

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

TESE

**Estudo experimental da infecção por *Borrelia anserina* em aves
jovens (*Gallus gallus*): caracterização clínica, molecular e
patológica**

Marcio Barizon Cepeda

2019



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

**Estudo experimental da infecção por *Borrelia anserina* em aves
jovens (*Gallus gallus*): caracterização clínica, molecular e
patológica**

Marcio Barizon Cepeda

Sob a Orientação do Professor

Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca

e Co-orientação do Doutor

Matheus Dias Cordeiro

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

Seropédica, RJ

Agosto de 2019

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

C399e Cepeda, Marcio Barizon, 1983-
Estudo experimental da infecção por *Borrelia anserina* em aves jovens (*Gallus gallus*): caracterização clínica, molecular e patológica / Marcio Barizon Cepeda. - Seropédica, 2019.
106 f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.
Coorientador: Matheus Dias Cordeiro.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2019.

1. *Borrelia anserina*. 2. *Argas miniatus*. 3. Histopatologia. 4. Imunohistoquímica. 5. Impregnação pela prata. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-, orient. II. Cordeiro, Matheus Dias, 1983-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

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

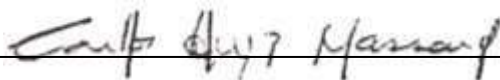
MARCIO BARIZON CEPEDA

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

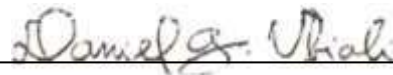
TESE APROVADA EM 21/08/2019



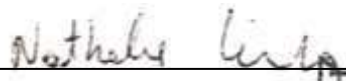
Aivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D) UFRRJ



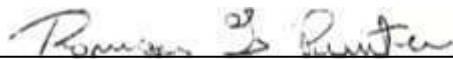
Carlos Luiz Massard (Dr.) UFRRJ



Daniel Guimarães Ubiali (Dr.) UFRRJ



Nathalie Costa da Cunha (Dr^a) UFF



Ramon Loureiro Pimenta (Dr.) FUSVE

Dedico este trabalho à minha família que sempre foi meu porto seguro e acreditou no meu potencial, incentivando e apoiando de todas as formas. Aos meus pais Edson e Lucimar e irmãos Edson e Patrícia. Dedico também à minha esposa Aline Moreno que com toda a sua sabedoria e amor me tornou uma pessoa melhor, mostrando o verdadeiro caminho da vitória. Aos meus sobrinhos, Carlinhos, Helena e Alice, que tanta felicidade me trouxeram na vida, obrigado a todos!

*Hoje, de algum lugar longe dessas terras
Há um doce olhar só para você...
Um olhar especial
De alguém especial, de distantes origens
Um olhar de um justo coração que pulsa só a
vida...
Que sorri porque ama plenamente
Sem julgamentos, preconceitos nem prisões
Hoje, como ontem, longe desses Céus
Há um encantado olhar só pra você
Nesse olhar vai para você a magia da luz
A simplicidade do perdão
A força para comungar com a vida
A esperança de dias mais radiantes de paz
Hoje, de algum lugar dentro de você,
Alguém que já o amou muito e ainda o ama
Diz para você que valeu a pena ter estado
nessas Terras...
Sob estes Céus...
Falando de união, paz, amor e perdão
Poder sentir a força que faz você sorrir
E continuar o caminho
Que um dia aquele doce olhar iniciou pra
você
Tudo isso, só para você saber,
que A VIDA CONTINUA...
E A MORTE É UMA VIAGEM.*

A Vida Continua (Paulo Kronemberger)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda bondade e generosidade que sempre me proporcionou, dando força, coragem, sabedoria e paz nos momentos de fragilidade. Por Ele, somos capazes de sermos melhores a cada dia.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por terem me proporcionado a oportunidade de um aprendizado grandioso durante estes seis anos entre o Mestrado e o Doutorado. Obrigado por acreditarem sempre na minha caminhada!

Ao Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca pelos ensinamentos, compreensão e fraternidade. Agradeço imensamente a confiança que teve em meu trabalho e por aceitar me orientar. Tenho certeza que a sua sabedoria e amizade fizeram esses seis anos serem mais proveitosos possíveis no auxílio do meu crescimento profissional. À Prof. Marília Massard pela sua hospitalidade e sempre ser tão carinhosa comigo.

Ao meu co-orientador Dr. Matheus Dias Cordeiro pela amizade e todos os ensinamentos que me passou durante esses mais de 10 anos de convívio. Tornei-me um profissional melhor lhe observando, tenha certeza disto!

