

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

DISSERTAÇÃO

**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**

Raquel Silva Lisbôa

2006



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

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

RAQUEL SILVA LISBÔA

Sob a Orientação do Professor
Aivaldo Henrique da Fonseca

e Co-orientação do Professor
Carlos Luiz Massard

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2006

636.508969 6 Lisbôa, Raquel Silva, 1979-
L769e 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 / Raquel
Silva Lisbôa. - 2006.
63f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da
Fonseca.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f.46-50.

1. Ave doméstica - Parasito -
Teses. 2. Ave doméstica - Doenças -
Teses. 3. Carrapato como
transmissor de doenças - Teses. 4.
Borrelia - Teses. I. Fonseca,
Adivaldo Henrique da, 1953- II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Instituto de
Veterinária. III. Título.

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

RAQUEL SILVA LISBÔA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2006.



**Aivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D.) UFRRJ
(Orientador)**



Flávio Ribeiro de Araújo (Ph.D.) EMBRAPA - Gado de Corte



Carlos Henrique Machado (Ph.D.) UFRRJ

Dedico essa dissertação aos meus amados pais Anquises Ferreira Lisbôa e Maria Silvana Silva Lisbôa, irmãos, Dalila e Douglas pelo amor e apoio incondicionais. Agradeço em especial à tia Miriam pelo carinho e valiosa ajuda no início da minha caminhada, aos meus tios Eneida e Luiz, e a todos os meus demais familiares que mesmo tão distantes me incentivaram sempre. Obrigada a todos pelo carinho e compreensão necessários para o cumprimento desta etapa. Amo muito todos Vocês!!!

“ Se quiseres construir um navio, não reúna pessoas para elaborar planos, distribuir tarefas, buscar ferramentas, cortar madeira, mas desperta nelas o desejo de buscar a amplidão dos mares. Então construirão o navio por si”.

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente nos iluminando e amparando com o seu amor.

Ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca pelo acolhimento, orientação, ensinamentos, incentivos e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Luiz Massard pela co-orientação, pela disponibilidade do seu laboratório e confiança, mostrando-se sempre atencioso e disponível.

Ao Professor Dr. Romário Cerqueira Leite da Universidade Federal de Minas Gerais pela doação da cepa utilizado neste estudo.

Ao Pesquisador Dr. Cleber Oliveira Soares da Embrapa Gado de Corte pela valiosa ajuda e ensinamentos durante o delineamento deste trabalho.

À Pesquisadora Dra. Carina Elisei de Oliveira da Embrapa Gado de Corte pela amizade e ensinamentos desde minha iniciação à pesquisa durante a graduação.

Ao Professor Dr. Carlos Henrique Machado, pelo auxílio, disponibilidade e ensinamentos.

À Professora Dra. Cristina Amorim Ribeiro de Lima pelos ensinamentos, confiança e valiosa ajuda na formulação das rações utilizadas neste trabalho.

Ao Médico Veterinário Dr. Anderson Monteiro pelos ensinamentos, amizade e disponibilidade de tempo.

À Embrapa Agrobiologia – Seropédica/RJ, em especial ao técnico Geraldo Cruz Baeta, pela disponibilidade dos equipamentos e pelo auxílio durante a realização de algumas fotos que ilustram este trabalho.

Ao Professor Dr. Paulo César Augusto de Souza pela amizade e orientação, durante a graduação.

Aos funcionários da Estação Experimental Parasitológica W. O. NEITZ, em especial Gilmar e Arcanjo, pelo auxílio na reforma e organização do galpão.

Aos funcionários da Fábrica de Ração Luiz e Fernando, pela ajuda e dedicação no preparo das rações.

Aos colegas Huarrisson Azevedo Santos, Leonardo, Marlone Coelho, Julio Tajiri e Jenevaldo Barbosa da Silva pela dedicação e carinho com os animais estudados.

Aos técnicos Antônio Carlos Valentin Neves, Ananias C. Francisco e Hermenegilda Mariano do Laboratório de Patologia Clínica do Instituto de Veterinária da UFRRJ pela valiosa ajuda no preparo das soluções para a confecção dos hemogramas, muito obrigada!

Aos técnicos Ivan Serafim da Silva e José Maurício Mattos de Souza do Departamento de Parasitologia da UFRRJ e ao agente de portaria Joel Teodósio de Oliveira, pela ajuda e auxílio no transporte dos materiais e das rações.

Aos amigos, colegas e bolsistas do laboratório de Doenças Parasitárias do Prédio da Sanidade Animal do Convênio Embrapa/UFRRJ, Alessandra Scofield Amaral pelas valiosas instruções e correções. Ao Charles Passos Rangel, Daniel da Silva Guedes Jr., Rafaella Câmara Teixeira, Fábio Jorge Moreira da Silva e Nathalie Costa da Cunha, além de Juliana Carrocino pelo alegre e eficiente trabalho em equipe durante as coletas e realizações dos hemogramas. Às amigas Luciana Rodrigues de Almeida e Renata Cunha Madureira, por estarem sempre dispostas a ajudar. À amiga Cátia Marques da Costa por suas sugestões maravilhosas e por seus incentivos. Além de Abisair Andrade de Castro e Fabíola do Nascimento Corrêa pelo convívio e amizade.

Ao colega Fábio Mathias Corrêa pela realização das análises estatística e gráfica.

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

À Profa. Marília Massard da Fonseca, pelo carinho e amizade com que sempre nos recebeu em sua casa.

Aos grandes amigos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Eliane Mattos Piranda, Paulo Henrique Duarte Cançado, Franzisca Huber, Luciana Teixeira, Adriana e André Plaza, Mariza Regina e Márcia Regina, Carlo José Freire de Oliveira, Geisi Mariné, Renata Cristina Scarlato, Sadra Santos, Maria Forlano e Marcos Antônio Vargas, Júlio Israel Fernandes, Thiago Bahiense, Marcos Pinheiro Franque, Verônica da Silva Cardoso, Carlos César, Luiz Eduardo Roland Tavares, Raquel de Assis Sirvente, Sílvia Maria de Freitas, Maurício Mancini e Thiago Farias da Silva, pela amizade, durante todo o tempo de convivência nesta instituição.

Às minhas amigas e colegas de casa Cristiane Raquel Dias Franciskini, Cristiane de Lima Mussel, Kátia Kaori Taira, Renata Batista, Sthefane D'Ávila, Renata Lopes, Raquel Saucier Gomes, Vanessa de Almeida Raia e Tamara Barbosa, sem me esquecer da Floyd e do Amarelo, pela amizade, durante todo o tempo de convivência nesta Instituição, obrigada por tudo!!

Aos animais que tanto contribuíram para a realização deste estudo.

À UFRRJ pela acolhida durante o curso de Graduação e de Mestrado, a minha gratidão.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o período de Mestrado.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

Raquel Silva Lisbôa, filha de Anquises Ferreira Lisbôa e Maria Silvina Silva Lisbôa, nasceu em 3 de Agosto de 1979, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, onde cursou o ensino fundamental no Colégio Santo Amaro e o ensino médio no Colégio Princesa Isabel, concluído em 1996, ambos localizados no bairro de Botafogo, Rio de Janeiro.

No ano de 1997, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 12 de outubro de 2002.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas e instituições, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Participou de 11 publicações científicas, entre artigos em revistas científicas e indexadas e em congressos e eventos científicos nacionais.

Foi bolsista de Aperfeiçoamento técnico do CNPq de março a agosto 2003, junto a projetos de pesquisa na área de hemoparasitologia no Laboratório de Doenças Parasitárias do prédio da Sanidade Animal do convênio com a EMBRAPA/UFRRJ.

No ano de 2003 exerceu a função de estagiária voluntária em um laboratório de análises clínicas animais (Prolab), durante os finais de semana.

Em março de 2004 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Sanidade Animal, ao nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi Bolsista da CAPES de março de 2004 até o presente momento. Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Breve Histórico Sobre a Borreliose Aviária.....	3
2.2 Morfologia.....	3
2.3 Posição Sistemática.....	4
2.4 Vetores e Distribuição Geográfica.....	4
2.5 Período Pré-patente e Vias de Inoculação.....	6
2.6 Métodos de Manutenção.....	6
2.6.1 Criopreservação.....	6
2.7 Avaliação da Espiroquetemia.....	7
2.8 Hematologia Aviária.....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Aves e Condições Experimentais.....	9
3.2 Local de Manutenção das Aves.....	9
3.2.1 Formulação e quantidade de ração fornecida às aves.....	9
3.2.2 Pesagem das aves.....	9
3.3 Origem do Isolado de <i>Borrelia anserina</i>	10
3.4 Origem e Infecção dos Carrapatos.....	10
3.5 Espiroquetemia.....	10
3.6 Delineamento Experimental.....	10
3.7 Coletas de Sangue e Realização dos Hemogramas.....	11
3.9 Análises Estatística e Gráfica.....	12
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4.1 Período Pré-patente e Espiroquetemia.....	14
4.2 Aspectos Clínicos da Infecção.....	15
4.2.1 Perda de peso.....	16
4.3 Análises Hematológicas.....	21
4.3.1 Hemograma e contagem de trombócitos.....	21
4.3.2 Leucograma.....	22

5 CONCLUSÕES.....	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
TABELA 1. Médias de período pré-patente e de período de patência de aves experimentalmente infestadas por <i>Argas miniatus</i> infectados por <i>Borrelia anserina</i> (Grupo 1).....	14
TABELA 2. Número médio de espiroquetas por esfregaço sangüíneo, após a transmissão de <i>Borrelia anserina</i> via vetor <i>Argas miniatus</i> em <i>Gallus gallus</i> (Grupo 1).....	15
TABELA 3. Valores das médias dos pesos de <i>Gallus gallus</i> durante o período experimental. Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>).....	19
TABELA 4. Variáveis observadas no hemograma de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>) três dias antes da exposição aos carrapatos...	24
TABELA 5. Variáveis observadas no leucograma de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>) três dias antes da exposição aos carrapatos...	25
TABELA 6. Variáveis observadas no hemograma de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>) três dias após a exposição aos carrapatos.....	26
TABELA 7. Variáveis observadas no leucograma de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>) três dias após a exposição aos carrapatos.....	27
TABELA 8. Variáveis observadas no hemograma de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>) oito dias após a exposição aos carrapatos.....	28
TABELA 9. Variáveis observadas no leucograma de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>) oito dias após a exposição aos carrapatos.....	29
TABELA 10. Variáveis observadas no hemograma de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 3 (aves não expostas a <i>Argas miniatus</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>) 18 dias após a exposição aos carrapatos.....	30

TABELA 11. Variáveis observadas no leucograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) 18 dias após a exposição aos carrapatos..... 31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Páginas
GRÁFICO 1. Representação gráfica da dinâmica de ganho de peso de <i>Gallus gallus</i> durante o período experimental. Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos). Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	20
GRÁFICO 2. Alterações observadas no volume globular de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	32
GRÁFICO 3. Alterações observadas na contagem de eritrócitos de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	33
GRÁFICO 4. Alterações observadas nos valores de concentração de hemoglobina de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	34
GRÁFICO 5. Alterações observadas nos valores de concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	35
GRÁFICO 6. Alterações observadas nas contagens de trombócitos de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	36
GRÁFICO 7. Alterações observadas nas dosagens de proteínas plasmáticas totais de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	37

GRÁFICO 8. Alterações observadas nas contagens de leucócitos de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	38
GRÁFICO 9. Alterações observadas nas contagens de heterófilos maduros de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	39
GRÁFICO 10. Alterações observadas nas contagens de monócitos de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	40
GRÁFICO 11. Alterações observadas nas contagens de linfócitos de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	41
GRÁFICO 12. Alterações observadas nas relações heterófilo/linfócito de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	42
GRÁFICO 13. Alterações observadas nas contagens de eosinófilos de <i>Gallus gallus</i> . Grupo 1 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> infectados com <i>Borrelia anserina</i>), Grupo 2 (aves expostas a <i>Argas miniatus</i> livres de <i>Borrelia anserina</i>) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
FIGURA 1 Registro fotográfico de algumas etapas referentes à identificação, alojamento, coleta, transporte e processamento de amostras sanguíneas de <i>Gallus gallus</i> expostos a <i>Argas miniatus</i> livres e infectados com <i>Borrelia anserina</i> e do grupo não exposto aos carrapatos.....	13
FIGURA 2 Registro fotográfico da microscopia ótica de esfregaços corados pelo método Giemsa, aves clinicamente enfermas e aspecto das fezes das aves do grupo infectado por <i>Borrelia anserina</i> (aves do grupo 1).....	17
FIGURA 3 Registro fotográfico das aves dos grupos experimentais e aspecto das respectivas fezes.....	18

ÍNDICE DE ANEXOS

	Páginas
ANEXOS	50
ANEXO I Tabela de Recomendações de Nutrição Durante o Período de Crescimento.....	50
ANEXO II Composição das Rações.....	51
ANEXO III Consumo de Alimento Durante o Período de Crescimento.....	52
ANEXO IV Peso Corporal Ideal da Brown em Gramas durante o Período de Crescimento.....	53
ANEXO V Ficha de Espiroquetemia.....	54
ANEXO VI Solução de Natt e Herrick.....	55
ANEXO VII Análise de Variância.....	56
ANEXO VIII Correlação.....	63

RESUMO

LISBÔA, Raquel Silva. **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**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 63p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal).

A Borreliose aviária é uma doença septicêmica aguda, cosmopolita, que acomete diferentes espécies aviárias, sendo causada por *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891). Esta espiroqueta pode ser encontrada no plasma sanguíneo das aves infectadas durante os estágios iniciais da doença. Os objetivos do presente trabalho foram estudar a transmissão experimental de *B. anserina* por carrapatos *Argas miniatus* infectados, observando o período pré-patente e período de patência, e estudo comparativo das alterações clínicas e hematológicas. Um total de 27 aves da espécie *Gallus gallus* foram divididas em três grupos inteiramente casualizados contendo nove animais cada. Um grupo foi exposto a carrapatos infectados por *B. anserina* (grupo 1); outro a carrapatos livres deste agente (grupo 2); além de um grupo não exposto aos carrapatos (grupo 3). Realizaram-se esfregaços sanguíneos das aves, diariamente, a partir do primeiro dia em que as aves foram expostas aos carrapatos, até o 25º dia após a exposição (DPE). Amostras de sangue foram coletadas três dias antes da exposição aos carrapatos, três DPE, oito DPE e uma última 18 DPE para a realização dos hemogramas. O exame dos esfregaços das aves do grupo 1 revelou grande número de espiroquetas. Os parâmetros biológicos de período pré-patente e de período de patência para este grupo foram, em dias, $6 \pm 0,83$ e $5 \pm 1,96$, respectivamente. Os esfregaços sanguíneos do grupo 2 e do grupo 3 mantiveram-se negativos durante todo o período experimental. Em relação às manifestações clínicas observadas, a partir do sexto e sétimo DPE, as aves do grupo 1 apresentaram os seguintes sinais clínicos: penas arrepiadas, crista pálida, sonolência, perda do apetite, perda de peso e diarreia esverdeada. Estes sinais continuaram até o 12º DPE, coincidindo com o término da espiroquetemia, em seguida houve evolução do quadro clínico para a cura das aves. De acordo com os resultados das avaliações hematológicas, as aves expostas aos carrapatos infectados por *B. anserina* (grupo 1) apresentaram um quadro de anemia normocítica normocrômica em oito DPE, leucocitose com heterofilia e monocitose iniciais que cursaram paralelamente com a espiroquetemia. Após o período de patência da infecção, dezoito DPE, detectou-se uma linfocitose. O presente trabalho confirmou a viabilidade da transmissão de *B. anserina* em *G. gallus* experimentalmente infestados por *A. miniatus*. *G. gallus* infectados apresentaram alterações clínicas que cursaram paralelamente ao período de espiroquetemia, evoluindo para auto-cura, além de alterações hematológicas compatíveis com infecção bacteriana.

Palavras chave: Galinhas domésticas, carrapatos, borreliose aviária

ABSTRACT

LISBÔA, Raquel Silva. **A Study on the Experimental Transmission of *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) by *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 and a Comparison of Clinical and Hematological Parameters.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 63p. (Dissertation, Master in Veterinary Sciences, Animal Health).

