIST, U. ; CARVALHAES, R. ; D' AGOSTO, M. ; DA SILVA, A. D. Antimalarial Activity of the Novel Quinoline/6-Thiopurine Conjugate in Linnaeus, Infected Experimentally by *Plasmodium juxtannucleare* in *Gallus gallus*. *Chemical Biology & Drug Design* , v. 74, p. 434-437, 2009.

VERSIANI, V.; GOMES, B.F. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* (nota prévia). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 1, p. 231-233, 1941.

VASHIST, U. ; FALQUETO, A. ; LUSTRINO, D. ; TUNHOLI, V. M. ; TUNHOLI-ALVES, V. ; SANTOS, M.A.J. ; D'AGOSTO, M. ; MASSARD, C. L. ; PINHEIRO, J. . Hepatic profile of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Veterinary Parasitology (Print)*, 2010.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIBA, K. Studies on avian malaria. On the species of *Plasmodium* from chicken in Japan (*P. japonicum* Ishiguro, 1957 a synonym for *P. juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941). *Japanese Journal of Veterinary Science*, v. 21, p.18, 1959.
- AL DABAGH, M. A. Syntomatic partial paralysis in chicks with *Plasmodium juxtannucleare*. *Journal of comparative Pathology*, v.71, p. 217-221, 1961.
- AMARAL, K. B. *Atividade anti-malária da cloroquina e dos flavonóides quercetina e rutina em indivíduos jovens de Gallus gallus Linnaeus, 1758 infectados experimentalmente com Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa, Plasmodiidae)*. 2005. 67 f. Dissertação (mestrado em Biologia e Comportamento Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 2005.
- APPEL, M.J.G.; ALLAN,S.; JACOBSON, R.H.; LAUDERLANE, T.L.; CHANG, Y.F.; SHIN, S.J.; THOMFORD,J.W.; TODHUNTER,R.J.; SUMMERS,B.A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 167, p. 651-664, 1993.
- ARAGÃO, H.B. Soroterapia e vacinação na espiroquetose das galinhas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.3, p. 3–39, 1911.
- ATALIBA, A.C.; RESENDE, J.S.; YOSHINARI, N.; LABRUNA, M.B. Isolation and molecular characterization of a Brazilian strain of *Borrelia anserina*, the agent of fowl spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*, v. 83, n.2, p.145-149, 2007.
- AUSTIN, F.E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbondioxide in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 391, p. 1103-1110, 1993.
- AVISITE. Antibióticos: proibição por precaução. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/noticias/default.asp?CodNoticia=2023>. Acesso em: 25 de jun. 2010.
- BAGER, F.; EMBORG H.D. **Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animal, food and humans in Denmark**. Copenhagen: STATENS SERUM INSTITUTE, 2001. p.1600-2032.
- BANDOPADHAY, A. C.; VEGAD, J. L. Enteritis and green diarrhea in experimental avian spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*, v. 37, p. 381–382, 1984.
- BARBOUR, A.G.; HAYES, S.F. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, v. 50, n.4, p.381-400, 1986.
- BARRETO, M.P. Malária aviária: III. Sobre o encontro das formas exoeritrocíticas do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Hospital*, v. 24, p. 643-645, 1943.
- BELTRÁN, E. Hallazgo de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Furtado en gallinas de Chiapas. *Revista do Instituto de Salud y Enfermagen Tropical do Mexico*, v.2, p. 353-354, 1941.

BELTRÁN, E. Características de uma cepa Mexicana (14B) de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Revista do Instituto de Salud y Enfermagen Tropical do Mexico*, v. 4, p. 265-272, 1943.

BENNETT, G.F.; EYLES, D.E.; WARREN, M.C.; CHEONG, W.H. *Plasmodium juxtannucleare* a newly discovered parasite of domestic fowl in Malasya. *Singapore Medical Journal*, v. 4, p. 172-173, 1963.