À minha família maravilhosa e minha esposa Aline Braga Moreno, por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Não tenho dúvidas que este seio familiar me permitiu adquirir confiança e coragem para enfrentar o que estava por vir.

Uma lembrança toda especial e em memória de minha sogra Ozita Braga Moreno, pessoa única, um espírito de luz que tive a honra de conviver, que apesar de ter nos deixado nessa vivência, continua nos abençoando onde quer que esteja.

Agradeço de coração à minha irmã Patricia Barizon Cepeda pela fraternidade, companheirismo e pelo apoio durante todos estes anos de Rural. Vivemos intensamente aquilo tudo minha irmã!!

Um agradecimento especial ao meu grande amigo e irmão da Medicina Veterinária, Rodrigo de Franco da Silva, pela sua amizade, sempre disposto a lutar por mim e me ouvir. Estarei sempre do seu lado não importa onde eu esteja. Precisando estarei lá!!

Ao meu amigo Thiago Bernardo Pedro pela amizade, respeito e carinho. Você é e foi muito importante nessa minha caminhada. Obrigado por tudo!

Ao meu amigo Paulo César Magalhães Matos pela amizade verdadeira e carinho. Agradeço muito sua ajuda nas necropsias e no apoio ao trabalho.

Ao Prof. Douglas McIntosh por todos os ensinamentos em biologia molecular e sempre estar à disposição para esclarecer dúvidas.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Daniel Guimarães Ubiali, responsável pelo meu grande interesse na área de Patologia Animal. Tem todo o meu respeito e admiração. Obrigado por tudo que você fez por mim!

Um agradecimento todo carinhoso aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) por toda parceria durante estes anos, desde os procedimentos com os animais até o apoio aos testes de bancada. À Priscilla Nunes, Rafaella Câmara Teixeira, Bruna de Azevedo Bâeta, Michelle Bahia, Izabela Mesquita, Adlilton Pacheco, Taís Carvalho, Taiana Rodrigues, Letícia Rodrigues, Yasmin Kaulich, Taís Figueroa, Carolina Marotta, Bruna Land, Carla Carolina Uzedo, Neide Gomes, Andrea Kill, Juliana Ferreira, Jaqueline Valim, Claudia Bezerra, Priscilla Vieira e Gustavo Castro.

Um agradecimento mais do que especial ao meu chefe, coordenador da Vigilância Sanitária de Saquarema, Cristiano da Silva Bravo. Um grande amigo que a vida trouxe para mim. Um coração de ouro que transborda generosidade. Aprendo sempre com você.

Às minhas novas amigas professoras Eliene Saad e Andréa Gerevini, obrigado pelo carinho, atenção e respeito. Apesar do pouco tempo de convívio, possuem um cantinho especial no meu coração.

Aos meus cães, Théo e Lucky pelos momentos de distração e carinho que os nossos animais irmãos nos oferecem. Em memória do meu cãozinho Bóris, que me trouxe tanta alegria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Um agradecimento mais do que especial à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foi minha casa, meu aprendizado, meu aconchego, minha vida. Foram os 14 anos mais felizes do mundo. Obrigado!!

BIOGRAFIA

Marcio Barizon Cepeda, filho de Edson Acácio Cepeda e Lucimar Costa Cepeda, nasceu em 19 de abril de 1983 no Município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. cursou o ensino fundamental e médio no Colégio Mercúrio, concluindo seus estudos básicos em meados dos anos 2000.

No ano de 2005, ingressou no Bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Durante o período acadêmico, realizou estágios e programas de aprendizagem prática nas áreas de Clínica Médica de Pequenos Animais, principalmente no Hospital Veterinário de Pequenos Animais nas áreas de clínica, oncologia e diagnóstico por imagem. Em 13 de janeiro de 2012 obteve o título de Médico Veterinário.

No ano de 2012, ingressou no curso técnico de Análises Clínicas pela Fundação de Apoio à Escola Técnica do Estado do Rio de Janeiro (FAETEC), tendo atuado em hospitais de emergência como técnico de Laboratório do Estado do Rio de Janeiro. Em agosto de 2014, concluiu o ensino técnico obtendo o título de Técnico em Análises Clínicas.

Em março de 2013, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias da UFRRJ, em nível de Mestrado, foi bolsista CAPES, até 2015, onde recebeu o título de Mestre em Ciências Veterinárias em fevereiro.

Em maio do mesmo ano, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias da UFRRJ, em nível de Doutorado. Deste período até maio de 2019 foi bolsista CAPES, participando de diversas publicações desde então.