Avian spirochetosis is an acute septicemic disease, cosmopolite, of a variety of avian species caused by *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891). This spirochete is usually present in the blood of infected birds during the early stages of the disease. The present study assesses the experimental transmission of *B. anserina* by infected ticks *Argas miniatus*, observing the pre-patent and patent period, and comparing the clinical and hematological alterations. Twenty-seven fowls of the species *Gallus gallus* were randomly allocated into three groups composed by nine animals each. One group was exposed to *B. anserina* infected ticks (group 1), other one to ticks free of this agent (group 2), besides one group not exposed to ticks (group 3). Blood smears of the fowls were taken, daily, since the first day the fowls were exposed to the ticks, up to the 25^o day after exposure (DAE). Blood samples were collected three days before exposure, three DAE, eight DAE, and for the last time in eighteen DAE for hematologic tests. The examination of group three's smears revealed a great number of spirochetes. The biological parameters of the pre-patent and patent period for this group were, $6 \pm 0,83$ and $5 \pm 1,96$ days, respectively. Group 2 and group 3 blood smears were negatives during the whole period under exam. About the clinical signs observed, since the sixth and seventh DAE, the fowls of group 1 presented: nibs bristle, pale crist, somnolence, inappetence, loss of weight and green diarrhoea wich were continuing until the 12^o DAE coinciding with the end of the spirochetemia, after this, occured clinical evolution which self-cure. In agreement with the hematological evaluation results, the fowls exposed to infected ticks showed a normocytic normochromic anemia in eight DAE, leucocytosis with initial heterophilia and monocytosis in concomitance with the spirochetemia. After the patent period, eighteen DAE, a linphocytosis was detected. The present study confirmed the viability of the experimental transmission of *B. anserina* by infected ticks *A. miniatus*. Infected *G. gallus* with avian spirochetosis showed clinical alterations wich cursed in concomitance to the spirochetemia period, evolving to self-cure, moreover hematological alterations compatible with the bacterial infection.

Key words: Domestic chickens, ticks, avian spirochaetosis

1 INTRODUÇÃO

Borrelia anserina (Sakharoff, 1891) é o agente etiológico da borreliose aviária, uma doença septicêmica aguda que acomete diversas espécies aviárias (BOERO, 1967; GARG; GAUTAM, 1971; BIER, 1985). Este espiroquetídeo foi primeiro descrito por Sakharoff no ano de 1891 o qual estudava septicemia em gansos no Caucasus. As aves acometidas por *B. anserina*, apresentam manifestações clínicas de hipertermia, polidipsia, sonolência, anorexia inapetência, diarréia verde escura, podendo ocorrer paralisia das asas ou patas e até, culminar em morte súbita (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; BOERO, 1967; BIER, 1985).

Marchoux e Salimbeni (1903) foram os primeiros a relatar no Brasil, um surto natural em galinhas. Esta bactéria apresentava alta prevalência em aves de criações rústicas, determinando mortalidade e morbidade elevadas, principalmente nas aves jovens. Segundo Holt et al. (1994) *B. anserina* é a única espiroqueta que acomete aves.

Este agente etiológico apresenta ampla distribuição geográfica, tendo sido relatado em áreas tropicais e subtropicais da Europa, África, Ásia, partes da Austrália e nas Américas do Norte, Central e do Sul (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; McNEIL et al., 1949; DICKIE; BARRERA, 1964; GARG; GAUTAM, 1971; COOPER; BICKFORD, 1993).

Os vetores são carrapatos do gênero *Argas*, servindo como reservatórios naturais, nos quais as espiroquetas sobrevivem por longos períodos (DaMASSA; ADLER, 1979; BURGDORFER, 1985). Nos argasídeos, todos os instares têm habilidade para transmitir *B. anserina* (COOPER; BICKFORD, 1993). Na maioria dos países da Europa, a infecção é transmitida por *Argas persicus* e *A. reflexus*; na África e na Austrália por *A. persicus* e nas Américas por *A. miniatus* (HUTYRA, et al., 1947).

A profilaxia da espiroquetose aviária consiste essencialmente no controle do carrapato vetor e o tratamento é efetuado com antibióticos do grupo da penicilina, estreptomicina e terramicina (HUTYRA, et al., 1947; BOERO, 1967; BIER, 1985).

A preservação de *B. anserina* em meios de cultura não é conseguida facilmente, devido às necessidades nutricionais exigentes (McNEIL et al., 1949; MERCHANT; PACKER, 1965; HOLT et al., 1994). Isolados de *B. anserina*, são comumente mantidos em laboratórios por meio de passagens sanguíneas sucessivas em aves jovens, ou via vetor carrapato ou por meio de amostras de soro e sangue mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido (McNEIL et al., 1949; SMIBERT, 1980; LABRUNA et al., 1999).

Segundo Boero (1967), a borreliose aviária foi responsável por severas perdas econômicas na primeira metade do século XX. Atualmente, não têm ocorrido relatos da espiroquetose aviária ou os mesmos não são detectados. Este fato pode 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 morbidade/mortalidade. Entretanto, mais recentemente, o uso desses produtos está sendo questionado devido à possível relação com a resistência aos antibióticos usados na antibioticoterapia humana.

A borreliose aviária é uma doença de importância econômica para produção de aves, particularmente no sistema orgânico, por causar alta mortalidade nos animais jovens. Os hemoparasitos têm sido foco de diversos estudos em aves em diferentes países, o que se deve principalmente aos prejuízos econômicos por eles causados, além da importância do conhecimento das interações vetores-agentes etiológicos-hospedeiros.

O presente trabalho teve como objetivos o estudo da transmissão experimental de *B. anserina* por carrapatos *A. miniatus* infectados, observando os períodos pré-patente e de patência, e estudo comparativo das alterações clínicas e hematológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve Histórico Sobre a Borreliose Aviária

A borreliose aviária é uma doença septicêmica aguda que acomete diferentes espécies aviárias. Esta patologia é causada por *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891), tendo sido relatada em diversos países (BOERO, 1967; GARG; GAUTAM, 1971; BIER, 1985). Esta doença foi observada pela primeira vez no Cáucaso por Sakharoff em 1891, o qual estudava septicemia em gansos (*Anser cygnoides*). Mais tarde, Marchoux e Salimbeni (1903) estudaram no Brasil uma espiroqueta em *Gallus gallus* de criações rústicas, diagnosticada no Rio de Janeiro, e demonstraram que carrapatos do gênero *Argas* transmitiam o patógeno das galinhas enfermas para as galinhas sadias (HUTYRA et al., 1947). O primeiro relato no Sudão foi feito em 1923 e, desde então, se tornou a doença de maior causa de mortes em galinhas domésticas na época. Cooper e Bickford (1993), relataram um surto em galos de briga no estado da Califórnia, Estados Unidos da América.

Os hospedeiros naturais são galinhas (*G. gallus*), gansos (*A. cygnoides*), perus (*Meleagris gallopavo*), patos (*Cairina moschata*), faisões (*Phasianus colchicus*) e canários (*Serinus canarius*). Mas a doença foi reproduzida experimentalmente em muitas outras espécies de aves, tais como corvos (*Corvus corone*), pombos (*Columba livia*), perdizes (*Alectoris rufa*), galinha d'angola (*Numida meleagris*), cotovias (*Galerida cristata*) e pardais (*Passer domesticus*) (McNEIL et al., 1949).

Clinicamente, a enfermidade se manifesta por hipertermia e polidipsia inicial, profunda adinamia, sonolência, inapetência, diarreia verde escura, evoluindo para cianose com hipotermia, podendo ocorrer transtornos paralíticos e morte (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; BOERO, 1967; BIER, 1985). Achados comuns de necropsia são hepatomegalia com presença de manchas esbranquiçadas e/ou fígado com aspecto de noz moscada e esplenomegalia (BOERO, 1967; BIER, 1985).

Por esta bactéria encontrar-se no plasma sanguíneo das aves infectadas durante os estágios iniciais da doença (DICKIE; BARRERA, 1964; BURGDORFER; SCHWAN, 1991), o diagnóstico pode ser realizado durante a fase aguda através de esfregaços sanguíneos periféricos, preferencialmente corados pelo Giemsa (HUTYRA et al., 1947). Esta espiroqueta pode também ser visualizada pela microscopia de campo escuro (HUTYRA et al., 1947) e, através de exames histopatológicos dos órgãos afetados, corados pela hematoxilina-eosina (SHOMMEIN; KHOGALI, 1974; SOARES, et al., 2000). Devido à estreita relação da *B. anserina* com seu vetor *Argas* sp, a espécie pode ser isolada e identificada com o auxílio do xenodiagnóstico (APPEL et al., 1993; SOARES, et al., 2000), utilizando-se a aposição de tecidos dos carrapatos como intestino e glândula salivar, e ainda, exame de hemolinfa e de líquido coxal em microscopia de campo escuro ou contraste de fase (BIER, 1985).

2.2 Morfologia

As espiroquetas do gênero *Borrelia* se caracterizam morfológicamente por serem maiores, possuírem maior número de flagelos periplasmáticos (15-20) e menor número de espiras que as bactérias dos outros gêneros da família (PFISTER et al., 1994; QUINN et al., 1994); embora dentro de uma mesma espécie possa existir pleomorfismo, de acordo com a cepa (BENNETT, 1995). São bactérias Gram-negativas; microaerófilas e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993). As espécies

patogênicas do gênero *Borrelia*, em sua maioria, são parasitas sanguíneos dos animais, aves e do homem. Animais silvestres são reservatórios naturais, sendo os roedores hospedeiros biológicos (BARBOUR; HAYES, 1986).

Uma característica biológica utilizada para identificar as espécies deste gênero é o fato de que todas são transmitidas para vertebrados por artrópodes hematófagos, ocorrendo com frequência a transmissão transovariana de *Borrelia* spp nos carrapatos (BARBOUR; HAYES, 1986).

Borrelia anserina possui as seguintes características estruturais: células de formato helicoidal, móveis; cilindro protoplasmático envolvido e limitado pela membrana celular interna, pelos flagelos e por uma membrana celular externa. Os flagelos periplasmáticos estão inseridos no término do cilindro protoplasmático (BARBOUR; HAYES, 1986).

A descrição original feita por Sakharoff (1891) inclui uma fotomicrografia que mostra cerca de seis espirais, mas não informa as medidas de comprimento. Relatos na literatura do comprimento têm variado de 6 a 30 μm e há uma ampla variação em um mesmo hospedeiro, devido aos estágios de divisão (McNEIL et al., 1949). Hinshaw e McNeil (1946) reportaram uma média de 14 μm (7 a 21 μm) com seis espirais. Segundo o *Manual Bergey de Bacteriologia Determinativa* (1984) estes microrganismos possuem 0,2 a 0,3 μm de diâmetro e 8 – 20 μm de comprimento e consistem de 5 a 8 espirais.

2.3 Posição Sistemática

As borrelíias permaneceram por um longo tempo dentro do antigo Filo Protozoa, Classe Spirochetes, e no gênero *Borrelia* (BRUMPT, 1927). Sua posição quanto aos protozoários se deu pela falta de polaridade, comum nos Protozoa; por encontrarem-se no sangue dos animais, foi relacionada ao gênero *Trypanossoma*, ficando por algum tempo no grupo Protoflagelata, por ser transmitida por artrópodes (BRUMPT, 1927; PÊSSOA, 1963). Entretanto, a partir de 1948, os bacteriologistas sistematas colocaram-no como um grupo especial entre as bactérias (PÊSSOA, 1963; KRIEG; HOLT, 1984). A espécie tipo é *B. anserina* (Sakharoff, 1891) (FELSENFELD, 1965).

Sakharoff, 1891 nomeou o organismo como *Spirochaeta anserina* (WENYON, 1926). A edição de 1948 do *Manual Bergey de Bacteriologia Determinativa* lista como sinônimos de *Borrelia anserina*: *Spirochaeta gallinarum*, *Treponema anserinum* e *Spirochaeta anatis* (McNEIL et al., 1949).

A posição sistemática desta espiroqueta, segundo classificações de bactérias (BARBOUR; HAYES, 1986; NCBI, 2005), ficou definida da seguinte maneira:

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

2.4 Vetores e Distribuição Geográfica

Os vetores são carrapatos do gênero *Argas*, servindo como reservatórios naturais, nos quais as espiroquetas sobrevivem por longos períodos (DaMASSA;

ADLER, 1979; BURGDORFER, 1985). Nos argasídeos, todos os ínstares têm habilidade para transmitir *Borrelia* (COOPER; BICKFORD, 1993).

Quando os carrapatos sugam aves infectadas, as espiroquetas atravessam a parede do intestino e ganham o celoma, podendo ser encontradas já no fim de três dias no líquido coxal. Após 14 dias, em virtude da multiplicação das espiroquetas, estas podem ser demonstradas em todo o organismo do carrapato, em particular nas glândulas salivares e nos tubos de Malpighi. Nesta fase, *Argas* sp são exímios transmissores, inoculando as espiroquetas, tanto através do líquido coxal, quanto pela saliva. A doença manifesta-se nas aves quatro a seis dias após terem sido picadas por carrapatos infectados (BIER, 1985).

Os órgãos coxais dentro dos argasídeos são tecidos especializados para a excreção do excesso de líquidos e solutos que se acumulam no carrapato durante a alimentação (KAUFMAN; SAVER, 1982). Segundo Boero (1967), o líquido coxal é liberado próximo das partes bucais durante a alimentação, quando o carrapato chega ao limite de repleção por ingurgitamento de sangue. De acordo com Bier (1985), 14 dias após terem se alimentado em uma ave infectada, as espiroquetas podem ser encontradas em todo o organismo do carrapato. *Borrelias* possuem a capacidade de penetrar ativamente da hemocele para dentro do órgão coxal e seu líquido (BONÉ, 1939). Este líquido coxal infectado com *B. anserina* penetra pelo microtrauma da picada e, dessa forma se dá a transmissão. As espiroquetas contidas no líquido coxal dos carrapatos se introduzem no organismo e a partir desse momento, iniciam uma verdadeira multiplicação por divisão binária transversal nos órgãos internos da ave, alcançando seu máximo entre o 4º e 6º dia de sua penetração (HUTYRA, et al., 1947; BOERO, 1967).

Na maioria dos países da Europa, a infecção é transmitida por *Argas persicus* e *A. reflexus*; na África e na Austrália por *A. persicus* e nas Américas por *A. miniatus* (HUTYRA, et al., 1947). Marchoux e Salimbeni (1903), no Rio de Janeiro, descreveram pela primeira vez a transmissão transestadial e transovariana de *B. anserina* (Sakharoff, 1891), por *A. miniatus* (Koch, 1844). Esta espécie de carrapato tem importância econômica para aves nas Américas, acarretando anemia, espoliação, diminuição da produtividade, transmissão de *B. anserina* e outros patógenos.

Este argasídeo apresenta como característica biológica estágio larval que permanece sobre o hospedeiro pelo período de três a sete dias para se alimentar. O estágio de ninfa realizando de três a cinco mudas, e os estágios de ninfa e de adulto alimentando-se entre 10 e 45 minutos, preferentemente à noite, além de possuírem dimorfismo sexual pouco evidente (KOHLS et al., 1970). Os machos diferenciam-se das fêmeas pelos caracteres sexuais secundários e pelas medidas (MAGALHÃES, 1979).

Desde seu relato original no Caucasus, a borreliose aviária também foi relatada como a maior causa de mortalidade em aves, em áreas tropicais e subtropicais da Europa, África, Índia e Indonésia; em partes da Austrália; na América Central e do Sul (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; McNEIL et al., 1949), e, nos Estados Unidos foi reportada nos estados da Califórnia (McNEIL et al., 1949, DICKIE; BARRERA, 1964; GARG; GAUTAM, 1971; COOPER; BICKFORD, 1993), Arizona, Novo México e Texas (McNEIL et al., 1949).

Atualmente, a borreliose aviária é uma doença de importância econômica para produção de aves, particularmente no sistema orgânico, por causar alta morbidade/mortalidade, principalmente nas aves jovens.

2.5 Período Pré-patente e Vias de inoculação

Autores que trabalharam experimentalmente com amostras de *B. anserina* em *G. gallus* relataram o período pré-patente de dois dias, quando da inoculação de sangue citratado infectado por via intramuscular ou intravenosa (SHOMMEIN; KHOGALI, 1974; BANDOPADHYAY; VEGAD, 1983) e também de dois dias quando da inoculação de soro infectado criopreservado com DMSO a 10% (LABRUNA et al., 1999).