BENNET, F.G.; WARREN, M.; CHEONG, W.H. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiane & Gomes, 1941. II. The sporogonic stages in *Culex (culex) sitiens* Wiedmann. *Journal of Parasitology*, v. 52, p. 647-652. 1966.

BENNET, G.F. & WARREN, W. Biology of the Malaysian strain of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. III. Life cycle of the erythrocytic parasite in the avian host. *Journal of Parasitology*, v.52, n.3, p. 653-659, 1966b.

BENNET, G.F. Gallinaceos species of *Plasmodium*. *Journal of Parasitology*, v. 56, p. 27 (section II),1970.

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

BERGER, S.A.; DAVID, L. Pseudo Borreliosis in Patientes with Malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n.1, p. 207-209, 2005.

BIDE, R. W. Changes in the plasma alkaline phosphatase in **avian** erythroblastosis. *Avian Diseases*, v. 16, p. 421-427, 1972.

BIER, O. Microbiologia e Imunologia. 24 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.

BISHOP, A.; BIRKETT, B.; GILCHRIST, B.M. The response of blood-inoculated and sporozoite-induced infections of *Plasmodium relictum* to drugs. *Parasitology*, v. 38, p. 163-172, 1947.

BOERO, J.J. 1967. Parasitosis Animales. Buenos Aires: Universidade de Buenos Aires, 1967. 498p.

BORNSTEIN, S.; SAMBERG, Y. Therapeutic use of penicillin tablets against avian spirochaetosis. *Refuah Veterinarith*, v.11, p. 52-55, 1954.

BRUMPT E. Précis de parasitologie, *Collection de Précis Médicaux*. Em: SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, n.1, p. 1-19, 2000.

BUTLER, E.J. Plasma proteins. In BELL, D.J.; FEEMAN B.M. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, London: Academic Press, 1971. p. 933-961

BUTOLO, J.E. Produção de frangos alternativos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, Cascavel, 2003. Anais... Cascavel: CBNA, 2003. p. 75-82.

CAB International, 2002. *Borrelia anserina* [original text by M.B. Labruna]. Animal Health and Production Compendium, Wallingford, UK. CAB International (CD Rom).

CASSAMAGNAGHI, A. *Malaria en las aves del Uruguay*. 93f. 1947. Montivideo, Faculd Veterinaria. 1947.

COX, F.E.G. The evolutionary expansion of the Sporozoa. *International Journal of Parasitology*, v. 24, p. 1301-1316, 1994.

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

DEMATTE FILHO, L.C.; C.M.I MENDES,. Viabilidade técnica e econômica na criação alternativa de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001. p.255-266.

DHANAPALA, S.B.. The occurrence of *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 in domestic fows in Ceylon. *Revista de Malariologia*, v. 41, p.39-46, 1962.

DHAWEDKAR, R.G.; DHANESAR, N.S. Preservation of *Borrelia anserina* by liquid nitrogen refrigeration. *Indian Journal of Animal Science*, v. 53, p. 1124–1127, 1983.

DIAB, F.M.; SOLIMAN, Z.R. An experimental study of *Borrelia anserina* in four species of *Argas* ticks. 1. Spirochete localization and densities. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 53, p.201–212, 1977.

DICKIE, C.W.; BARREIRA, J.A. A study of the carrier state of avian spirochetosis in the chicken. *Avian Diseases*, v.8, n. 2, p. 191-195, 1964.

DISSANAIKE, A.S. On some blood parasites of wild animals in Ceylon. *Ceylon Veterinary*, 14, p. 29-37, 1963.

EL-DARDIRY, A. H. Studies on avian spirochaetosis in Egypt. *Science Service Bulletin*, v. 243, p.1-78, 1945.

ELISEI, C.O. *Criopreservação e caracterizações morfológica, morfométrica e ultra-estrutural de Plasmodium (Novyella) juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae)*. 2001. 64f. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2001.