Em 2016, ingressou no período noturno, no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Salgado de Oliveira (UNIVERSO), realizando estágios em escolas privadas e estaduais e obtendo o título de Licenciado em Ciências Biológicas em 2017.

Em agosto de 2019, iniciou como Médico Veterinário inspetor fiscal de Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Saquarema/RJ. No mesmo mês foi contratado na Universidade Fundação Educacional Severino Sombra (FUSVE) como Responsável técnico dos laboratórios da instituição e no presente momento é Professor Adjunto de Parasitologia Veterinária I e II do Curso de Medicina Veterinária da FUSVE.

Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Veterinárias.

RESUMO

CEPEDA, Marcio Barizon. **Estudo experimental da infecção por *Borrelia anserina* em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*): caracterização clínica, molecular e patológica.** 2019. 106p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A Borreliose aviária é uma doença de caráter agudo e septicêmica, podendo afetar uma variedade de espécies aviárias e causada pela bactéria *Borrelia anserina*. É uma espiroqueta extremamente móvel, podendo ser detectada no plasma sanguíneo das aves enfermas durante a fase aguda da doença. O vetor responsável pela transmissão é o carrapato argásideo *Argas (Persicargas) miniatus*. O estudo experimental teve por objetivo estudar a evolução da infecção por *B. anserina* em galinhas domésticas, caracterizando clinicamente a enfermidade através da utilização de técnicas moleculares e patológicas. Um total de 38 aves foram infestadas com ninfas de terceiro estágio (N3) infectadas com *B. anserina* e para controle do estudo, duas aves foram infestadas com ninfas de terceiro estágio livres de *B. anserina*. O curso da infecção foi avaliado durante 44 dias após a exposição dos carrapatos às aves e os procedimentos experimentais foram divididos em fase superaguda correspondendo do 1º ao 4º dia pós-infecção (DPI), aguda (5º ao 10º DPI) e subaguda (14º ao 44º DPI), considerando a progressão da doença. Nas três fases, foram coletadas diariamente amostras de soro de 10 aves e fragmentos de órgãos durante a necropsia. O material coletado foi utilizado nos exames moleculares, histopatológicos e imuno-histoquímicos. Em todas as etapas, foram analisadas amostras negativas, oriundas de aves saudáveis submetidas às mesmas condições experimentais. Na PCR, as aves apresentaram órgãos positivos para *B. anserina* do 4º ao 8º DPI, com destaque para o fígado, baço e coração, que apresentaram maiores quantidades de DNA amplificado para o gene *flaB*. Quanto às amostras de soro, obteve-se amplificação do DNA de *B. anserina*, do 5º ao 10º DPI. A análise histopatológica revelou alterações e lesões significativas, leves a severas, em todos os órgãos estudados, principalmente ao nível hepático e esplênico. A partir do 5º DPI já foi possível detectar as espiroquetas no fígado, rins, baço e coração das aves infectadas, quando impregnadas pela prata. Elas puderam ser visualizadas nestes e em outros tecidos até o 8º DPI, quando foram marcadas e evidenciadas a presença maciça de espiroquetas na medula óssea e nos ovários, mais precisamente no interior dos folículos ovarianos. A imuno-histoquímica foi padronizada para o auxílio no diagnóstico e após a realização da técnica foi possível visualizar a presença das espiroquetas no interior de vasos e macrófagos no tecido renal acometido, assim como confirmar a reação antígeno-anticorpo. A infecção por *B. anserina* provocou alterações macro e microscópicas de leves a severas nos órgãos estudados, principalmente no fígado, rins e baço, além da presença das espiroquetas em todos os tecidos avaliados na fase aguda da doença. Essas informações confirmam o seu caráter septicêmico. A interação de técnicas como a semiologia clínica, biologia molecular e histopatologia no estudo da infecção, retratou mais fielmente o estado de saúde das aves e contribuiu para um tratamento mais adequado da enfermidade.

Palavras-chave: Borreliose; galinhas domésticas; carrapatos; histopatologia; imunohistoquímica.