O período de incubação é em média de três a oito dias quando o agente etiológico é adquirido por picadas de carrapatos infectados (HUTYRA et al., 1947; McNEIL et al., 1949; BOERO, 1967; BIER, 1985).

2.6 Métodos de Manutenção

Borrelia anserina não é facilmente cultivada *in vitro*. A preservação desta espécie em meios de cultura de laboratório não tem sido utilizada rotineiramente, devido às suas necessidades nutricionais exigentes (McNEIL et al., 1949; MERCHANT; PACKER, 1965; HOLT et al., 1994).

O método tradicional para a manutenção deste organismo em laboratório era em ovos embrionados de galinha ou por passagens seriadas em galinhas domésticas jovens (SMIBERT, 1980).

Amostras de *B. anserina*, comumente, são mantidas através de passagens sanguíneas sucessivas em aves jovens, por vias endovenosa, intramuscular e subcutânea; utilizando-se com freqüência as dosagens de 0,2 a 1,0 ml de soro ou sangue infectados, sem estimar a espiroquetemia (McNEIL et al., 1949).

Colônias de *Argas* spp. infectados com *B. anserina* também têm sido utilizadas para manter a viabilidade e a patogenicidade bacterianas (LABRUNA et al., 1999).

2.6.1 Criopreservação

A criopreservação é um método que tem propiciado grandes progressos nas ciências biológicas. A estocagem de parasitos por meio de congelamento sob baixas temperaturas tem sido amplamente utilizada. Esta técnica reduz vários inconvenientes como, principalmente, o custo da manutenção de patógenos em animais ou em meio de cultura, mantendo as características biológicas do organismo que poderia ser perdida com sucessivas passagens (DALGLIESH, 1972a). Diversos autores trabalharam com a manutenção de *B. anserina* pelos métodos de refrigeração e criopreservação.

Hart (1970) relatou a sobrevivência de *B. anserina* armazenada em nitrogênio líquido. Esta espiroqueta se manteve viável por 150 dias em sangue contendo citrato de sódio bem como em soro de galinha com e sem glicerol armazenados em nitrogênio líquido.

Dhawedkar e Dhanesar (1983) realizaram, um estudo buscando o anticoagulante, o agente estabilizante e o meio de suspensão mais adequados para preservar *B. anserina* diretamente no nitrogênio líquido por um longo período, obtendo como melhor resultado o citrato de sódio, o glicerol a 6-10% e o meio de Hank, respectivamente.

Verma et al. (1990) desenvolveram um procedimento simples e efetivo para a preservação de *B. anserina* no refrigerador e no nitrogênio líquido, concluindo que o sangue sem e com glicerol a 6% foram os materiais ideais, pois mantiveram sua motilidade bem como sua infectividade por mais de 370 dias quando armazenados no

nitrogênio líquido. De acordo com este autor, o glicerol provavelmente minimiza a formação de cristais de gelo, que poderiam danificar o organismo.

Labruna et al. (1999) compararam a utilização de glicerol a 50% e de DMSO a 10% como estabilizantes para soros de aves experimentalmente infectadas, contendo espiroquetas viáveis. Apesar de ambos os procedimentos terem mantido a infectividade da bactéria, DMSO a 10% no soro de galinha apresentou-se mais satisfatório como criopreservante.

2.7 Avaliação da Espiroquetemia

Esfregaços sangüíneos periféricos de aves infectadas experimentalmente com *B. anserina* são confeccionados diariamente para a mensuração da espiroquetemia. São observados em média 50 campos por esfregaço sangüíneo (SHOMMEIN; KHOGALI, 1974; BANDOPADHYAY; VEGAD, 1983; LABRUNA, et al., 1999).

2.8 Hematologia Aviária

Shommenin e Khogali (1974) realizaram um estudo sobre a hematologia e a histopatologia da borreliose aviária. Neste estudo, três grupos de *G. gallus* de raças diferentes, foram inoculados com 0,5 mL de sangue contendo citrato de sódio infectado com *B. anserina* oriundo de aves naturalmente infectadas. Estes autores concluíram que nesta doença ocorre uma diminuição marcante do número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina do sangue.

De acordo com Hutyra et al. (1947), as espiroquetas se multiplicam primeiro no fígado, no baço e na medula óssea. De quatro a seis dias após, migram para o sangue circulante onde ocorre intensa multiplicação, produzindo, provavelmente mediante produtos tóxicos, febre e acumulações celulares perivasculares em diversos órgãos. A alteração dos valores hematológicos também se atribui a substâncias tóxicas. Ainda segundo Hutyra et al. (1947), o número de glóbulos vermelhos diminui após a multiplicação das espiroquetas com manifestação de leucocitose. Após o pico, o número de espiroquetas do sangue também diminui ou desaparece, mesmo se o estado do animal piorar, ou melhorar. No último acontecimento, o número de glóbulos vermelhos aumenta, e novamente, alcança valores normais em uma a duas semanas.

Segundo Sharma (1984), o sistema imunológico das aves opera de acordo com os mesmos princípios do sistema imunológico dos mamíferos. Os monócitos, macrófagos, heterófilos e linfócitos constituem os componentes celulares das respostas imunológicas nas aves (POWEL, 1987; MORGULIS, 2002).

Nas aves, os trombócitos são células bastante importantes na resistência imunológica inespecífica, já que estão circulando em grande número no sangue (GRECCHI et al., 1980; MORGULIS, 2002). Possuem função semelhante à das plaquetas nos mamíferos no processo da coagulação sangüínea, mas sua principal característica é que são células altamente fagocíticas (CAMPBELL; DEIN, 1984).

Conforme Kokosharov (1998), os leucócitos têm um papel importante na resposta inflamatória, são os apresentadores da defesa a uma infecção, destruindo bactérias Gram positivas e Gram negativas.

As células do sistema imunológico das aves dividem-se de acordo como a morfologia nuclear. Os agranulócitos são constituídos por linfócitos, macrófagos, monócitos e trombócitos. Os granulócitos são constituídos por heterófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, estes não possuem especificidade para os antígenos, mas têm importante papel na fase aguda da infecção (MORGULIS, 2002).

A principal função dos heterófilos é de fagocitose (MORGULIS, 2002), que se realiza como resposta a um estímulo quimiotático. Contém enzimas lisossomais e possuem uma função bactericida. Eles são altamente móveis e são tipicamente a primeira célula a responder a qualquer inflamação ou doença infecciosa, portanto, eles se elevam durante períodos de estresse, em resposta a uma inflamação, incluindo infecções bacterianas, clamidiais e fúngicas; necrose tecidual; distúrbios metabólicos; neoplasia; e síndromes paraneoplásicas (RUPLEY, 1999).

A contagem diferencial de leucócitos é relevante para o diagnóstico de anormalidade no homem e também é importante para doenças aviárias (ANDERSON; STEPHENS, 1970), pois estabelece a percentagem e a quantidade de cada tipo de leucócito que se encontra em uma determinada circunstância ou enfermidade na ave.

Boero (1967) relatou a ocorrência de uma heterofilia inicial que cursa paralelamente com a aparição das espiroquetas na circulação. À medida que avança a infecção e aumenta a população das espiroquetas no sangue, a heterofilia se acentua até chegar o pico de espiroquetemia. A partir desta ocasião, ocorre predomínio de monócitos na circulação. A monocitose posteriormente é substituída por linfocitose quando o quadro clínico evolui para a cura das aves.

Na tentativa de encontrar um diluente estável, de fácil preparo e que permitisse uma diferenciação mais satisfatória dos leucócitos no hemocitômetro, Natt e Herrick (1951) descreveram um diluente, o qual permite rápida diferenciação de vários tipos de células sanguíneas de aves assim capacitando a contagem direta de eritrócitos e leucócitos de uma mesma amostra de sangue. Esta solução possui uma pressão osmótica comparável a da solução salina de galinha (ALDRED, 1940), e por isso, não altera a morfologia das células sanguíneas. Campbell (1995) descreveu o uso da solução de Natt e Herrick para realizar também contagens eritrocíticas de diferentes espécies de aves.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aves e Condições Experimentais

Foram utilizadas 27 aves da espécie *G. gallus*, linhagem comercial “Isa Brown” para postura, adquiridas no comércio local; vacinadas com um dia de idade, contra doença de Marek e boubá aviária. Estas aves foram analisadas para a presença de hemoparasitos por meio de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, estando todas negativas à análise microscópica. As aves encontravam-se com 12 dias de idade no início do experimento, sendo vacinadas aos 17 e aos 37 dias de idade, contra New Castle (New-Vacin La Sota¹) e identificadas individualmente com esparadrapos numerados nas patas (**Figura 1a**).

Foram realizados exames coproparasitológicos quando as aves tinham respectivamente, 25, 78 e 81 dias de idade. As amostras foram processadas no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). No primeiro exame coproparasitológico, as aves estavam positivas para *Eimeria* sp e *Cryptosporidium* sp. Houve então, a necessidade de tratamento com coccidiostático a base de Sulfamethoxazole + Trimethoprim + Bromhexine (Trissulfim²), na dose de 1kg / 1.000 L durante três dias aplicado na água de beber.

3.2 Local de Manutenção das Aves

As aves foram mantidas durante todo o experimento, dentro de gaiolas suspensas, em ambiente telado e ventilado em um galpão da Estação Experimental Parasitológica W. O. NEITZ, UFRRJ (**Figura 1b**). Foram colocadas quatro aves por gaiola, dispostas de forma que a iluminação, ventilação e potenciais causas de estresse tivessem a mesma influência sobre os grupos. O experimento foi realizado de abril a agosto de 2005.

3.2.1 Formulação e quantidade de ração fornecida às aves

As aves foram alimentadas, inicialmente com água e ração *ad libitum*; a dieta era constituída de ração comercial para frangas de postura em crescimento. Aos 44 dias de idade iniciou-se a administração de ração elaborada na fábrica de ração do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, sendo utilizado suplemento mineral-vitaminico isento de coccidiostático e sem promotor de crescimento, sendo a quantidade controlada de acordo com a idade e peso das aves. Estas rações foram formuladas de acordo com a tabela de Recomendações de Nutrição durante o Período de Crescimento (**Anexo I**), para aves da raça Hy-Line variedade Brown (GUIA DE MANEJO, 2004), tendo compreendido as fases de crescimento e de desenvolvimento (**Anexo II**).

A quantidade de ração foi aumentada semanalmente, de acordo com a tabela de Consumo de Alimento durante o Período de Crescimento (**Anexo III**) para aves da raça Hy-Line variedade Brown (GUIA DE MANEJO, 2004).

3.2.2 Pesagem das aves

As aves foram pesadas aos 36, 50, 62, 71, 77 e 85 dias de idade, totalizando seis pesagens durante todo o período experimental (**Anexo IV**). Utilizou-se balança do tipo Roberval.

¹ Bio-Vet S/A; ² Ourofino

3.3 Origem do Isolado de *Borrelia anserina*

A cepa de *B. anserina* foi isolada a partir de *G. gallus* naturalmente infectados e cedida pelo Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite da Universidade Federal de Minas Gerais. A amostra de soro foi mantida em nitrogênio líquido (-196°C), com DMSO a 10% como criopreservante (LABRUNA et al., 1999), no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Projeto Sanidade Animal – Embrapa.

3.4 Origem e Infecção dos Carrapatos

Foram utilizados carrapatos provenientes de criações rústicas de *G. gallus*, dos municípios de Três Rios-RJ e do Rio de Janeiro, Bairro de Santa Cruz e identificados como da espécie *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844, de acordo com Magalhães (1979). Os argasídeos estavam sendo mantidos no Laboratório de Doenças Parasitárias, em estufa do tipo B.O.D. em temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 80%.

Uma ave adulta comprovadamente livre de hemoparasitos, por meio de esfregaços sanguíneos fixados em metanol e corados pelo Giemsa, foi imunossuprimida através de administração por via intramuscular, em dose única, de 30 mg/Kg de Acetato de metilprednisolona (Depo - Medrol^{®3}) (SOUZA, 1998). No dia seguinte esta ave recebeu o inóculo de 0,5 ml de soro infectado do item 3.3, já submetido a uma passagem (**Figura 1c**). Este soro quando observado em microscopia de campo escuro apresentou "++" de viabilidade de acordo com a classificação de Dhawedkar e Dhanesar (1983).

Os carrapatos foram colocados para se alimentar nesta ave, até completo ingurgitamento, quando esta apresentava pico de espiroquetemia ao 4º dia, com incontáveis espiroquetas em 50 campos observados em microscópio óptico (Leitz Wetzalar – Dialux 20 EB) com objetiva de 100X (**Figura 1d**). O líquido coxal destes carrapatos foi analisado através de microscopia de campo escuro, tendo sido detectada a presença de espiroquetas.

3.5 Espiroquetemia

Observou-se um mínimo de 50 campos em objetiva de imersão (100X) por esfregaço sanguíneo e, quando uma lâmina se apresentava positiva para espiroquetas, era calculado um número médio de espiroquetas por campo (SHOMMEIN; KHOGALI, 1974; LABRUNA et al., 1999).

Os dados dos esfregaços sanguíneos foram anotados em ficha de avaliação parasitária (**Anexo V**).

3.6 Delineamento Experimental

As aves foram divididas em três grupos inteiramente casualizados contendo nove animais cada, sendo o Grupo 3, o controle. As aves dos Grupos, 1 e 2 foram expostas a *A. miniatus* infectados com *B. anserina* e a *A. miniatus* livres de *B. anserina*, respectivamente. Dois casais (dois machos e duas fêmeas) de *A. miniatus* foram colocados para se alimentar até ingurgitamento completo em cada ave. As aves eram contidas, utilizando-se uma fita adesiva nas patas e um colar Elisabetano no pescoço, com o objetivo de prevenir a ingestão dos carrapatos pelas aves. Os carrapatos foram

expostos na face interna das asas das aves. O grupo controle não foi exposto aos carrapatos.

Realizaram-se esfregaços sangüíneos das aves, diariamente, a partir do primeiro dia em que as aves do grupo 1 e do grupo 2 foram expostas aos carrapatos, até o 25º dia pós-exposição (DPE). Os esfregaços sangüíneos foram fixados em álcool metílico P.A. (Merck), secos ao ar e acondicionados em laminário de plástico, para o transporte ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Projeto Sanidade Animal – Embrapa. As lâminas foram coradas pelo corante Giemsa (eosina azul de metileno, Giemsa – Merck) diluído em tampão Sorensen pH 6,8 (LUBINSKY, 1960) e observadas por meio de microscópio óptico (Leitz Wetzalar – Dialux 20 EB) com ocular (10X) e objetiva de imersão (100X).

As aves também foram observadas diariamente quanto a alterações clínicas, tais como: coloração das fezes, letargia e ingestão de alimento.

3.7 Coletas de Sangue e Realização dos Hemogramas

No 64º dia de idade, três dias antes da exposição aos carrapatos, foram coletadas amostras de sangue de cada ave, por meio de venopunção basílica (veia alar) (Figura 1d), usando-se anticoagulante EDTA (ácido etileno-diaminotetraacético de sódio), na proporção de 50 µL para 2,0 a 3,0 ml de sangue. Este primeiro hemograma foi utilizado como valor padrão normal para controle dos grupos. Uma segunda amostra foi coletada três dias após a exposição (DPE) das aves dos grupos 1 e 2 aos carrapatos infectados e livres de *B. anserina*, respectivamente (aves com 70 dias de idade); uma terceira amostragem em oito DPE (aves com 75 dias de idade); e uma última e quarta amostragem em dezoito DPE (aves com 85 dias de idade). Totalizando quatro hemogramas durante todo o experimento.

Após as coletas, realizadas sempre pela manhã, as amostras contidas nas seringas foram acondicionadas e transportadas em isopor contendo gelo reciclável (**Figura 1e**) e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para serem analisadas.