ELISEI, C. O. 2005 *Morfologia, Morfometria, Biologia Molecular, Filogenia de Plasmodium juxtannucleare e uma nova proposta filogenética dos Gêneros Plasmodium, Haemoproteus e Hepatocystis*. 2005. 105f. (doutorado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

FALQUETO, A.; VASHIST, U.; PERINOTO, W.; NERY, C.V.C.; MASSARD, C.L. Registro de *Plasmodium* sp. em *Spheniscus magellanicus* no Zoológico do Rio de Janeiro (RIO-ZOO) e caracterização morfológica e morfométrica de gametócitos. (Submetido ao CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2010)

FELDMAN, R.A.; FREED, L.A.; CANN, R.L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology*, v. 4, p. 663- 673, 1995.

FERRAZ-FRANCO, H.; VAITSMÁN, J. ; MOUTSSATCHÉ, I. Hemoparasitos em aves domésticas. Observações em matadouro do Distrito Federal. *Revista Militar de remonta e veterinária*, v. 10, p.154-158, 1954.

GARNHAM, P. C.C. *Malaria parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Science Publication. Oxford. 1966. 1114p.

GINAWI, A.; SHOMMEIN, A.M. Preservation of *B. anserina* at different temperatures. *Bulletin of Animal Health Production*, v. 28, p. 221-223, 1980.

GORRIE, C.J.R. Vaccination against spirochetosis in fowls. *Australian Veterinary Journal*, v. 26, p. 308–315, 1950.

GRIM, K.C.; van der MERWE, E.; SULLIVAN, M. B.A.; PARSONS, N.; Mc CUTCHAN, T.F.; CRANFIELD, M. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguin (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.34, n. 3, p. 250-253, 2003.

HEILMAN, F. R. Streptomycin in the treatment of relapsing fever and leptospirosis icterhemorrhagica. *Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic*, v.20,p. 169-176, 1945.

HOFSTAD, M.S. *Diseases of poultry* (7th ed.). Iowa State University Press, Ames IA, 1978.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams &Wilkins, 1994, 787p.

HOOGSTRAAL, H. Ticks and spirochetes. *Acta Tropica* , v.36, p. 133-136, 1979.

HOOGSTRAAL H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology*, v. 24, p.135-238, 1985.

HSIANG, C.M.; PACKCHANIAN, A. A. Comparison of eleven antibiotics in the treatment of *Borrelia anserine* infection (Spirochetosis) in young chicks. *Texas Reports on Biology & Medicine*, v. 9, n. 1, p. 34-45, 1951.

HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNINGER, R. *Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos*. Vol.1. Editorial Labor, S.A., 1947, 739p.

ISHIGURO, H. *Plasmodium japonicum*, a new specie of malaria parasite pathogenic for the domestic fowl. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Yamaguti University*, v. 8, p. 723-732, 1957.

ITAGAKI, K. An avian malaria in Japan. *Journal of Parasitology*, v.56, p.164, 1970.

KLASLOW, D.C.; SYIN,C.; McCUTCHAN, T.F.; MILLER, H.L. Comparison of the structure of the 25 kDa ookinete surface antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. gallinaceum* reveal six conserved regions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.33, p.283-288.

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

KRETLI, A.U. *Plasmodium juxtannucleare* in the state of Minas Gerais, Brazil. Studies on its prevalence and some aspects of its biology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.14, p. 235-245, 1972.

KRETLI, A.U; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96 n. 8, p. 1033-1042. 2001.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol.1. 8 th Edition, Willians & Wilkins, London, p. 57-62. 1984.

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C; RESCLLLLC, J.S; FERNANDES, A.A.; MARTINS, N.R.S. Falha na transmissão de *Borrelia anserina* pelo *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 49, n. 4, p 499-503, 1997.

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

LEVADITI, C.; LANGE, F. La spirillose du lapin. Mecanisme de la crise. *Compt. rend. soc. biol.*, v. 58, p. 843-845. 1905.