ABSTRACT

CEPEDA, Marcio Barizon. Experimental study of *Borrelia anserina* infection in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*): clinical, molecular and pathological characterization. 2019. 106p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Sciences, Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Veterinary Science Graduate Program, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Avian borreliosis is an acute and septicemic disease that can affect a variety of avian species and is caused by the bacterium *Borrelia anserina*. It is an extremely mobile spirochete and can be detected in the blood plasma of sick fowls during the acute phase of the disease. The vector responsible for the transmission is the *Argas (Persicargas) miniatus* tick. The experimental study aimed to study the evolution of *B. anserina* infection in domestic chickens, clinically characterizing the disease through the use of molecular and pathological techniques. A total of 38 fowls were infested with *B. anserina* infected third stage (N3) nymphs and for study control, two fowls were infested with *B. anserina* free third stage nymphs. The course of infection was evaluated for 44 days after exposure of ticks to fowls and the experimental procedures were divided into over-acute phase corresponding to day 1 to day 4 post-infection (DPI), acute (5 to 10 DPI) and subacute (14 to 44° DPI), considering the progression of the disease. In the three phases, serum samples were collected daily from 10 fowls and organ fragments during autopsy. The collected material was used in molecular, histopathological and immunohistochemical exams. In all stages, negative samples from healthy birds submitted to the same experimental conditions were analyzed. In PCR, the fowls presented positive organs for *B. anserina* from the 4th to the 8th DPI, especially the liver, spleen and heart, which presented larger amounts of amplified DNA for the *flaB* gene. As for serum samples, *B. anserina* DNA amplification was obtained from the 5th to the 10th DPI. Histopathological analysis revealed significant mild to severe changes and lesions in all organs studied, especially at the liver and splenic level. From the 5th DPI it was possible to detect spirochetes in the liver, kidneys, spleen and heart of infected fowls when impregnated with silver. They could be visualized in these and other tissues up to the 8th DPI, when the massive presence of spirochetes in the bone marrow and ovaries were marked and evidenced, more precisely within the ovarian follicles. Immunohistochemistry was standardized to aid the diagnosis and after performing the technique it was possible to visualize the presence of spirochetes inside vessels and macrophages in the affected renal tissue, as well as confirm the antigen-antibody reaction. Infection by *B. anserina* caused mild and severe macro and microscopic changes in the organs studied, especially in the liver, kidneys and spleen, and the presence of spirochetes in all tissues evaluated in the acute phase of the disease. This information confirms its septicemic character. The interaction of techniques such as clinical semiology, molecular biology and histopathology in the study of infection, more faithfully portrayed the health status of fowls and contributes to a more appropriate treatment of the disease.

Key words: Borreliosis; domestic chickens; ticks; histopathology; immunohistochemistry.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Amplificação do DNA das amostras de soro infectadas com *Borrelia anserina*, após a realização da PCR para o gene flagelina *flaB*..... 43

Tabela 2. Amplificação do DNA das amostras de órgãos infectadas com *Borrelia anserina* após a realização da PCR para o gene flagelina *flaB*..... 44

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Argas miniatus*, detalhando suas fases evolutivas, além do período de repasto sanguíneo no hospedeiro referente a cada fase. Disponível em: <https://dokumen.tips/documents/ordem-ixodida.html>..... 11
- Figura 2.** Ave infectada experimentalmente por *Borrelia anserina* apresentando estado de sonolência e penas arrepiadas. Arquivo pessoal..... 13
- Figura 3.** Diarreia com aspecto pastoso e coloração esverdeada. Manifestação clínica presenciada na fase aguda da doença. Arquivo pessoal. 13
- Figura 4.** Registro fotográfico da visualização de um aglomerado de espiroquetas (ao centro, rodeado por eritrócitos) em sangue de ave infectada na fase aguda da enfermidade. Observação em microscopia de campo escuro. Obj.40x. Arquivo pessoal. 15
- Figura 5.** Círculo de proteção utilizado como alojamento das aves na fase inicial de criação. Arquivo pessoal. 27
- Figura 6.** Aferição da temperatura no interior do círculo de proteção. Arquivo pessoal. 28
- Figura 7.** Coleta de sangue realizada em veia metatársica medial de *Gallus gallus domesticus*. 34
- Figura 8.** Ave infectada experimentalmente por *Borrelia anserina* apresentando prostração e penas arrepiadas decorrentes do processo infeccioso. Arquivo pessoal..... 40
- Figura 9.** Ave experimentalmente infectada por *Borrelia anserina* evidenciando crista e barbela hipocoradas. Arquivo pessoal. 40
- Figura 10.** Resultado da PCR visando à padronização das amostras de DNA extraídas no experimento. Amostras de soro coletadas no 8ºDPI e o teste das diluições. Pool - mistura de amostras positivas de aves infectadas por *Borrelia anserina*. Arquivo pessoal..... 42
- Figura 11.** Resultado da PCR (1º reação) dos órgãos das aves infectadas por *Borrelia anserina* coletados no 8ºDPI. Amplificação de bandas de 658 pares de base para o gene *flaB*. Ladder de 100pb da Life Technologies®. Controle negativo (Água dentro - AD); controle negativo (Água fora - AF); Controle positivo *Borrelia burgdorferi* cepa..... 43
- Figura 12.** Hepatomegalia causada pela infecção por *Borrelia anserina*, com o órgão ocupando grande parte da cavidade celomática. Arquivo pessoal. 46
- Figura 13.** Comparação de um fígado acometido pela Borreliose aviária, apresentando hepatomegalia, presença de áreas de congestão e bordas irregulares (à esquerda) em relação ao fígado de uma ave saudável (à direita). Arquivo pessoal. 46
- Figura 14.** Hepatite linfocitocítica subaguda multifocal moderada com heterófilos degenerados, necrose hepatocelular multifocal e degeneração gordurosa (Obj. 10x)..... 48