As amostras de sangue eram transferidas para tubos de plástico, para serem realizadas as seguintes provas hematológicas: determinação do volume globular (VG) e do fibrinogênio plasmático, efetuadas através do método do microhematócrito segundo metodologia descrita por Jain (1986); concentração de proteínas plasmáticas totais (PPT) (g/dl), determinada por meio do método de refratometria (COLES, 1984); concentração de hemoglobina, dosada através do método de oxihemoglobina e centrifugação da amostra a 1.000 X g por 10 minutos para a determinação da densidade óptica no fotolorímetro (Klett Summerson®), e correção do valor para a unidade de hemoglobina (CAMPBELL; DEIN, 1984); contagens de hemácias, leucócitos totais e trombócitos realizadas em hemocitômetro, utilizando-se a solução de Natt e Herrick (NATT; HERRICK, 1951) (**Anexo VI**).

A contagem de leucócitos e plaquetas foi realizada na diluição de 1/20 e a contagem de hemácias na diluição de 1/200 (Figura 1f). Foram contados os leucócitos e plaquetas do quadrante 1 mm³ central (25 subdivisões do retículo melhorado da câmara de Neubauer) e; os eritrócitos foram contados neste mesmo quadrante em 1/5 de mm³ (cinco subdivisões do retículo melhorado central da câmara de Neubauer). Os respectivos fatores de correção para as contagens totais de leucócitos e plaquetas e de eritrócitos foram o número de células contadas vezes 200 e 10.000, respectivamente; considerando-se área, altura da câmara e diluição.

A contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa para determinação dos valores relativos e posteriormente dos valores absolutos de linfócitos, heterófilos, monócitos e basófilos.

Por meio de fórmulas padronizadas foram calculados os seguintes índices de Wintrobe: volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM).

3.8 Análises Estatística e Gráfica

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas, com três tratamentos na parcela e quatro avaliações em diferentes épocas nas subparcelas, com nove repetições por tratamento.

Para análise quantitativa dos diferentes parâmetros estudados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com grau de significância a 5% ($p < 0,05$), utilizando o software R (DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005) (**Anexos VII e VIII**). Os gráficos foram construídos no programa computacional Sigma Plot® (CHARLAND, 1995).



Fig. 1a – Sistema de identificação das aves, através de esparadrapo com o respectivo número da ave.



Fig. 1b – Vista frontal do galpão onde as aves foram alojadas. Observar proteção contra moscas e mosquitos.



Fig. 1c – Inoculação intramuscular de soro contendo *Borrelia anserina*



Fig. 1d – Coleta de sangue na veia alar.



Fig. 1e – Sistema de preservação e transporte de sangue para execução de análises clínicas.



Fig. 1f – Tubos contendo diluentes para dosagem de hemoglobina e contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Figura 1 – Registro fotográfico de algumas etapas referentes à identificação, alojamento, coleta, transporte e processamento de amostras sangüíneas de *Gallus gallus* expostos a *Argas miniatus* livres e infectados com *Borrelia anserina* e do grupo não exposto aos carrapatos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Período Pré-patente e Espiroquetemia

O exame dos esfregaços sangüíneos das aves experimentalmente infestadas por *Argas miniatus* infectados por *B. anserina* (Grupo 1), revelou grande número de espiroquetas (**Figuras 2a e 2b**). Os parâmetros biológicos de período pré-patente e de período de patência, para este grupo, tiveram valores médios em dias de $6 \pm 0,83$ e $5 \pm 1,96$, respectivamente (**Tabela 1**).

Os esfregaços sangüíneos das aves do grupo não exposto aos carrapatos (Grupo 3) e das aves expostas aos carrapatos livres de *B. anserina* (Grupo 2), mantiveram-se negativos durante todo o período experimental.

Tabela 1. Médias de período pré-patente e de período de patência de aves experimentalmente infestadas por *Argas miniatus* infectados por *Borrelia anserina* (Grupo 1).

Aves do grupo 1 (n = 9)	
Período pré-patente (dias)	$6 \pm 0,83$
Período de patência (dias)	$5 \pm 1,96$

Hutyra et al. (1947) e Bier (1985) relatam que o período pré-patente para *B. anserina* inoculada pelos carrapatos é de quatro a seis dias. Shommein e Khogali (1974), em um estudo experimental, observaram o período pré-patente de dois dias para as raças White Leghorn e Baladi (raça indígena) e, de um dia para a raça Fayoumi, após a inoculação por via endovenosa de 0,5 ml de sangue, coletado utilizando-se citrato de sódio como anticoagulante, de aves naturalmente infectadas.

McNeil et al. (1949) mantiveram em seu laboratório duas cepas por passagens seriadas através de pintinhos a cada cinco dias e, relatam que o maior número de dias nos quais encontraram o sangue de um pintinho contendo espiroquetas foi de 17, a média é de sete dias. Esta média está de acordo com os resultados obtidos para o período médio de patência no presente trabalho.

No início da infecção das aves do grupo 1, foram observadas de uma a seis espiroquetas por campo o que ocorreu a partir do quinto dia após a exposição aos carrapatos (DPE). O número médio máximo de espiroquetas foi atingido entre seis a nove DPE. A formação de aglomerados de *B. anserina* foi observada em sete aves. As espiroquetas começaram a desaparecer do sangue periférico por volta do 10º DPE e desapareceram completamente a partir do 13º DPE, tendo os esfregaços sangüíneos permanecido negativos até o 25º DPE (**Tabela 2**).

Tabela 2. Número médio de espiroquetas por esfregaço sangüíneo, após a transmissão de *Borrelia anserina* via vetor *Argas miniatus* em *Gallus gallus* (Grupo 1).

Número da ave	Número médio de espiroquetas por campo* de esfregaço sangüíneo em dias pós-exposição aos carrapatos (DPE)									
	1° a 4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13° a 25°
1	-	-	-	2	35***	17**	9	-	-	-
2	-	-	<1	25	40**	34**	15***	6**	<1	-
3	-	<1	>50	22	8***	6**	6**	<1	-	-
4	-	-	-	3	15	10**	<1	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	<1	30	7	3	-	-	-	-
7	-	-	<1	22	>50	>50	>50	9***	<1	-
8	-	-	-	<1	8	>50	17***	<1	-	-
9	-	6	>50	50**	10**	<1	-	-	-	-

*: Média de 50 campos. Microscópio Leitz - Aumento de 1500 X

** : pequenos aglomerados. ***: grandes aglomerados. -: negativo.

Marchoux e Salimbeni (1903) relataram que após o pico, as espiroquetas desaparecem da circulação não reaparecendo no sangue. A ave pode até caquetizar e morrer sem que as espiroquetas reapareçam no sangue. Estes dados também estão de acordo com Dickie e Barrera (1964), os quais relataram que a existência de aves “reservatórios” deste microrganismo por longo período, é relativamente rara ou não existe. Estes autores analisaram os esfregaços sangüíneos e cortes de tecido de aves inoculadas com sangue infectado e de aves que receberam macerados de tecidos destas aves inoculadas, os esfregaços sangüíneos do grupo que recebeu o inóculo se tornaram negativos por cerca de nove dias pós-infecção. E os esfregaços sangüíneos do grupo que recebeu macerados de tecidos permaneceram negativos até 28 dias após a infecção.

Apenas a ave número 5 do grupo 1, foi refratária à tentativa de transmissão da infecção, mas mesmo com os valores desta ave incluídos nas análises estatísticas, ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) no desvio padrão.

Para assegurar a eficiência da transmissão, os carrapatos utilizados no presente estudo foram infectados 26 dias antes de serem utilizados. Segundo Bier (1985), as espiroquetas podem ser encontradas em todo o organismo do carrapato 14 dias após estes terem se alimentado em uma ave infectada.

No presente estudo foi observada também no grupo 1, uma alteração na consistência do sangue, que se tornou aquosa a partir do 5° DPE. Embora inespecífica, esta alteração fornece ao clínico, evidências imediatas de anormalidade, neste caso, possivelmente, relacionada ao processo anêmico desenvolvido. Não foram encontrados registros deste fenômeno na literatura. Nos grupos 2 e 3, a consistência sanguínea se manteve normal até o final do experimento.

4.2 Aspectos Clínicos da Infecção

A partir do 6° DPE, as aves 1, 4 e 9 do grupo 1 apresentaram os seguintes sinais clínicos: penas arrepiadas, crista pálida, sonolência e perda do apetite. Estes sintomas continuaram até o 12° DPE. No 7° DPE foram observados estes mesmos sintomas nas aves 2, 3, 6, 7 e 8, também perdurando até o 12° DPE (**Figuras 2c e 2d**). No 13° DPE as aves obtiveram uma melhora, retornando a alimentarem-se normalmente.

Boero (1967) relatou que o período de incubação foi de cinco a oito dias desde a picada dos carrapatos infectantes até a aparição da sintomatologia clínica. Sendo o período de incubação, inversamente proporcional à virulência e quantidades de espiroquetas inoculadas pelos carrapatos. Segundo Marchoux e Salimbeni (1903), as aves infectadas apresentam diarréia esverdeada, param de se alimentar, ficam sonolentas, com as penas eriçadas e crista pálida.

Boero (1967) relatou também, que a infiltração cérebro espinhal pelas espiroquetas deve-se a sua característica de neurotropismo, fenômeno responsável pelo estado de torpor, letargia e profunda sonolência nas aves enfermas. McNeil et al. (1949) e Boero (1967), descreveram que as aves tornam-se apáticas e freqüentemente assumem uma posição agachada. Diab e Soliman (1977) relacionaram a espiroquetose aviária como causa de anemia severa, emaciação e alta mortalidade nas aves.

No presente trabalho, observou-se diarréia esverdeada a partir do 7º DPE, perdurando até o 12º (**Figuras 2e, 2f, 3e e 3f**). As aves do grupo 2 e do grupo 3, não apresentaram alteração de coloração nas fezes (**Figuras 3a, 3b, 3c e 3d**). Boero (1967) relatou a ocorrência de séria inflamação intestinal e derrames biliares que tingem as fezes de uma cor verde intensa, além de provocar um grande peristaltismo com evacuações fétidas esverdeadas.

Em um estudo experimental, Bandopadhyay e Vegad (1984) observaram a diarréia verde característica do 3º ao 6º dias após a inoculação intramuscular de 0,2 ml de sangue infectado. Este autores sugeriram que a alteração na cor das fezes pode ser uma consequência da enterite e hemossiderose.

As alterações clínicas determinadas por esta enfermidade podem evoluir para um quadro de hipotermia, podendo ocorrer transtornos paralíticos e morte, do contrário pode ocorrer cura espontânea (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; HUTYRA et al., 1947). No presente trabalho não ocorreu morte de aves em nenhum dos grupos experimentais, tendo as aves do grupo 1 (aves infectadas por *B. anserina*) apresentado auto-cura.

4.2.1 Perda de peso

Segundo o Guia de Manejo (2004), os pesos corporais das aves, devem ser verificados periodicamente durante o período de crescimento até que alcancem a produção máxima. É importante que se pese as aves antes de uma troca programada de alimento.

Não houve diferença significativa entre as médias dos pesos dos grupos até a quarta pesagem ($p > 0,05$) (**Tabela 3, Gráfico 1**). Na quinta pesagem, realizada no 10º DPE, o grupo 1 foi o único a perder peso e a média dos pesos deste grupo diferiu significativamente ($p < 0,05$) com relação aos demais grupos. Este fato se deve, provavelmente, à ausência de interesse pelo alimento devido ao estado de torpor e letargia, no qual estas aves se encontravam durante a fase de espiroquetemia. Uma semana depois, as aves já retornaram a ganhar peso, devido à melhora do estado geral e o desaparecimento das espiroquetas da circulação sanguínea. Estes dados confirmam os achados de Marchoux e Salimbeni (1903), os quais relataram que se o animal sobreviver, o estado geral melhora. Segundo estes autores, o peso da ave que desde o início da doença diminui rapidamente, volta a aumentar.

A ave de número 5 pertencente a este grupo, a qual não apresentou espiroquetas na circulação e nem sintomatologia clínica, foi a única que obteve ganho de peso. Todos os outros grupos ganharam peso normalmente como o esperado.



Fig. 2a – Esfregaço sanguíneo periférico mostrando hemácias e espiroquetas.

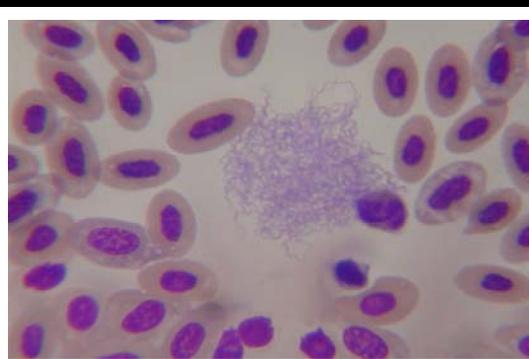


Fig. 2b – Esfregaço sanguíneo periférico mostrando hemácias e aglomerado de espiroquetas.



Fig. 2c – Aves com aspecto sonolento, as quais permaneciam sem interesse pelo alimento.



Fig. 2d – Ave com penas arrepiadas, sonolência e perda do apetite.



Fig. 2e – Alteração da coloração das fezes, as quais tornaram-se diarréicas e esverdeadas.



Fig. 2f – Melhora da consistência e coloração, após a fase de espiroquetemia.

Figura 2 – Registro fotográfico da microscopia ótica de esfregaços corados pelo método Giemsa, aves clinicamente enfermas e aspecto das fezes das aves do grupo infectado por *Borrelia anserina* (aves do grupo 1).



Fig. 3a - Aves do grupo não exposto aos carrapatos.



Fig. 3b - Fezes normais observadas no chão da gaiola do grupo referido na Fig. 3a.



Fig. 3c - Aves do grupo infestado por *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*.



Fig. 3d - Fezes normais observadas no chão da gaiola do grupo referido na Fig. 3c.



Fig. 3e - Aves do grupo infestado por *Argas miniatus* infectados por *Borrelia anserina*.



Fig. 3f - Fezes com aspecto diarréico, com coloração esverdeada, observadas no chão da gaiola do grupo referido na Fig. 3e.

Figura 3 - Registro fotográfico das aves dos grupos experimentais e aspecto das respectivas fezes.

Tabela 3. Valores das médias dos pesos de *Gallus gallus* durante o período experimental. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*).

Pesagens	Valores de média* do grupo 1	Valores de média* do grupo 2	Valores de média* do grupo 3
Primeira	0,352 ± 0,12	0,390 ± 0,13	0,372 ± 0,09
Segunda	0,450 ± 0,15	0,534 ± 0,19	0,533 ± 0,15
Terceira	0,742 ± 0,18	0,778 ± 0,19	0,833 ± 0,17
Quarta	1,150 ± 0,25	1,261 ± 0,26	1,166 ± 0,16
Quinta	1,051 ± 0,17	1,322 ± 0,27	1,227 ± 0,12
Sexta	1,219 ± 0,19	1,419 ± 0,25	1,371 ± 0,13

* Valores de média ± desvio padrão; (n=9).

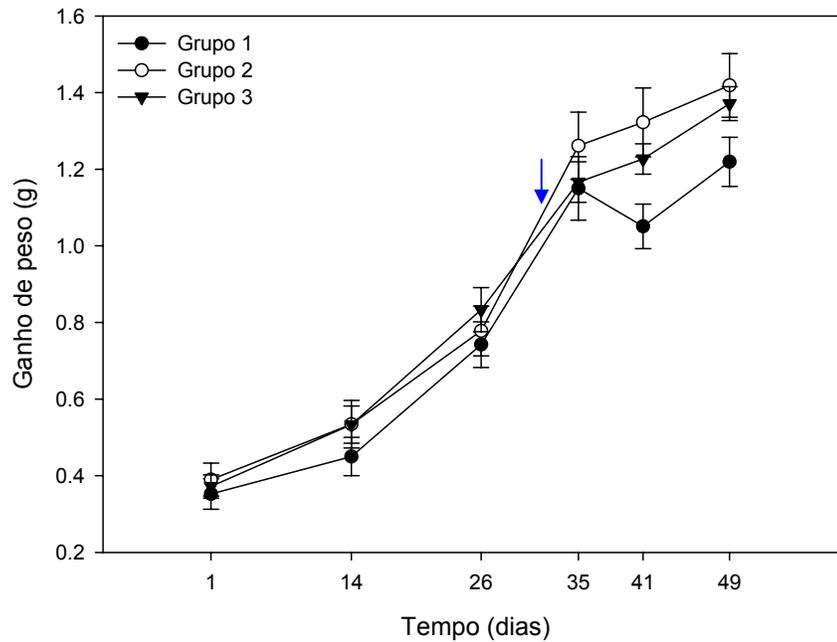


Gráfico 1. Representação gráfica da dinâmica de ganho de peso de *Gallus gallus* durante o período experimental. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos). Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

4.3 Análises Hematológicas

Os valores obtidos nas análises hematológicas de cada grupo experimental, referentes à contagem de eritrócitos, volume globular (VG), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), hemoglobina, trombócitos, proteína plasmática total (PPT), fibrinogênio, leucócitos, contagem absoluta de linfócitos, heterófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos; estão representados nas **Tabelas 4 a 11**.