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

LISBÔA, R.S. *Estudo da Transmissão Experimental de borrelia anserina Sakharoff, 1891 por Argas (Persicargas) miniatus Koch, 1844 e avaliação comparativa de parâmetros clínicos e hematológicos em Gallus gallus Linnaeus, 1758*. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Instituto de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2006.

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

LOURENÇO DE OLIVEIRA, R.; CASTRO, F.A. *Culex saltanensis* Dyar, 1928 – Natural vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p. 87-94, 1991.

MANWELL, R.D. *Plasmodium japonicum*, *Plasmodium juxtannucleare* and *Plasmodium nucleophilum* in the far east. *Journal of Protozoology*, v.13, p. 8-11. 1966.

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

MASSARD C.L.; LOPES, C.W.G.; CUNHA, D.W.; MASSARD, C.A. The occurrence of an intraerythrocytic microorganism *Neitzella rezendei* gen. nov. sp. nov. (Microtatobiotetes, Rickettsiales) of poultry in Brazil. *Acta Tropica*, v. 33, n. 1, p. 3-14, 1976.

MASSARD C L. *Significância das infecções causadas por Plasmodium (Novyella) juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 (Haemosporidida: Plasmodiidae) em Gallus gallus de criação industrial no Estado do Rio de Janeiro*. 1979. 57f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 1979.

MASSARD, C.L.; MASSARD, C.A. Aspectos biológicos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941 em aves no Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, n. 3, p. 3-23, 1981.

MASSARD, C.L. Caracterização do Parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidida: Plasmodiidae) em criações de *Gallus gallus* da raça Leghorn Branca. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 5, p. 141-146, 1982.

MC CUTCHAN, T.F.; KISSINGER,J.; TOURAY, M.G.; ROGERS, M.J.; SULLIVAN, J.L.M.; BRAGA, M.E.; KRETTLI, A.U.; MILLER, L.H. comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarías: Biological and phylogenetic implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 93, p. 11889-11894, 1996.

MC GHEE, R.B.; WERNSDORFER, W.H.; GREGOR, MC.I. Major animal models in malaria research. *Avian Malaria: Principles and Practice of Malariology*, v. 2, p. 1545-1567, 1988.

Mc MULLIN, P. Produção avícola sem antibióticos: riscos potenciais de contaminação cruzada e detecção de resíduos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, 2004. *Anais...* Campinas: FACTA, 2004. p.219-226.

MC NEIL, E., HINSHAW, W.R., KISSLING, R.E. A study of *Borrelia anserina* infection (Spirochetosis) in turkeys. *Journal of Bacteriology*, v.57, p. 191-206, 1949.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotic. *Pig Progress*, v.16, p.18-21, 2000.

MIRON, D.; OLSHINSKY, A.; ASSY, N.; ZUKER, M.; EFRAT, M.; HUSSEIN, O. *Plasmodium* and *Borrelia* co-infection. *Journal of Travel Medicine*, v.11, n. 2, p. 115- 116, 2004.

MOHAN, R.N.; MANWELL, R.D. *Plasmodium juxtannucleare* in African partridges (*Francolinus sp*). *Journal of Parasitology*, v. 55, p. 543, 1969.

MOTA, R.A. *Variáveis hematológicas em Gallus gallus domesticus, Linnaeus, 1758, de criações rústicas da região metropolitana do Recife, naturalmente infectadas com Plasmodium juxtannucleare (Versiani & Gomes, 1941)*. 1997. 58 f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1997.

MOTA, R.A.; CUNHA, E.L.P.; MODESTO, G.W.F.; SOARES, O.C.O.; MASSARD, C.L. *Plasmodium juxtannucleare* (Versiani & Gomes, 1941) em galinhas (*Gallus gallus* L. 1758) de criações rústicas no estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 7, n. 3, p. 178-190, 2000.