Figura 15. Hepatite linfohistiocítica, subaguda, necrosante, multifocal moderada com degeneração gordurosa (Obj.10x).....	49
Figura 16. Hepatite linfohistiocítica, necrosante subaguda periportal multifocal severa com fibrina intravascular (Obj.20x).	50
Figura 17. Hepatite linfohistiocítica, subaguda, necrosante multifocal a coalescente moderada. (Obj.40x).....	50
Figura 18. Esplenomegalia e presença de inúmeras manchas esbranquiçadas na superfície do órgão.	53
Figura 19. Esplenomegalia. Comparação de um baço afetado pela doença (à esquerda) em relação a um baço saudável.	54
Figura 20. Lesões em baços de <i>Gallus gallus domesticus</i> experimentalmente infectados por <i>Borrelia anserina</i> . A- Esplenite histiocítica subaguda multifocal discreta (2ºDPI); B- Esplenite heterofílica e histiocítica subaguda multifocal leve com fibrina perivascular (4ºDPI); C- Esplenite necrosante histiocítica subaguda multifocal moderada com vasculite fibrinóide (5ºDPI); D- Esplenite necrosante multifocal a coalescente severa com vasculite fibrinóide e coágulos de fibrina (7ºDPI).....	57
Figura 21. Cavidade celomática mostrando o aumento no tamanho dos rins devido à infecção por <i>Borrelia anserina</i> , evidenciando a congestão dos órgãos. Arquivo pessoal.	59
Figura 22. Comparação de um fragmento de rim alterado pela infecção por <i>Borrelia anserina</i> , apresentando áreas hemorrágicas e aumentado de tamanho (à esquerda) em relação ao fragmento de rim obtido de uma ave saudável. Arquivo pessoal.	59
Figura 23. Miocardite histiocítica subaguda multifocal moderada com área focal de fibrose (Obj.40x).	63
Figura 24. Epicardite heterofílica e linfohistiocítica, subaguda, focalmente extensa severa (Obj. 20x).	64
Figura 25. Plexo coroidite linfohistiocítica subaguda multifocal leve (Obj.20x).	65
Figura 26. Porção do intestino delgado de ave infectada por <i>Borrelia anserina</i> (à direita). Para fins de comparação, uma porção do intestino de uma ave saudável do grupo controle (à esquerda).....	67
Figura 27. Bursite histiocítica subaguda, necrosante, multifocal moderada (Obj.10x).....	72
Figura 28. Bursite histiocítica subaguda, necrosante, multifocal moderada (Obj 20x).....	73
Figura 29. Ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada (Obj.20x).....	75
Figura 30. Ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada (Obj.40x).	75

Figura 31. Registro fotográfico dos diferentes tecidos das aves infectadas por *Borrelia anserina*, impregnados pela prata, por meio da técnica de Whartin-Starry. **A-** Fígado: espiroquetas no interior de um vaso (Obj.100x); **B** - Fígado: aglomerado de espiroquetas no interior de um vaso (Obj.100x); **C** - Ovário: presença de inúmeras espiroquetas em ovócito no interior de folículo ovariano (Obj.100x); **D** – Medula óssea: em meio ao estroma (Obj. 100x).
..... 78

Figura 32. Corte histológico renal de ave infectada por *Borrelia anserina*, no pico de parasitemia, com imunomarcção no interior de um vaso. Observa-se a presença de estruturas morfológicamente compatíveis com *Borrelia anserina* e restos celulares bacterianos no interior de macrófagos. Anticorpo primário policlonal anti-*Borrelia burgdoferi*. Complexo avidina-biotina-peroxidase/DAB..... 80