Foram utilizados controles internos dentro do grupo experimental e do próprio indivíduo, os quais foram submetidos às mesmas condições experimentais, que são considerados mais fidedignos do que os valores referenciais externos.

4.3.1 Hemograma e contagem de trombócitos

Os resultados da hematologia das aves do grupo 2 com relação ao VG (Gráfico 2), o número de eritrócitos (**Gráfico 3**), a dosagem de hemoglobina (**Gráfico 4**) e a CHGM (**Gráfico 5**) apresentaram-se próximos e até mais elevados do que os do grupo não exposto aos carrapatos.

Os resultados destes mesmos valores hematológicos para o grupo 1 em oito DPE se mostraram significativamente ($p < 0,05$) menores do que os valores dos demais grupos. Estes valores tiveram uma queda significativa no período correspondente ao de maior número de espiroquetas encontradas na circulação sanguínea, detectado através dos esfregaços de sangue. Em 18 DPE, estes valores apresentaram um aumento tendendo a se normalizarem.

Shommein e Khogali (1974) relataram a ocorrência de marcante diminuição do número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina no sangue de aves parasitadas por *B. anserina*. O mesmo fenômeno foi observado no presente estudo.

No presente trabalho, os valores de volume globular médio não diferiram significativamente entre os três grupos ($p > 0,05$).

De acordo com os índices de Wintrobe (WINTROBE, 1933) analisados (VGM e CHGM), os quais classificam anemias e avaliam se a medula óssea produz hemácias de tamanho e com conteúdo de hemoglobina normal ou não, as aves do grupo 1 apresentaram um quadro de anemia normocítica normocrômica, quadro este, associado à ausência de resposta medular na compensação da anemia.

Anemia em aves é causada pelos mesmos mecanismos dos mamíferos tais como diminuição na produção de eritrócitos, sua destruição, ou perda de sangue (RUPLEY, 1999). Bandopadhyay e Vegad (1983), relataram que a anemia apresentada no quadro clínico da borreliose aviária pode ser causada pela destruição de eritrócitos em grande excesso ou por sua produção diminuída. Segundo Hutyra et al. (1947), essa diminuição da produção de eritrócitos ocorre devido à multiplicação inicial das espiroquetas no fígado, baço e medula óssea e a causa da destruição se atribui, provavelmente à substâncias tóxicas.

As contagens de trombócitos de todos os grupos diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$) (**Gráfico 6**). A oscilação na evolução dos resultados da contagem de trombócitos não detectou alterações na interpretação dos dados pertinentes ao experimento, uma vez que estes dados obtidos apresentaram-se variáveis, principalmente no último tempo do controle, o que denota a possibilidade de variação fisiológica. Este fato permite considerar que a plaquetometria não mostrou sensibilidade para detectar alterações nas aves experimentalmente infectadas por *B. anserina*.

Ocorreu um aumento significativo no valor de proteínas plasmáticas totais do grupo 1 no hemograma do oitavo DPE ($p < 0,05$) (**Gráfico 7**). Tais alterações denotam a necessidade de estudos complementares para elucidar quais as frações protéicas gerais e específicas foram alteradas. Hiperproteinemia em aves pode ocorrer devido à hiperglobulinemia ou desidratação. Em função do estado clínico de diarreia no qual as aves se encontravam, pode-se supor um efeito de hemoconcentração nos resultados do hemograma do grupo 1, que poderá ser confirmado através da realização de estudos posteriores do proteinograma.

Os valores de determinação de fibrinogênio não diferiram significativamente ($p > 0,05$) nas aves dos três grupos experimentais, o que se supõe, que tal como os trombócitos, nas condições experimentais deste estudo, não houve sensibilidade técnica para detectar anormalidades neste parâmetro.

4.3.2 Leucograma

O grupo 2, exposto aos carrapatos não infectados, não apresentou alterações significativas no leucograma ($p > 0,05$), quando comparado ao grupo controle.

Um processo de leucocitose significativa ($p < 0,05$) foi observado no grupo 1, em oito e dezoito dias após a exposição aos carrapatos (**Gráfico 8**), indicando uma resposta ao estado infeccioso.

Com relação à contagem diferencial dos leucócitos do grupo 1, os heterófilos predominaram nas fases iniciais do processo inflamatório, com uma heterofilia significativa ($p < 0,05$) observada oito e 18 DPE (**Gráfico 9**). As alterações nas contagens de heterófilos acompanharam paralelamente as mudanças na contagem total de leucócitos. Isto pode ser explicado conforme Jain (1986), que relatou que durante a inflamação aguda em galinhas, o desenvolvimento de leucocitose é o resultado da heterofilia.

Em função do discreto aumento dos valores das contagens de monócitos ter se manifestado apenas com relação aos valores referenciais descritos na literatura, e não aos dos controles, estes valores foram considerados dentro da normalidade. Uma monocitose significativa ($p < 0,05$) no grupo 1 se apresentou em oito e 18 DPE (**Gráfico 10**). Este aumento no número de monócitos pode ser explicado devido a uma maior demanda de células fagocitárias do sistema mononuclear fagocitário (SMF) indiretamente em decorrência de esplenomegalia, conforme descrito por Boero (1967); Bier (1985); Cooper e Bickford (1993). Esta esplenomegalia também pode estar associada à estimulação antigênica parasitária. Os achados de Bandopadhyay e Vegad (1983) sugerem que a esplenomegalia foi causada por uma reação inflamatória envolvendo uma resposta exagerada de macrófagos, hiperplasia reticular, eritrofagocitose e hemossiderose.

Além disso, segundo Campbell e Coles (1986) e Rupley (1999), a monocitose em aves, usualmente é descrita como uma consequência de doenças crônicas tais como lesões granulomatosas, infecções fúngicas e bacterianas e de necrose tecidual.

No presente trabalho, a heterofilia e a monocitose tiveram correlações significativas e positivas com a leucocitose (**Anexo VIII**).

O aumento nas contagens de linfócitos das aves do grupo 1 foi observado apenas em 18 DPE (**Gráfico 11**). Sendo que, a linfocitose teve correlação negativa com a leucocitose e com a monocitose, sem diferenças estatísticas significativas.

As médias da relação heterófilo/linfócito (H/L) obtidas em oito DPE para os grupos 1 e 2 foram $0,66 \pm 0,38$ e $0,57 \pm 0,51$ (média \pm desvio padrão), com uma variação nos valores médios de 0,32 a 1,38 e 0,26 a 1,89 respectivamente. A média da

relação H/L para o grupo exposto aos carrapatos infectados foi $1,50 \pm 0,95$, com uma variação de 0,22 a 2,73 em oito DPE. O aumento destas taxas no grupo 1, demonstrado no **Gráfico 12**, ocorreu como resultado de uma marcada heterofilia e uma pequena diminuição dos valores de linfócitos sem diferir do grupo controle. Em 18 DPE ocorreu uma diminuição da média da proporção H/L do grupo 1 em decorrência da linfocitose, que segundo Jain (1986), possui uma correlação negativa com esta taxa.

No presente trabalho, o aumento da relação H/L teve uma correlação significativa e positiva com a heterofilia com a monocitose e com a leucocitose e, possivelmente com o aumento nas proteínas plasmáticas (**Anexo VIII**).

Noriega (2000) relatou que na maioria das espécies aviárias, a percentagem de linfócitos é maior do que qualquer outro elemento celular, compreendendo entre 40 a 70% das contagens totais, sendo os heterófilos o segundo grupo.

O aumento nas taxas de H/L durante os primeiros estágios de inflamação foram o resultado primário do desenvolvimento de heterofilia. Jain (1986) recomendou que ao interpretar taxas de H/L, deve-se lembrar que taxas aumentadas também podem resultar de linfopenia quando as contagens de heterófilos permanecem dentro dos intervalos de referência, o que não ocorreu no presente experimento.

As contagens de eosinófilos não diferiram da normalidade. Ocorreu uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as contagens de eosinófilos dos três grupos, apenas em três DPE (**Gráfico 13**). Este fato pode ter ocorrido devido à pequena quantidade normal destas células no sangue.

Os resultados gerais obtidos para o leucograma, corroboram com os resultados descritos por Boero (1967).

Tabela 4. Variáveis observadas no hemograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) três dias antes da exposição aos carrapatos.

Variáveis	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	1,8	2,7	2,2 ± 0,3	1,5	2,8	2,1 ± 0,5	1,7	3,0	2,3 ± 0,4
VG (%)	29,0	35,0	31,0 ± 1,9	25,0	34,0	29,0 ± 2,8	27,0	32,0	29,0 ± 1,4
VGM (fl)	118,52	166,67	143,98 ± 13,8	110,71	206,67	144,26 ± 30,6	100,00	177,78	131,13 ± 26,0
CHGM (%)	19,67	44,84	30,46 ± 8,4	26,43	56,67	35,56 ± 10,9	25,19	30,67	27,53 ± 1,8
Hemoglobina (g/dL)	5,9	13,9	9,4 ± 2,8	7,4	15,3	10,2 ± 2,9	6,8	9,2	8,1 ± 0,7
Trombócitos (x 10 ³ /μL)	12,0	45,2	37,1 ± 10,9	8,6	49,6	35,3 ± 12,3	7,8	41,6	32,5 ± 10,3
PPT (g/dl)	3,4	4,2	3,7 ± 0,3	3,4	5,0	4,0 ± 0,5	3,6	5,0	4,0 ± 0,5
Fibrinogênio	200	600	400 ± 132,3	200	500	311 ± 105,4	200	600	311 ± 145,3

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n = 9)

Tabela 5. Variáveis observadas no leucograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) três dias antes da exposição aos carrapatos.

Variáveis (x 10 ³)	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Leucócitos	14,000	26,000	19,733 ± 4,6	8,200	27,400	17,044 ± 6,3	12,600	28,400	20,200 ± 5,2
Linfócitos	6,15	18,46	10,68 ± 4,2	5,248	11,8	9,06 ± 2,0	4,536	20,448	13,10 ± 4,7
Heterófilos imaturos	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0
Heterófilos maduros	3,358	8,064	6,21 ± 1,5	0,88	16,044	5,77 ± 4,8	1,992	5,472	3,42 ± 1,2
Monócitos	1,68	3,366	2,67 ± 0,6	0,924	11,842	3,29 ± 3,5	1,914	4,828	3,43 ± 0,9
Eosinófilos	0,00	0,99	0,17 ± 0,3	0,00	0,616	0,14 ± 0,2	0,00	0,664	0,22 ± 0,3
Basófilos	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n=9)

Tabela 6. Variáveis observadas no hemograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) três dias após a exposição aos carrapatos.

Variáveis	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	1,6	2,5	2,2 ± 0,3	1,6	2,6	2,1 ± 0,4	1,6	2,6	2,1 ± 0,4
VG (%)	26,0	32,0	28,0 ± 2,0	25,0	30,0	28,0 ± 1,6	24,0	37,0	28,0 ± 4,0
VGM (fl)	108,00	162,50	129,49 ± 19,9	111,54	162,50	136,18 ± 22,0	92,31	217,65	140,64 ± 36,5
CHGM (%)	28,33	35,38	31,7 ± 2,7	30,00	36,00	31,76 ± 1,8	22,97	35,42	30,51 ± 4,2
Hemoglobina (g/dL)	8,1	9,3	8,8 ± 0,4	8,0	9,2	8,9 ± 0,4	7,3	9,4	8,5 ± 0,6
Trombócitos (x 10 ³ /μL)	14,8	72,0	46,5 ± 15,4	34,2	62,2	44,7 ± 9,1	26,0	50,0	38,8 ± 9,2
PPT (g/dl)	3,2	3,6	3,44 ± 0,2	3,2	5,2	3,8 ± 0,6	3,4	4,6	3,9 ± 0,4
Fibrinogênio	200	600	311 ± 145,3	200	600	311 ± 145,3	200	600	422 ± 120,2

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n=9)

Tabela 7. Variáveis observadas no leucograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) três dias após a exposição aos carrapatos.

Variáveis (x 10 ³)	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Leucócitos	12,600	34,400	21,644 ± 7,2	14,800	30,000	19,822 ± 5,5	20,800	37,600	27,933 ± 5,7
Linfócitos	5,61	20,984	12,52 ± 4,9	5,772	16,728	11,37 ± 3,5	12,272	23,04	16,42 ± 3,7
Heterófilos imaturos	0,00	0,696	0,25 ± 0,3	0,00	0,26	0,03 ± 0,1	0,00	0,568	0,23 ± 0,2
Heterófilos maduros	2,016	7,48	4,51 ± 1,8	2,064	11,7	5,69 ± 3,0	3,276	11,28	6,85 ± 2,6
Monócitos	0,664	5,848	2,47 ± 1,8	0,74	9,3	2,66 ± 2,6	1,45	5,64	3,37 ± 1,2
Eosinófilos	0,00	0,882	0,55 ± 0,4	0,00	0,52	0,08 ± 0,2	0,272	1,856	1,07 ± 0,5
Basófilos	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n=9)

Tabela 8. Variáveis observadas no hemograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) oito dias após a exposição aos carrapatos.

Variáveis	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	1,8	3,7	2,3 ± 0,6	1,8	2,6	2,2 ± 0,3	1,2	2,1	1,8 ± 0,3
VG (%)	26,0	37,0	29,0 ± 3,4	29,0	40,0	31,0 ± 3,5	20,0	31,0	26,0 ± 3,4
VGM (fl)	75,68	176,19	135,51 ± 31,2	119,23	161,11	144,77 ± 12,7	126,32	166,67	145,29 ± 15,6
CHGM (%)	22,70	32,59	29,06 ± 3,1	24,50	29,67	28,03 ± 1,5	23,21	30,83	26,87 ± 2,6
Hemoglobina (g/dL)	7,6	9,0	8,4 ± 0,5	8,0	9,8	8,7 ± 0,6	5,1	8,2	7,0 ± 0,9
Trombócitos (x 10 ³ /μL)	32,0	51,8	42,2 ± 8,4	40,2	62,8	48,6 ± 5,9	24,6	44,4	36,0 ± 6,7
PPT (g/dl)	3,2	4,0	3,7 ± 0,3	3,0	5,2	3,8 ± 0,7	3,8	5,8	4,7 ± 0,6
Fibrinogênio	200	600	333 ± 141,4	200	600	356 ± 166,7	200	800	444 ± 194,4

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n=9)

Tabela 9. Variáveis observadas no leucograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) oito dias após a exposição aos carrapatos.

Variáveis (x 10 ³)	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Leucócitos	14,000	33,000	22,156 ± 6,2	8,800	24,000	16,644 ± 4,7	18,600	49,800	34,311 ± 8,5
Linfócitos	5,04	17,88	11,15 ± 4,3	5,808	12,416	9,33 ± 2,2	4,092	26,268	12,48 ± 6,4
Heterófilos imaturos	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0
Heterófilos maduros	2,12	13,5	6,79 ± 3,5	1,848	12,24	4,92 ± 3,2	5,97	29,88	14,53 ± 7,5
Monócitos	1,5	5,94	3,05 ± 1,5	0,498	5,28	2,36 ± 1,5	2,952	11,02	7,22 ± 2,7
Eosinófilos	0,00	0,25	0,06 ± 0,1	0,00	0,224	0,04 ± 0,1	0,00	0,398	0,08 ± 0,2
Basófilos	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n=9)

Tabela 10. Variáveis observadas no hemograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) 18 dias após a exposição aos carrapatos.