NCBI. National Center for Biotechnology Information: banco de dados. Disponível em: <http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=138>. Acesso em: 24 de Agosto de 2010.

NILES, W. J.; KULASIRI, C. S. A note on the vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Ceylon. *Ceylon Journal Medical Sciences*, v. 16, p. 26–27. 1967.

NOBREGA, P.; REIS, J. Produção de vacina contra a espiroquetose aviária em ovos embrionados. *Arquivos do Instituto de Biologia de São Paulo*, v.12, p. 87-92, 1941.

NOPPA, L.; BURMAN, N.; SADZIENE, A.; BARBOUR, A.G.; BERGSTROM, S. Expression of the flagellin gene in *Borrelia* is controlled by an alternative sigma factor. *Microbiology*, v. 141, p. 85–93, 1995.

PARAENSE, W. L. Infecção experimental do *Culex quinquefasciatus* pelo *Plasmodium juxtannucleare*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 41, n. 3, p. 535-540, 1944.

PARAENSE, W.L. Observações preliminares sobre o ciclo exoeritrocítico do *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 47, p. 361-365, 1947.

PARAENSE, W.L. Um inquérito sobre o ocorrência de *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (estado de Minas Gerais). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 47, n. 3-4, p. 361-365, 1949.

PEREIRA, P.C.M; MEIRA M.A; CURI, P.R., SOUZA, N; BURINI, R.C. The malarial impact on the nutritional status of Amazonian adult subjects. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 37, n. 1, p. 19-24, 1995.

PÊSSOA, S.B. *Parasitologia Médica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1963. 849p.

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

PIERCE, M.A.; BENNET, G.F. A revised key to the avian subgenera of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa). *Systematic Parasitology*, v. 33, p. 31-32. 1996.

PORTER, E. Jr. Bacterial Enteritides of Poultry. *Poultry Science*, v. 77, p.1159–1165, 1998.

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

RIVETZ, B.; BOGIN, E.; HORNSTEIN, K.; MERDINGER, M. Biochemical changes in chicken serum during infection with strains of Newcastle disease virus of differing virulence. 1: Enzyme study. *Avian Pathology*, v. 4, p. 189-197. 1975

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

RUBINA, M.; BRAVERMAN, Y.; MALKINSON, M. On the possible transmission of *Borrelia anserina* (Sakharoff 1891) by mosquitoes. *Refuah Veterinarith*, v.32, p.16-17, 1975.

SA'IDU, L.; AGBEDE, R.I.S.; ABDU, A.P. Prevalence of avian spirochetosis in Zaria. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 50, p. 39–40, 1995.

SAKHAROFF, M.N. *Spirochaeta anserina* et la septicémie des oies. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 5, p.564-566. 1891.

SAMBRI, V.; MARANGONI, A.; OLMO, A.; STORNI, E.; MONTAGNANI, M.; FABRI, M.; CEVENINI, R. Specific antibodies reactive with the 22-Kilodalton major outer surface protein of *Borrelia anserina* Ni-NL protect chicks from infection. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 2633–2637, 1999.

SANTOS-PREZOTO, H.H.; D'AGOSTO, M.; DAEMON, E. Prevalência e variação dos estádios eritrocíticos do *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* sob condições naturais, no período de um ano. *Parasitologia Latino americana*, v. 59, p. 14-20, 2004.

SERRA-FREIRE, N.M.; MASSARD, C.L. Ocorrência e Incidência de *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, em Belém- Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, Belém. **Anais...** Belém. 1976.

SERRA-FREIRE, N.M.; MASSARD, C.L. *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941, parasito de *Gallus gallus* L. e *Crysolophus spp* na região do Pantanal do Estado do Mato Grosso do Sul. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, v. 20, p.45-48, 1979.

SILVA, M.C.M; SANTOS, E.B; COSTA, E.G; FILHO, M.G.S; GUERREIRO, J.F; PÓVOA, M.M. Alterações clínico-laboratoriais em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase tratados com 0,50mg/kg/dia de primaquina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, p. 215-217. 2004.