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Certificado de Guia de Trânsito dos animais (GTA), certificando a finalidade de engorda das aves, procedência e a vacinação dos pintos ainda com 1 dia de vida para Doença de Marek e Bouda Aviária.....	99
ANEXO II. Certificado de monitoramento sanitário da granja para <i>Salmonella</i> spp e <i>Mycoplasma</i> spp nas matrizes.	100
ANEXO III. Medicamentos utilizados no experimento.	101
ANEXO IV. Laudo de Necropsia e Histopatológico da ave que originou a infecção dos carrapatos.....	102
ANEXO V. Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IV-UFRRJ).....	104
ANEXO VI. Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IV-UFRRJ): Relatório Final.	105
ANEXO VII. Artigo publicado na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....	106

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Um breve histórico do gênero <i>Borrelia</i> : seus agentes, vetores e relação parasitária.....	4
2.2. <i>Borrelia anserina</i>	6
2.2.1. Histórico e Taxonomia	6
2.2.2. Caracterização morfológica da espiroqueta	7
2.2.3. Manutenção da cepa de <i>Borrelia anserina</i>	8
2.3. Biologia do carrapato vetor	9
2.3.1. O carrapato argasídeo <i>Argas (Persicargas) miniatus</i>	9
2.3.2. Ciclo evolutivo	10
2.3.3. Relação parasito-hospedeiro	11
2.4. A Borreliose aviária	12
2.4.1. Aspectos epidemiológicos.....	12
2.4.2. Sintomatologia clínica.....	12
2.5. Descrição das fases clínicas da enfermidade.....	15
2.6. A Biologia molecular no auxílio do diagnóstico.....	16
2.7. Caracterização anatomopatológica da Borreliose aviária.....	18
2.7.1. Medula Óssea	18
2.7.2. Bursa de Fabricius.....	19
2.7.3. Baço... ..	20
2.7.4. Fígado	20
2.7.5. Rins... ..	21
2.7.6. Coração	21
2.7.7. Sistema Nervoso Central (SNC)	21
2.7.8. Pulmões e sacos aéreos	21
2.7.9. Pâncreas	22

2.7.10. Intestinos	22
2.7.11. Ovário e oviduto.....	23
2.8. Impregnação pela prata	23
2.9. Imuno-histoquímica: uma revisão sobre a técnica	24
2.10. Controle e Profilaxia	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Aprovação do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA).....	25
3.2. Obtenção e instalação das aves	26
3.3. Local de execução do Estudo.....	26
3.4. Criação e manejo das aves	27
3.5. Aquisição, formulação e componentes da ração fornecida às aves	29
3.6. Confirmação do estado de higidez das aves.....	29
3.7. Origem do isolado, preparo do inóculo e obtenção de cepa patogênica.....	29
3.8. Origem e infecção dos carrapatos utilizados no experimento	30
3.9. Delineamento experimental	31
3.10. Visualização das espiroquetas e avaliação dos sinais clínicos	33
3.11. Coleta de sangue e obtenção do soro	33
3.12. Eutanásia, necropsia e coleta do material.....	34
3.13. Avaliação clínica.....	35
3.14. Análises moleculares.....	35
3.14.1. Extração de DNA das amostras de soro e órgãos.....	35
3.14.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	36
3.14.3. Eletroforese e análise dos resultados.....	37
3.15. Histopatologia e Impregnação pela prata	37
3.16. Técnica de Imuno-histoquímica.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Dados clínicos e epidemiológicos	39

4.2. Biologia Molecular	42
4.3. Análise macroscópica e histopatológica dos órgãos	45
4.3.1. Avaliação hepática	45
4.3.2. Avaliação esplênica.....	53
4.3.3. Avaliação renal e adrenais.....	58
4.3.4. Avaliação cardíaca	62
4.3.5. Avaliação do Sistema Nervoso Central.....	64
4.3.6. Avaliação intestinal.....	66
4.3.7. Avaliação dos pulmões e sacos aéreos.....	68
4.3.8. Avaliação pancreática	69
4.3.9. Avaliação da medula óssea	70
4.3.10. Avaliação da Bursa de Fabricius.....	71
4.3.11. Avaliação do Ovário e Oviduto.....	74
4.4. Impregnação pela prata	77
4.5. Imuno-histoquímica	79
5. CONCLUSÃO	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a agricultura familiar desempenha um papel de destaque na economia do Brasil, com uma produtividade de 37,87% do montante nacional, abrangendo 85,17% dos estabelecimentos rurais (CIAS, 2010). Representa uma importante fonte de renda, sobretudo para médios e pequenos produtores, uma vez que a reutilização dos equipamentos e subprodutos desonera os mesmos e contribui na rusticidade das instalações em sistemas de avicultura família orgânica, onde são estabelecidas criações de galinhas caipiras coloniais. Entretanto, este método de criação de aves de produção implantado na avicultura familiar possui algumas desvantagens, sendo a principal, o investimento reduzido em técnicas sanitárias apropriadas e em equipamentos eficientes. Esses são elementos fundamentais na preservação da sanidade do plantel, uma vez que um planejamento deficiente neste aspecto pode acarretar na instalação de parasitoses e outras doenças infecciosas (CRUZ et al., 2012).