Variáveis	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	1,7	2,9	2,3 ± 0,4	2,0	3,4	2,5 ± 0,4	1,6	2,6	1,9 ± 0,3
VG (%)	27,0	31,0	29,0 ± 1,4	26,0	36,0	31,8 ± 3,4	28,0	32,0	30,0 ± 1,1
VGM (fl)	96,43	164,71	131,58 ± 22,5	100,00	154,55	127,43 ± 17,5	123,08	193,75	157,48 ± 23,0
CHGM (%)	25,81	32,41	29,32 ± 2,1	22,06	34,64	27,62 ± 3,9	18,33	34,64	25,07 ± 4,6
Hemoglobina (g/dL)	7,7	9,4	8,6 ± 0,6	6,4	10,1	8,8 ± 1,4	5,5	9,7	7,5 ± 1,2
Trombócitos (x 10 ³ /μL)	15,0	43,6	28,6 ± 10,9	24,0	54,0	41,0 ± 9,5	27,2	72,6	47,40 ± 14,3
PPT (g/dl)	3,6	4,2	3,8 ± 0,2	3,2	5,0	3,9 ± 0,6	3,4	5,4	4,5 ± 0,7
Fibrinogênio	200	600	356 ± 166,7	200	200	200 ± 0,0	200	800	444 ± 218,6

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n=9)

Tabela 11. Variáveis observadas no leucograma de *Gallus gallus*. Grupo 3 (aves não expostas a *Argas miniatus*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*) 18 dias após a exposição aos carrapatos.

Variáveis (x 10 ³)	Grupo 3			Grupo 2			Grupo 1		
	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***	Inf*	Sup**	Média***
Leucócitos	11,400	28,200	19,289 ± 6,8	14,400	41,800	23,667 ± 8,6	22,800	84,400	55,067 ± 18,5
Linfócitos	6,726	17,202	11,12 ± 3,8	8,784	26,334	13,95 ± 5,5	11,856	34,604	22,58 ± 8,6
Heterófilos imaturos	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0
Heterófilos maduros	9,66	2,806	6,09 ± 2,7	3,456	10,8	6,92 ± 3,0	7,752	35,728	23,06 ± 7,9
Monócitos	0,6	4,332	2,07 ± 1,2	0,76	4,932	2,70 ± 1,3	3,192	21,1	9,35 ± 5,9
Eosinófilos	0,00	0,122	0,01 ± 0,0	0,00	0,836	0,09 ± 0,3	0,00	0,642	0,07 ± 0,2
Basófilos	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0	0,00	0,00	0,00 ± 0,0

* Limite inferior. ** Limite superior. *** Valores de média ± desvio padrão; (n=9)

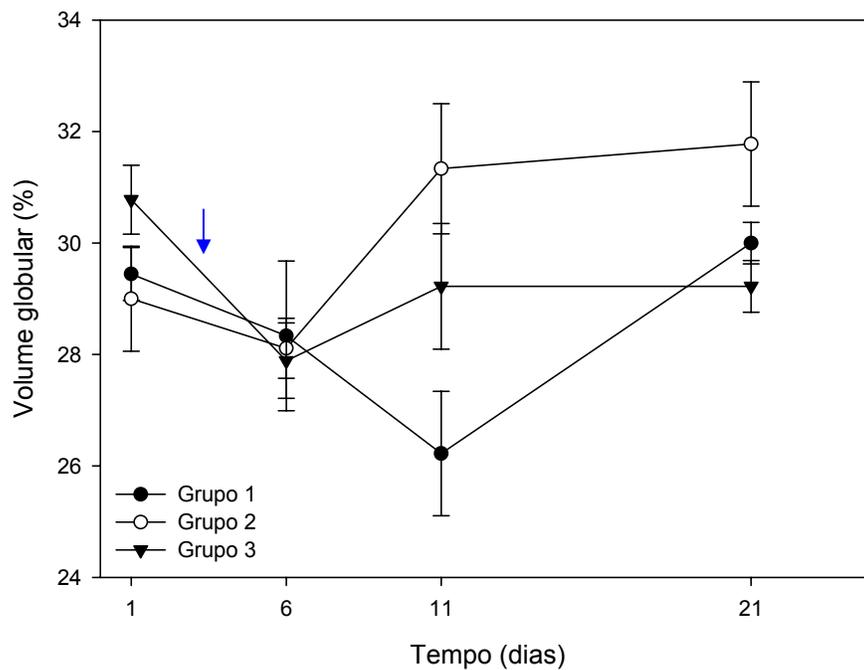


Gráfico 2. Alterações observadas no volume globular de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

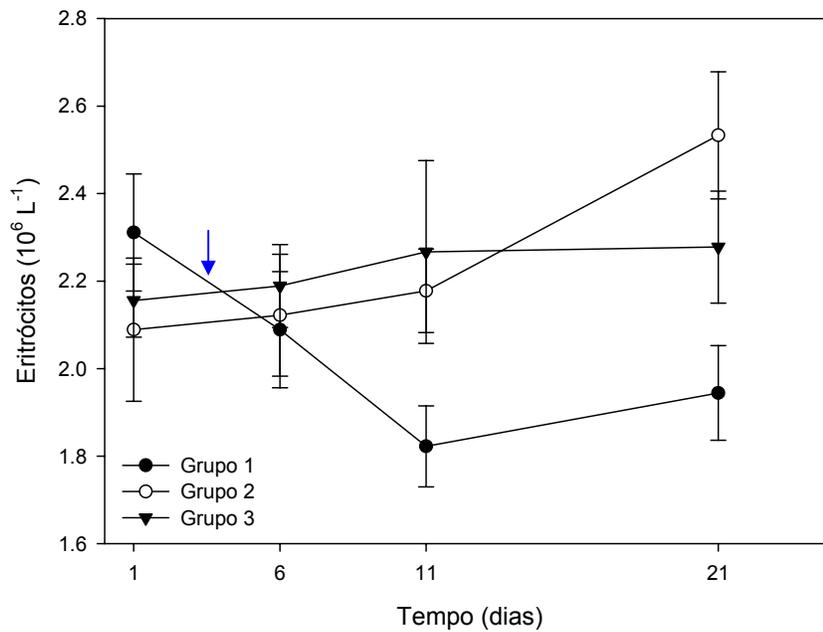


Gráfico 3. Alterações observadas na contagem de eritrócitos de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

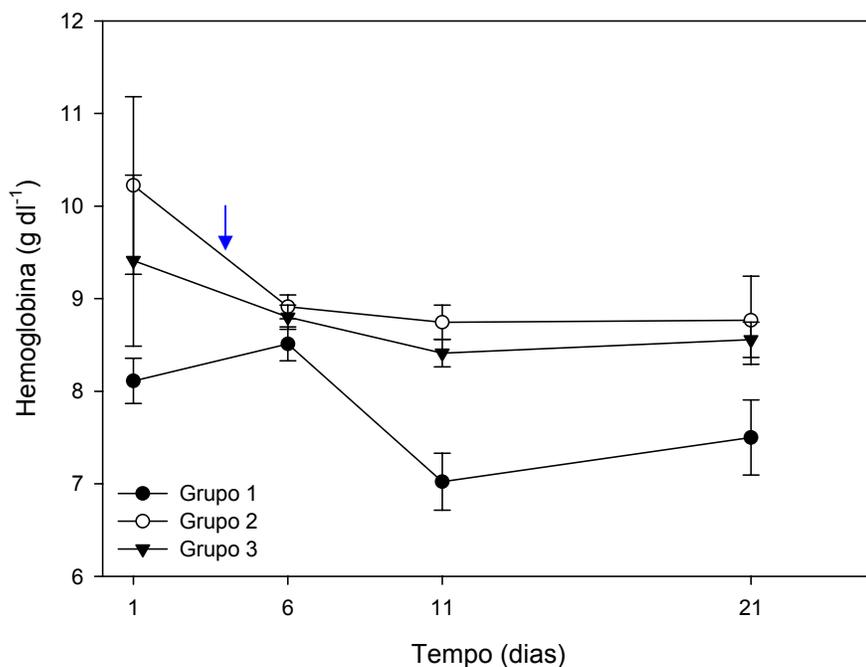


Gráfico 4. Alterações observadas nos valores de concentração de hemoglobina de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

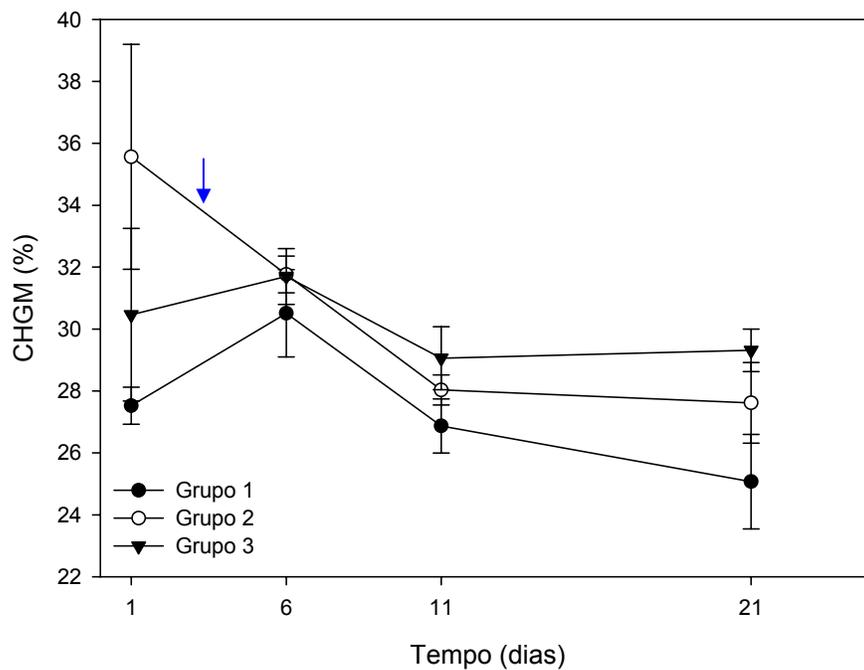


Gráfico 5. Alterações observadas nos valores de concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

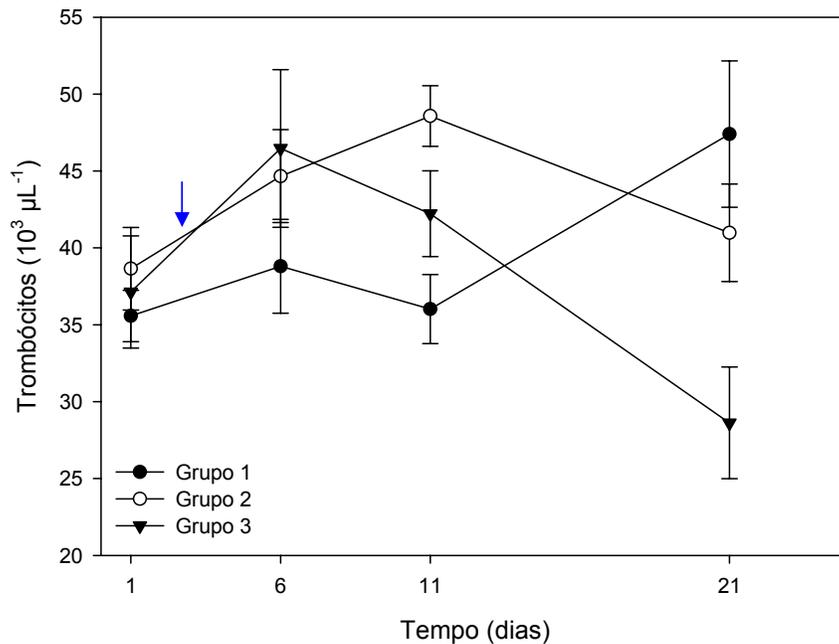


Gráfico 6. Alterações observadas nas contagens de trombócitos de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

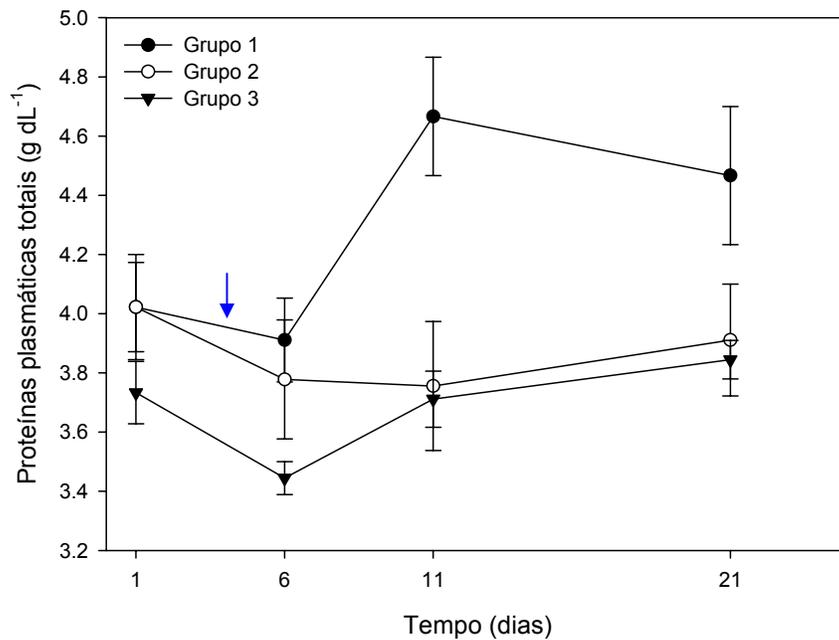


Gráfico 7. Alterações observadas nas dosagens de proteínas plasmáticas totais de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

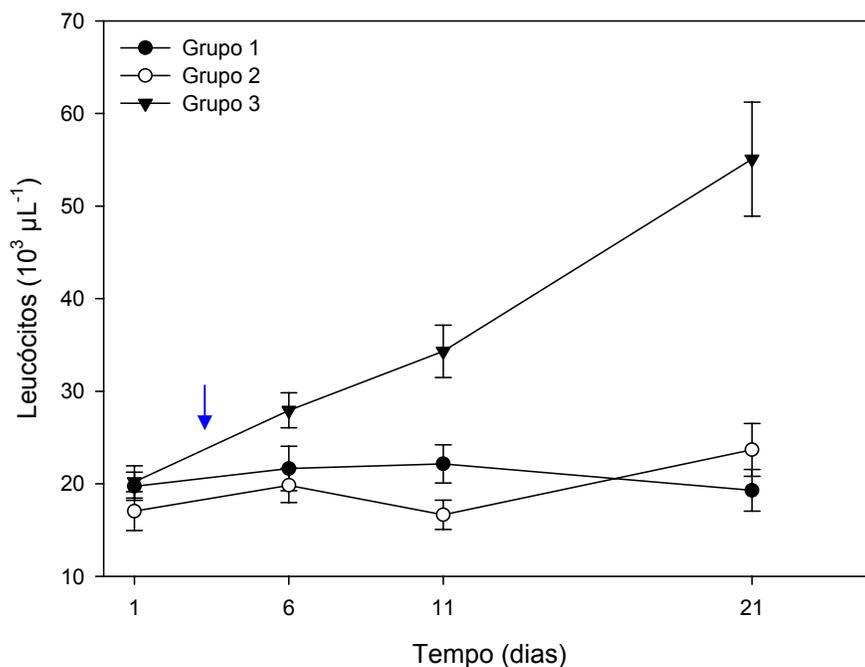


Gráfico 8. Alterações observadas nas contagens de leucócitos de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

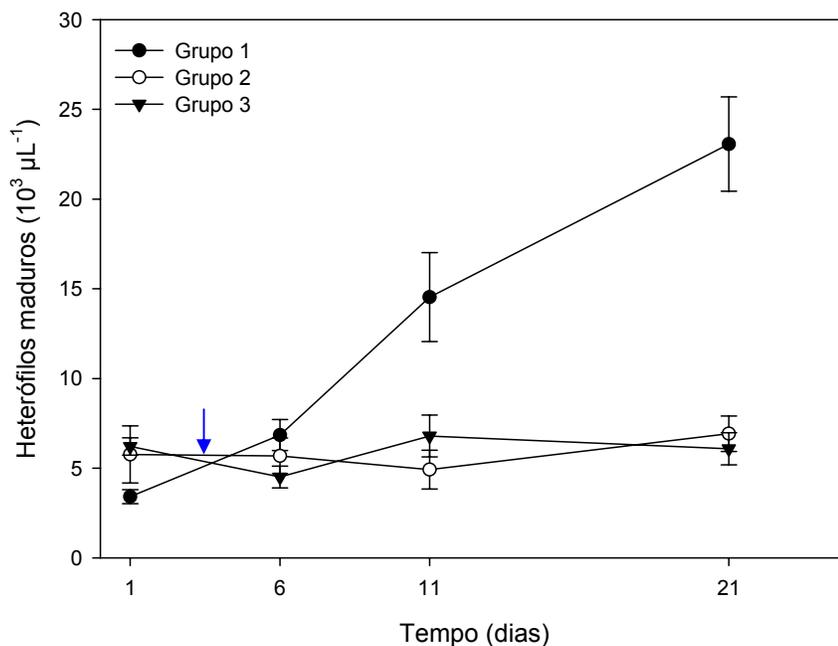


Gráfico 9. Alterações observadas nas contagens de heterófilos maduros de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