SHOMMEIN, A.M; KHOGALI, A. Fowl spirochaetosis. Haematological and histopathological studies. *Bulletin of epizootic diseases of Africa*, v.22, p. 255-261, 1974.

SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H.; SOUZA, P.C.A. Esquizogonia exoeritrocítica plasmática em *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Apicomplexa: Plasmodiidae). *Parasitologia al dia*, v. 23, p. 87-90, 1999.

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

SONI, J.L., JOSHI, A.G.A note on strain variation in Akola and Jabalpur strains of *Borrelia anserina*. *Zentralblatt fur Veterinar*, v. 27, p. 70–72, 1980.

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

VALKIUNAS, G. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p. 2005.

VASHIST, U.; SILVEIRA, P.; D'AGOSTO, M. *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* em *Gallus gallus* no município de Juiz de Fora, MG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.1, p. 244, 2003.

VASHIST, U. ; SILVEIRA, P. ; CABRAL, A. ; AMARAL, K. B. ; SOARES, G. L. G. ; D'AGOSTO, M. . Atividade malaricida da quercetina em *Gallus gallus* L. 1758 imunossuprimidos infectados por *Plasmodium (Bennettinia) juxtannucleare* Versiani & Gomes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, p. 220-223, 2008.

VASHIST, U. ; CARVALHAES, R. ; D' AGOSTO, M. ; DA SILVA, A. D. Antimalarial Activity of the Novel Quinoline/6-Thiopurine Conjugate in Linnaeus, Infected Experimentally by *Plasmodium juxtannucleare* in *Gallus gallus*. *Chemical Biology & Drug Design* , v. 74, p. 434-437, 2009.

VASHIST, U. 2010.

VERSIANI, V.; GOMES, B.F. Sobre um novo hematozoário de galinha, *Plasmodium juxtannucleare* (nota prévia). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 1, p. 231-233, 1941.

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

WALTERS, A.P.; HIGGINS, D.G.; McCUTCHAN, T.F. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences the USA*, v. 88, p. 3140-3144, 1991.

WELLDLE, B. T.; JOHNSON, A.J.; WILLIAMS, J.S.; SADUN, E.H. Experimental Infection with *Plasmodium Falciparum* in Aotus Monkeys. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 21, n.3, p. 260-271, 1972.

WENDY, M.; GROSS, M.A.; MERIDIAN R.; BALL, S.D. Use of fluorescein-labeled antibody to study *Borrelia anserina* infection (Avian Spirochetosis) in the chicken. *American Journal of Veterinary Research*, v. 25, p. 1734-1738, 1964.

ZAHER M.A.; SOLIMAN Z.R.; DIAB, F.M. An experimental study of *Borrelia anserina* in four species of *Argas* ticks. 2. Transtadial survival and transovarial transmission. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v.3, p.213-223, 1977.

ANEXO I

Artigo intitulado “**Hepatic profile of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Plasmodium juxtannucleare* Versiani & Gomes, 1941**” na revista *Veterinary Parasitology*.

ANEXO II

Resumos publicados em Anais de Congressos referentes ao tema desta tese:

1. FALQUETO, A.; VASHIST, U.; MASSARD, C. L. Estudo comparativo das infecções causadas por *Plasmodium (Novyella) juxtannucleare* (Haemosporida, Plasmodiidae) em *Gallus*

gallus (Aves, Galliformes) e em outras aves de importância econômica. In: XXVIII Jornada de Iniciação Científica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008, Seropédica, RJ.

2. FALQUETO, A. ; VASHIST, U. ; Lisbôa, R. S.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI-ALVES, V. TUNHOLI, V. M.; PINHEIRO, J.; MASSARD, C. L. Atividade da Aspartato Aminotransferase (AST) em *Gallus gallus* infectados por *Borrelia anserina*. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande -MS.