Com o desenvolvimento da criação aviária industrial algumas doenças deixaram de ser um grande problema de perda econômica. Porém, contemporaneamente, o consumo de produtos orgânicos avícolas vem aumentando consideravelmente, principalmente em comunidades de pequenos e médios proprietários rurais, áreas peri-urbanas das regiões metropolitanas das grandes cidades e as doenças reemergentes podem voltar a acarretar problemas já que possuímos o vetores transmissores e condições ambientais adequadas.

Em uma criação de aves onde a implantação do sistema de produção orgânico seja marcante, a borreliose ou espiroquetose aviária representa uma enfermidade de importância econômica (LISBÔA, 2008). Causada pelo agente etiológico *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891), a doença possui características septicêmica, aguda e cosmólita, com capacidade de afetar diferentes espécies de aves (ATALIBA, 2006). Segundo Boero (1967), os sinais clínicos relacionados à doença, dependem da patogenicidade da cepa em questão, observando-se inicialmente a ocorrência de hipertermia e polidipsia, seguidas de fraqueza muscular, sonolência, diarreia esverdeada, inapetência, cianose de mucosas, evoluindo posteriormente para um quadro de hipotermia, paralisia e morte. Sakharoff descreveu a espécie *B. anserina* pela primeira vez em 1891, ao estudar a epidemiologia e a clínica da doença em gansos no Caucasus, região da Rússia. No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez por Marchoux e Salimbeni em 1903, no Estado do Rio de Janeiro, ao estudarem o desenvolvimento da doença em galinhas naturalmente infectadas. A borreliose está relacionada à alta taxa de mortalidade em aves de criação rústica, sendo as aves jovens e as imunocomprometidas mais

susceptíveis à doença, e o decréscimo de novos casos está relacionado à adoção de medidas profiláticas que foram adotadas ao longo do tempo (WOUDA et al., 1975). Foi considerada como a maior causa da mortalidade em aves de áreas tropicais e subtropicais da Europa, Índia, África, Europa, Indonésia, regiões da Austrália, América Central e do Sul (MARCHOUX e SALIMBENI, 1903; McNEIL et al., 1949).

Carrapatos do gênero *Argas* (Laitreille, 1796) são os vetores relacionados à transmissão de *B. anserina*. São considerados vetores reservatórios, apresentando elevada longevidade, permitindo que o patógeno, se instale e sobreviva por longo período de tempo em seu interior (BURGDORFER, 1985). As formas de transmissão transestadial e transovariana permitem que o vetor seja um reservatório em todas as suas fases evolutivas, as quais possuem a capacidade de transmitir a borreliose (COOPER; BICKFORD, 1993).

Argas persicus (Oken, 1818) e *Argas reflexus* (Fabricius, 1794) são os vetores da doença no continente Europeu; *A. persicus* no continente africano e Austrália e *Argas miniatus* (Koch, 1844) nas Américas (HUTYRA et al., 1947).

Atualmente a manutenção da cepa de *B. anserina* vem sendo estabelecida em laboratório e tem sido realizada por meio de passagens sanguíneas em galinhas domésticas jovens e adultas ou em meios de cultivo (McNEIL et al., 1949; BARNES, 1997; CEPEDA, 2015). As cepas podem ser preservadas por longo tempo (DHAWEDKAR; DHANESAR, 1983; LABRUNA et al., 1999) e amostras contendo soro infectado por esta bactéria são mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido (LABRUNA et al., 1999). O meio de escolha para o cultivo de *B. anserina* é o Barbour- Stoenner- Kelly (BSK), uma vez que apresenta composição essencial para suprir suas exigências nutricionais e possibilitar o crescimento bacteriano (ASLAM et al., 2012).