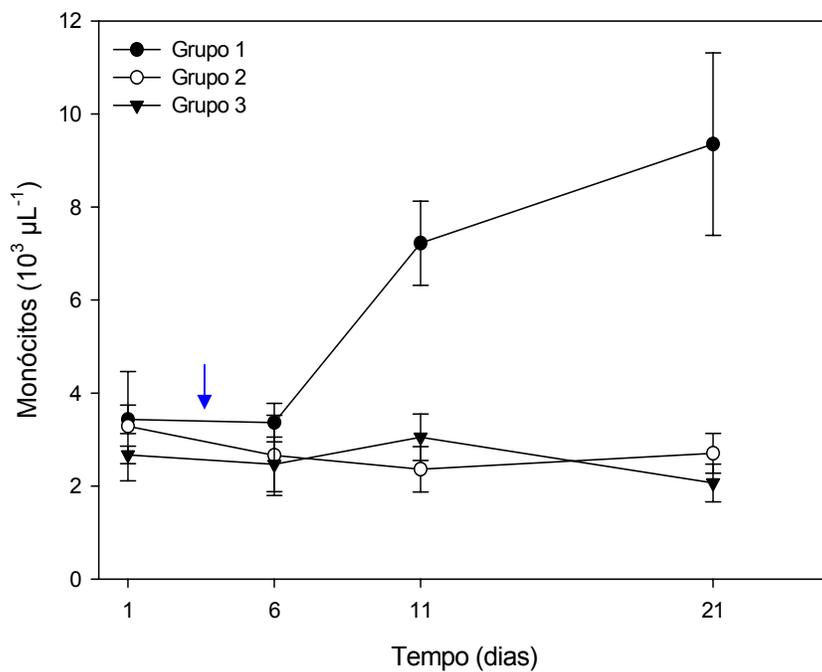


Gráfico 10. Alterações observadas nas contagens de monócitos de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

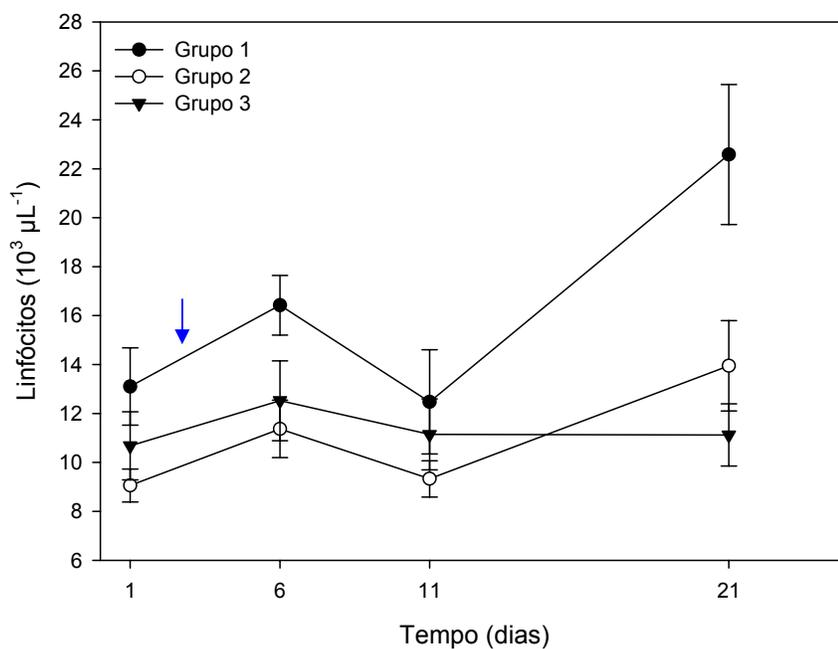


Gráfico 11. Alterações observadas nas contagens de linfócitos de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

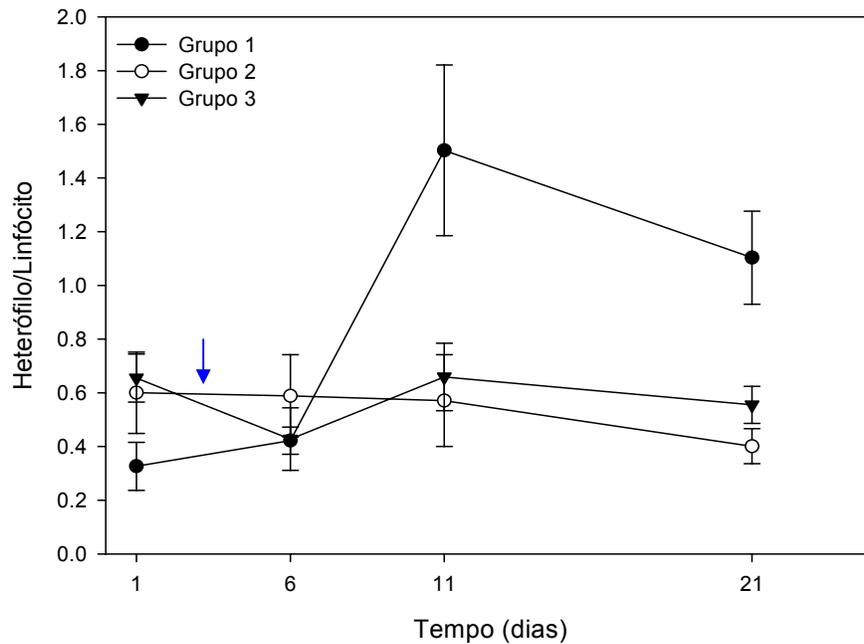


Gráfico 12. Alterações observadas nas relações heterófilo/linfócito de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

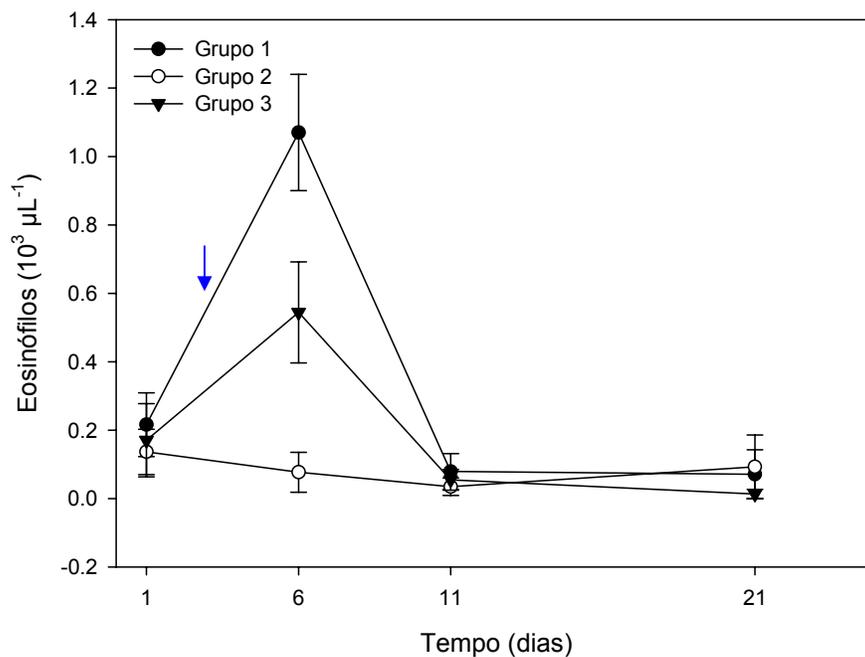


Gráfico 13. Alterações observadas nas contagens de eosinófilos de *Gallus gallus*. Grupo 1 (aves expostas a *Argas miniatus* infectados com *Borrelia anserina*), Grupo 2 (aves expostas a *Argas miniatus* livres de *Borrelia anserina*) e Grupo 3 (aves não expostas aos carrapatos), 6, 11 e 21 dias após o primeiro hemograma. Barras verticais indicam o desvio padrão em referência às médias. A seta azul indica o momento da exposição dos grupos 1 e 2 aos carrapatos.

5 CONCLUSÕES

1. O presente trabalho confirmou a transmissão experimental de *Borrelia anserina* por carrapatos adultos *Argas miniatus*, expostos em *Gallus gallus*;
2. Os parâmetros biológicos de período pré-patente e de período de patência para o grupo experimentalmente infestado com *A. miniatus* infectados por *B. anserina*, tiveram valores, médios, em dias de $6 \pm 0,83$ e $5 \pm 1,96$ respectivamente;
3. As aves infectadas apresentaram as seguintes alterações clínicas: apatia, palidez da crista, diarreia esverdeada, penas eriçadas e hiporexia e alterações hematológicas que cursaram paralelamente ao período de espiroquetemia, evoluindo para auto-cura;
4. A infecção por *B. anserina* determinou nas aves alterações hematológicas compatíveis com uma infecção bacteriana de média gravidade nas condições experimentais estabelecidas neste trabalho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRED, P. A note on the osmotic pressure of the blood of various animals. *Journal of Experimental Biology*, v. 17, p. 223-226, 1940.
- ANDERSON, E. L.; STEPHENS, J. F. Changes in the differential leukocyte count of chicks inoculated with *Salmonella*. *Applied Microbiology*, v. 19, n. 5, p. 726-730, 1970.
- APPEL, M. J. G.; ALLAN, S.; JACOBSON, R. H.; LAUDERDALE, T. L. CHANG, Y. F.; SHIN, S. J.; THOMFORD, J. W.; TODHUNTER, R. J.; SUMMERS, B. A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 167, n. 3, p. 651-664, 1993.
- AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen-5% carbon dioxide in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 12, p. 1103-1110, 1993.
- BANDOPADHYAY, A. C.; VEGAD, J. L. Observations on the pathology of experimental avian spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*, v. 35, n. 2, p. 138-144, 1983.
- BANDOPADHYAY, A. C.; VEGAD, J. L. Enteritis and green diarrhoea in experimental avian spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*, v. 37, n. 3, p. 381-382, 1984.
- BARBOUR, A. G. & HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.
- BENNETT, C. E. Ticks and Lyme disease. *Advances in Parasitology*, v. 36, p. 343-405, 1995.
- BIER, O. *Microbiologia e Imunologia*. 24.ed. Editora Melhoramentos. São Paulo. 1234p, 1985.
- BOERO, J. J. *Parasitosis Animales*. Editora Universidad de Buenos Aires. 498p, 1967.
- BONÉ, G. L'excrétion des spirochètes de Dutton chez *Ornithodoros moubata*. *C. R. Soc. Biol.*, v. 130, p. 84-85. 1939.
- BURGDORFER, W. *Manual of Clinical Microbiology*. Borrelia. Ed E. H. Lennette. 4^{ed}. Washington, American Society for Microbiology, pp 479-484, 1985.
- BURGDORFER, W.; SCHWAN, T. G. Borrelia. In: *Manual of clinical microbiology*, 5.ed. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shawdomy, eds. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 560-566, 1991.
- BRUMPT, E. *Précis de parasitologie*, Collection de Précis Médicaux Masson & Cie Éditeurs, 4.a ed. Paris, p. 1452, 1927.

- CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J. Avian Hematology. The Basics. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v. 14, n. 2, p. 223-248, 1984.
- CAMPBELL, T. W.; COLES, E. H. *Avian Clinical Pathology*. In: Coles, E. H. *Veterinary Clinical Pathology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 279-301, 1986.
- CAMPBELL, T. W. *Avian Hematology and Cytology*. 2th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1995.
- CHARLAND, M. B., Ph.D. *SigmaPlot for Scientists*. Wm. C. Brown Communications, Inc., 2460 Kerper Boulevard, Dubuque, Iowa, 52001, 1995.
- COLES, E. H. *Patologia Clínica Veterinária*. 3^a edição. Editora Manole, São Paulo. 566p, 1984.
- COOPER, G. L.; BICKFORD, A. A. Spirochetosis in California game chickens. *Avian Diseases*, v. 37, n. 4, p. 1167-1171, 1993.
- DALGLIESH, R. J. Theoretical and practical aspects of freezing parasitic protozoa. *Australian Veterinary Journal*, v. 48, n. 5, p. 233-239, 1972a.
- DaMASSA, A. J.; ADLER, H. E. Avian spirochetosis: natural transmission by *Argas (Persicargas) sanchezi* (Ixodoidea: Argasidae) and existence of different serologic and immunologic types of *Borrelia anserina* in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, v. 40, n. 1, p. 154-157, 1979.
- DEPARTAMENTO DE PESQUISAS DA HY-LINE INTERNACIONAL. *Hy-Line Variety Brown. Guia de Manejo*, 2002-2004. Disponível em: www.hylinedobrasil.com.br Acesso em: 01 jun. 2005.
- DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. 2005. URL <http://www.R-project.org>.
- DHAWEDKAR, R. G.; DHANESAR, N. S. Preservation of *Borrelia anserina* by liquid-nitrogen refrigeration. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 53, n. 10, p. 1124-1127, 1983.
- DIAB, F. M.; SOLIMAN, Z. R. An experimental study of *Borrelia anserina* in four species of *Argas* ticks. I. Spirochete localization and densities. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 53, n. 2, p. 201-202, 1977.
- DICKIE, C. W.; BARRERA, J. A Study of the carrier state of avian spirochetosis in the chicken. *Avian Diseases*, v. 8, n. 2, p. 191-195, 1964.
- FELSENFELD, O. *Borreliae*, human relapsing fever, and parasite-vector-host relationships. *Bacteriol. Rev.*, v.29, p. 46-74, 1965.
- GARG, R. R.; GAUTAM, O. P. Serological Diagnosis of Fowl Spirochetosis. *Avian Diseases*, v. 15, n. 1, p. 1-6, 1971.

- GRECCHI, R.; SALIBA, A. M.; MARIANO, M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. *The Journal of Pathology*, v. 130, n. 1, p. 23-31, 1980.
- HART, L. Freeze Preservation of *Borrelia anserina*. *Australian Veterinary Journal*, v. 46, n. 9, p. 455, 1970.
- HINSHAW, W. R.; McNEIL, E. Studies on a spirochaete found in the blood of sick turkeys. *Journal of Bacteriology*, v. 51, p. 599, 1946.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 787p, 1994.
- HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNINGER, R. *Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos*. Vol. 1. Editorial Labor, S.A., 739p, 1947.
- JAIN, N. C. The eosinophils. In: _____. *Schalm's veterinary hematology*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 27, p.731-755, 1986.
- KAUFMAN, W. R.; SAVER, J. R. Ion and water balance in feeding ticks: mechanisms of tick excretion, p. 213-244. In OBENCHAIN, F.D.; GALUN, R. (ed.), *Physiology of ticks*. Pergamon Press, Oxford. 1982.
- KOKOSHAROV, T. Changes in the white blood cells and specific phagocytosis in chicken with experimental acute fowl typhoid. *Veterinarski Arhiv*, v. 68, n. 1, p. 33-38, 1998.
- KOHL, G. M.; HOOGSTRAAL, H.; CLIFFORD, C. M.; KAISER, M. N. The subgenus *Persicargas* (Ixodoidea) *sanchesii* (Dugés) and *A. (P.) miniatus* (Koch), new world tick misidentified as *A. (P.) persicus*. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 63, p. 590-606, 1970.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1 8th Edition, Williams & Wilkins, London, p.57-62, 1984.
- LABRUNA, M. B., RESENDE, J. S., MARTINS, N. R. S., JORGE, M. A. Criopreservação de uma amostra de espiroqueta em nitrogênio líquido. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 6, p. 551-553, 1999. Disponível na World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000600008&Ing=pt&nrm=iso.
- LUBINSKY, G. Note on the use of Mc. Ilvaine's buffer solutions in staining blood protozoa. *Canadian Journal of Zoology*, v. 38, p. 437-438, 1960.
- MAGALHÃES, F. E. P. *Novos Aspectos Morfológicos, Biológicos e Tóxicos de Argas (Persicargas) miniatus Koch, 1844 (Ixodoidea, Argasidae) no Estado do Rio de Janeiro*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 95p., 1979.