3. VILELA, J.A.R.; VASHIST, U.; FALQUETO, A.; LISBÔA, R. S.; SANTOS, M.A.J.; NASCIMENTO, A.A.; MASSARD, C. L.; PINHEIRO, J. Aspectos histológicos renais de aves de produção experimentalmente infectadas por *Plasmodium juxtannucleare* e *Borrelia anserina*. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande-MS.

4. FALQUETO, A.; VASHIST, U.; LISBÔA, R. S.; MASSARD, C. L. Estudo hemoparasitológico em aves domésticas do município de Seropédica, RJ. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande- MS.

5. PIRES, M. S.; VASHIST, U.; FALQUETO, A.; FRANQUE, M. P.; LUSTRINO, D.; TUNHOLI, V. M.; TUNHOLI-ALVES, V.; NASCIMENTO, A.A.; SANTOS, M.A.J.; MASSARD, C. L.; PINHEIRO, J. Histopatologia hepática de aves de produção experimentalmente infectadas por *Plasmodium juxtannucleare*. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010, Campo Grande- MS.

6. VASHIST, U.; LISBÔA, R. S.; SANTOS, H. A.; TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; ALVES, V. M. T.; SILVA, J. P.; FALQUETO, A.; MASSARD, C. L. Atividade da TGP sérica na infecção causada por *Plasmodium juxtannucleare* em *Gallus gallus*. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu.

7. VASHIST, U.; SANTOS, H. A.; LISBÔA, R. S.; FALQUETO, A.; ALVES, V. M. T.; TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; MASSARD, C. L.; SILVA, J. P. Atividade da TGO sérica em *Gallus gallus* infectados por *Plasmodium juxtannucleare*. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu.

8. VASHIST, U.; LISBÔA, R. S.; SANTOS, H. A.; ALVES, V. M. T.; TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; FALQUETO, A.; MASSARD, C. L.; SILVA, J. P. Perfil protéico sérico da co-infecção por *Plasmodium juxtannucleare*. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu.

9. FALQUETO, A.; VASHIST, U.; ALVES, V. M. T.; TUNHOLI, V. M.; LUSTRINO, D.; SILVA, J. P.; MASSARD, C. L. Paralisia de membros em *Gallus gallus* com baixa parasitemia de *Plasmodium juxtannucleare*. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu.

10. FALQUETO, A.; VASHIST, U.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L. Estudo comparativo das infecções causadas por *Plasmodium juxtannucleare* em *Gallus gallus* e em *Coturnix coturnix*. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu.

11. FALQUETO, A.; VASHIST, U.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L. Infecção por *Plasmodium juxtannucleare* em patos. In: XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia e II Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2009, Foz do Iguaçu.
12. FALQUETO, A.; VASHIST, U.; MASSARD, C. L. *Plasmodium juxtannucleare* em Galinhas caipiras criadas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. In: XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2008, Curitiba, PR.
13. FALQUETO, A.; VASHIST, U.; SANTOS, H. A.; SANTOS, T. M.; RIBEIRO, B.; MASSARD, C. L. *Plasmodium juxtannucleare* em *Gallus gallus* do município de Venda Nova do Imigrante, ES. In: XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2008, Curitiba, RJ.
14. VASHIST, U.; FALQUETO, A.; ABDALLAH, V. D.; AZEVEDO, R. K.; SANTOS, T. M.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L. Caracterização Morfológica e Morfométrica de Formas Evolutivas Eritrocíticas de *Plasmodium juxtannucleare* encontrados em galinhas Sedosa do Japão. In: XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2008, Curitiba, PR.
15. VASHIST, U.; FALQUETO, A.; SANTOS, H. A.; SANTOS, T. M.; MASSARD, C. L. *Plasmodium juxtannucleare* em Galinhas da Raça Sedosa do Japão criadas no município de Seropédica, RJ. In: XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2008, Curitiba, PR.