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

McNEIL, E.; HINSHAW, W. R.; KISSLING, R. E. A study of *Borrelia anserina* infection (spirochetosis) in turkeys. *Journal of Bacteriology*, v. 57, n. 2, p. 191-206, 1949.

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

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.). *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP / UNESP, 375p, 2002.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science*, v. 31, p. 735-738, 1951.

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: 21 dez. 2005.

NORIEGA, M. L. V. C. *Apuntes de hematología aviar: material didático para curso de hematología aviária*. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de producción animal: Aves. México, 70p, 2000. (Apostila mimeo).

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

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

POWELL, P. C. Immune mechanisms in infections of poultry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 15, n. 1-2, p. 87-113, 1987.

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

RUPLEY, A. E. *Manual de Clínica Aviária*. In Rupley, A. E.: Patologia Clínica. São Paulo: Roca, pp 369-430, 1999.

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

SHARMA, J. M. Effect of infectious bursal disease virus on protection against Marek's disease by turkey herpesvirus vaccine. *Avian Diseases*, v. 28, p. 629-640, 1984.

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

SMIBERT, R. M. Isolation and identification of avian pathogens. *American Association of Avian Pathologists*. College Station, Texas, pp 21-22, 1980.

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. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v20n1/1398.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2004.

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

VERMA, R. K.; MULEY, A. R.; PRAO, K. N. Maintenance of *Borrelia anserina* under laboratory conditions. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 60, n. 12, p. 1394-1396, 1990.

WENYON, C. M. *Protozoology*. Vol.II. London. 1563p, 1926.

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of eritrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica. Internationales Magazin fur Slutforschung*, Leipzig, v. 51, p. 31, 1933.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela de Recomendações de Nutrição Durante o Período de Crescimento

PESO CORPORAL BROWN	Crescimento 6-8 semanas	Desenvolvimento 8-15 semanas
	até 690 g	até 1340 g
Nutrientes:		
Proteína, % (Mín.)	18,179	15,620
Energia Met., Kcal./Kg	2750	2800
Ácido Linoléico, % (Mín.)	1,455	1,536
Aminoácidos (Mín.):		
Lisina, %	0,915	0,742
Metionina, %	0,44	0,39
Metionina + Cistina, %	0,753	0,674
Triptofano, %	0,234	0,198
Treonina, %	0,70	0,60
Minerais (Mín.):		
Cálcio, %	1,0	1,0
Fósforo, Disponível, %	0,46	0,44
Sódio, %	0,18	0,18

DEPARTAMENTO DE PESQUISAS DA HY-LINE INTERNACIONAL. *Hy-Line Variety Brown. Guia de Manejo*. 2002-2004. Disponível em: www.hylinedobrasil.com.br
Acesso em: 01 jun. 2005.

ANEXO II

Composição das Rações:

Composição da ração, preparada sem coccidiostáticos e promotor de crescimento para a fase de crescimento, administrada quando as aves estavam com 44 dias.

CRESCIMENTO	
ALIMENTO	Quantidade
MILHO	55,731
FARELO DE SOJA	24,762
FARELO DE TRIGO	15,864
FOSFATO BICÁLCICO	1,805
CALCÁRIO CALCÍTICO	1,191
SAL	0,397
DL-METIONINA	0,152
SUPLEMENTO MINERAL-VITAMÍNICO	0,100
TOTAL	100,00 Kilos

Composição da ração, preparada sem coccidiostáticos e promotor de crescimento para a fase de desenvolvimento, administrada quando as aves estavam com 72 dias.

FINAL DE RECRIA	
ALIMENTO	energia 2.800 Kcal
MILHO	60,870
FARELO DE SOJA	17,649
FARELO DE TRIGO	17,855
FOSFATO BICÁLCICO	1,710
CALCÁRIO CALCÍTICO	1,286
SAL	0,396
DL-METIONINA 99	0,134
SUPLEMENTO MINERAL-VITAMÍNICO	0,100
TOTAL	100.000 kilos

ANEXO III

Consumo de Alimento Durante o Período de Crescimento.

Idade em Semanas	Consumo Diário		Consumo Acumulado	
	Gramas/Ave/Dia	Kcal/Ave/Dia	Gramas até a data	Kcal até a data
1	13	39	91	273
2	20	59	231	686
3	25	74	406	1204
4	29	88	609	1820
5	33	100	840	2520
6	37	113	1099	3311
7	41	124	1386	4179
8	46	141	1708	5166
9	51	157	2065	6265
10	56	172	2457	7469
11	61	189	2884	8792
12	66	204	3346	10220
13	70	216	3836	11732
14	73	225	4347	13307
15	75	231	4872	14924
16	77	234	5411	16562
17	80	239	5971	18235

DEPARTAMENTO DE PESQUISAS DA HY-LINE INTERNACIONAL. *Hy-Line Variety Brown. Guia de Manejo*. 2002-2004. Disponível em: www.hylinedobrasil.com.br
Acesso em: 01 jun. 2005.

ANEXO IV

Peso Corporal Ideal da Brown em Gramas Durante o Período de Crescimento:

Peso Corporal Ideal da BROWN em Gramas - Período de Crescimento -	
<u>Idade em Semanas</u>	<u>Ideal</u>
1	70
2	115
3	190
4	280
5	380
6	480
7	580
8	680
9	770
10	870
11	960
12	1050
13	1130
14	1210
15	1290
16	1430
Transferência 17	1480
18	1500

DEPARTAMENTO DE PESQUISAS DA HY-LINE INTERNACIONAL. *Hy-Line Variety Brown. Guia de Manejo*. 2002-2004. Disponível em: www.hylinedobrasil.com.br Acesso em: 01 jun. 2005.

ANEXO V

Ficha de Espiroquetemia:

Data:	Grupo 1									
Lâminas	Nº de espiroquetas por campo									
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										

ANEXO VI

Solução de Natt e Herrick	
Cloreto de sódio (Na Cl)	3,88 g
Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄)	2,50 g
Fosfato dissódico 12 hidrato (Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O)	2,91 g
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,25 g
Formalina (37%)	7,50 ml
Violeta de Metila 2B	0,10 g
pH final	7,3

Dissolver em água destilada e diluir para um volume total de 1.000 ml em um frasco volumétrico. Após descansar “overnight”, filtrar a solução através de um filtro de papel fino (Whatman No. 2).

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. *Poultry Science*, 31:735-738, 1951.

ANEXO VII

Análise de Variância:

Variável analisada: **PESO**

Opção de transformação: Raiz quadrada de Y + 1.0 - SQRT (Y + 1.0)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	0.053515	0.026757	1.713	0.2119
erro 1	16	0.249993	0.015625		
DATAS	5	2.997184	0.599437	199.541	0.0000
GRUPO*DATAS	10	0.026170	0.002617	0.871	0.5620
erro 2	128	0.384523	0.003004		
Total corrigido	161	3.711384			
CV 1 (%) =	9.13				
CV 2 (%) =	4.00				
Média geral:	1.3694971	Número de observações:		162	

Variável analisada: **ERITRÓCITOS**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	0.820185	0.410093	2.196	0.1437
erro 1	16	2.988148	0.186759		
DATAS	3	0.398148	0.132716	0.885	0.4524
GRUPO*DATAS	6	2.025741	0.337623	2.252	0.0465
erro 2	80	11.994074	0.149926		
Total corrigido	107	18.226296			
CV 1 (%) =	19.96				
CV 2 (%) =	17.89				
Média geral:	2.1648148	Número de observações:		108	

Variável analisada: **VOLUME GLOBULAR**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	43.555556	21.777778	2.393	0.1233
erro 1	16	145.611111	9.100694		
DATAS	3	75.962963	25.320988	3.750	0.0141
GRUPO*DATAS	6	122.370370	20.395062	3.021	0.0103
erro 2	80	540.166667	6.752083		
Total corrigido	107	927.666667			
CV 1 (%) =	10.30				
CV 2 (%) =	8.88				
Média geral:	29.2777778	Número de observações:		108	

Variável analisada: **HEMOGLOBINA**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	36.501667	18.250833	10.227	0.0014
erro 1	16	28.553333	1.784583		
DATAS	3	22.599537	7.533179	4.018	0.0102
GRUPO*DATAS	6	7.987963	1.331327	0.710	0.6424
erro 2	80	149.986667	1.874833		
Total corrigido	107	245.629167			
CV 1 (%) =	15.57				
CV 2 (%) =	15.96				
Média geral:	8.5805556	Número de observações:		108	

Variável analisada: **VOLUME GLOBULAR MÉDIO**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	1335.382177	667.691088	1.083	0.3621
erro 1	16	9862.691684	616.418230		
DATAS	3	581.051539	193.683846	0.353	0.7870
GRUPO*DATAS	6	5563.160118	927.193353	1.689	0.1343
erro 2	80	43906.106269	548.826328		
Total corrigido	107	61248.391786			
CV 1 (%) =	17.86				
CV 2 (%) =	16.86				
Média geral:	138.9793333	Número de observações:	108		

Variável analisada: **CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA GLOBULAR MÉDIA**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	214.823449	107.411725	5.364	0.0165
erro 1	16	320.391258	20.024454		
DATAS	3	354.441958	118.147319	4.943	0.0033
GRUPO*DATAS	6	195.531089	32.588515	1.364	0.2395
erro 2	80	1911.967408	23.899593		
Total corrigido	107	2997.155162			
CV 1 (%) =	15.19				
CV 2 (%) =	16.60				
Média geral:	29.4570185	Número de observações:	108		

Variável analisada: **LEUCÓCITOS**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	4997.134074	2498.567037	32.116	0.0000
erro 1	16	1244.779259	77.798704		
DATAS	3	2664.607407	888.202469	13.874	0.0000
GRUPO*DATAS	6	3707.310370	617.885062	9.651	0.0000
erro 2	80	5121.682963	64.021037		
Total corrigido	107	17735.514074			
CV 1 (%) =	35.58				
CV 2 (%) =	32.27				
Média geral:	24.7925926	Número de observações:	108		

Variável analisada: **TROMBÓCITOS**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	335.582963	167.791481	1.341	0.2896
erro 1	16	2002.710370	125.169398		
DATAS	3	1142.365556	380.788519	3.494	0.0193
GRUPO*DATAS	6	2401.246667	400.207778	3.672	0.0028
erro 2	80	8719.485185	108.993565		
Total corrigido	107	14601.390741			
CV 1 (%) =	28.05				
CV 2 (%) =	26.17				
Média geral:	39.8907407	Número de observações:	108		

Variável analisada: **PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	6.406667	3.203333	4.659	0.0254
erro 1	16	11.000000	0.687500		
DATAS	3	2.199630	0.733210	4.872	0.0036
GRUPO*DATAS	6	2.470370	0.411728	2.736	0.0181
erro 2	80	12.040000	0.150500		
Total corrigido	107	34.116667			
CV 1 (%) =	21.05				
CV 2 (%) =	9.85				
Média geral:	3.9388889	Número de observações:	108		

Variável analisada: **FIBRINOGÊNIO**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	222222.222222	111111.111111	3.682	0.0484
erro 1	16	482777.777778	30173.611111		
DATAS	3	30740.740741	10246.913580	0.495	0.6869
GRUPO*DATAS	6	237037.037037	39506.172840	1.907	0.0897
erro 2	80	1657222.222222	20715.277778		
Total corrigido	107	2630000.000000			
CV 1 (%) =	49.63				
CV 2 (%) =	41.12				
Média geral:	350.000000	Número de observações:	108		

Variável analisada: **HETERÓFILOS MADUROS**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	894.404018	447.202009	22.261	0.0000
erro 1	16	321.427026	20.089189		
DATAS	3	818.540723	272.846908	16.871	0.0000
GRUPO*DATAS	6	1287.198390	214.533065	13.266	0.0000
erro 2	80	1293.767607	16.172095		
Total corrigido	107	4615.337764			
CV 1 (%) =	56.76				
CV 2 (%) =	50.93				
Média geral:	7.8960185	Número de observações:	108		

Variável analisada: **MONÓCITOS**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	244.119010	122.059505	13.406	0.0004
erro 1	16	145.679775	9.104986		
DATAS	3	63.579209	21.193070	3.773	0.0137
GRUPO*DATAS	6	180.406835	30.067806	5.354	0.0001
erro 2	80	449.315583	5.616445		
Total corrigido	107	1083.100412			
CV 1 (%) =	81.12				
CV 2 (%) =	63.71				
Média geral:	3.7197222	Número de observações:	108		

Variável analisada: **LINFÓCITOS**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	602.985105	301.492553	19.030	0.0001
erro 1	16	253.482590	15.842662		
DATAS	3	449.502842	149.834281	6.116	0.0008
DATAS*GRUPO	6	283.944170	47.324028	1.932	0.0857
erro 2	80	1960.054887	24.500686		
Total corrigido	107	3549.969594			
CV 1 (%) =	31.06				
CV 2 (%) =	38.63				
Média geral:	12.8128704	Número de observações:	108		

Variável analisada: **EOSINÓFILOS**

Opção de transformação: Raiz quadrada de Y + 1.0 - SQRT (Y + 1.0)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	0.218688	0.109344	7.706	0.0045
erro 1	16	0.227032	0.014190		
DATAS	3	0.766507	0.255502	22.234	0.0000
DATAS*GRUPO	6	0.491011	0.081835	7.121	0.0000
erro 2	80	0.919340	0.011492		
Total corrigido	107	2.622577			
CV 1 (%) =	10.92				
CV 2 (%) =	9.83				
Média geral:	1.0904952	Número de observações:		108	

Variável analisada: **H/L**

Opção de transformação: Raiz quadrada de Y + 1.0 - SQRT (Y + 1.0)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GRUPO	2	0.213922	0.106961	4.078	0.0371
erro 1	16	0.419690	0.026231		
DATAS	3	0.371301	0.123767	5.181	0.0025
DATAS*GRUPO	6	0.757257	0.126210	5.283	0.0001
erro 2	80	1.911159	0.023889		
Total corrigido	107	3.673329			
CV 1 (%) =	12.74				
CV 2 (%) =	12.15				
Média geral:	1.2716374	Número de observações:		108	

ANEXO VIII

Correlação:

Correlations (new.sta)														
Marked correlations are significant at $p < .05000$														
108 (Casewise deletion of missing data) N=														
	ERITR	VG	HGB	VGM	CHCM	LEUC	TRO	PPT	FIBRIN	HETMAD	LINFOC	MONOC	EOS	H/L
ERITR	1													
VG	0,3442	1												
HGB	0,1497	0,2585	1											
VGM	-0,8266	0,1934	-0,0375	1										
CHCM	-0,0514	-0,2837	0,8491	-0,1266	1									
LEUC	-0,2174	-0,1257	-0,3757	0,1942	-0,296	1								
TRO	-0,0211	0,1589	0,0346	0,1261	-0,0448	0,206	1							
PPT	-0,0181	0,0339	-0,2522	0,0664	-0,2773	0,389	-0,0003	1						
FIBRIN	-0,0867	0,002	-0,0608	0,1012	-0,0676	0,215	0,0178	0,2903	1					
HETMAD	-0,1997	-0,0161	-0,3027	0,2439	-0,2902	0,8403	0,1517	0,505	0,2146	1				
LINFOC	0,0777	0,2207	0,0442	0,0212	-0,0677	-0,0187	0,1187	-0,0233	-0,0924	0,0395	1			
MONOC	-0,1591	-0,0354	-0,3239	0,2113	-0,3014	0,7982	0,1544	0,4645	0,3063	0,7438	-0,0375	1		
EOS	-0,1063	-0,0464	0,0923	0,0888	0,1305	0,0351	0,004	-0,1497	0,0906	-0,1321	-0,0521	-0,0661	1	
H/L	-0,1299	-0,0107	-0,1645	0,1494	-0,1653	0,3448	0,0192	0,5495	0,2078	0,7202	-0,1205	0,4456	-0,1882	1