A observação dos sinais clínicos característicos, correlacionada à presença dos carrapatos nas aves, possibilita que seja feito um diagnóstico mais preciso. Durante a fase aguda da borreliose, o diagnóstico já pode ser realizado através de esfregaços sanguíneos periféricos, corados de preferência pelo Giemsa, por meio de exames histopatológicos de órgãos afetados corados por hematoxilina-eosina (SOARES et al., 2000) e visualizadas nos tecidos afetados pela impregnação por prata. A aposição de tecidos do vetor, como intestino e glândula salivar e também pelo exame da hemolinfa e líquido coxal em microscópio de campo escuro (BIER, 1985), completam um diagnóstico mais eficiente. Exames complementares como os hematológicos (LISBÔA, et al 2006) e bioquímicos (CEPEDA ,

2015) são relevantes e, por serem minimamente invasivos, são fonte de amostras e fornecem rápido resultado.

Na literatura há poucos estudos referentes à epidemiologia deste agente, embora Cepeda (2015), após transmitir experimentalmente *B. anserina* por meio de soro infectado e pelo carrapato vetor, descreveu os índices epidemiológicos da doença, como os períodos de incubação e patente. São escassos estudos recentes sobre esta doença e para isso faz-se necessário à utilização de técnicas mais recentes e apuradas como a biologia molecular e a imunohistoquímica para contribuir com o diagnóstico e elucidar o comportamento do agente etiológico no hospedeiro e/ou enquanto no carrapato vetor.

São medidas profiláticas de importância o combate ao carrapato vetor, que pode ser realizado através construção de estruturas isentas de frestas nos galinheiros, manejo adequado e higiênico das camas das aves e, ainda, através da pulverização de substâncias acaricidas. Para o tratamento das aves enfermas, a administração de antibióticos do grupo das estreptomicinas, penicilinas e terramicinas se mostra uma medida eficaz (HUTYRA et al., 1947; BOERO, 1967).

Neste sentido, este trabalho teve por objetivo estudar o curso da infecção e a patogenia causada por *B. anserina* em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) e caracterizar seu comportamento no organismo hospedeiro, através de métodos clínicos, moleculares e patológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Um breve histórico do gênero *Borrelia*: seus agentes, vetores e relação parasitária

O gênero *Borrelia* foi descrito pela primeira vez por Swellengrebel em 1907 e seu nome foi em homenagem ao grande microbiologista francês Amédeé Borrel. Porém, a primeira observação de um microrganismo compatível com uma espiroqueta foi realizada por Leeuwenhoek (1861), quando manipulava um material humano oriundo de mucosas bucal e intestinal. Já em 1868, na Rússia, Obemeier descobriu que indivíduos acometidos pela febre recorrente apresentavam espiroquetas em sua circulação sanguínea (PÊSSOA, 1963; PAVLOVSKY, 1965). Por um bom tempo, as borrelias foram classificadas no grupo das algas, protozoários e bactérias e somente a partir de 1948, foram classificadas e reagrupadas em um grupo particular dentre as bactérias (PÊSSOA, 1963; KRIEG; HOLT, 1984).

Geralmente, a distinção entre as espécies de *Borrelia* é feita pela identificação do seu vetor específico, o hospedeiro vertebrado susceptível (mamíferos ou aves) e o grau de infectividade do agente etiológico na natureza ou experimentalmente em laboratório (DAVIS, 1956; FELSENFELD, 1971).

Os agentes pertencentes a este gênero, em sua maioria, podem acometer mamíferos e aves. Em animais silvestres, sua importância está na ocorrência em roedores, que desenvolvem um papel de hospedeiros reservatórios naturais (BARBOUR; HAYES, 1986). Com base nestes dados, as espécies de borrelia foram sendo nomeadas e descritas com o passar do tempo, através da identificação de seus vetores e pelos estudos biológicos e moleculares (HOOGSTRAAL, 1985; MARCONI et al., 1995).

A transmissão da borrelia para um hospedeiro susceptível é realizada por carrapatos, embora, mosquitos como culicídeos, tabanídeos e algumas pulgas, possam também transmitir o agente de forma mecânica (MAGNARELLI et al., 1986). De acordo com Restrepo et al (1994) e Schwan (1996), os carrapatos possuem um papel fundamental na patogenicidade da transmissão das borrelioses, já que existem mecanismos intrínsecos envolvidos nesta relação parasitária e que estão diretamente relacionados à transmissão.

Alguns exemplos desses mecanismos podem ser levados em consideração quando do estudo dessa relação parasitária, envolvendo a variabilidade antigênica, quando a borrelia utiliza-se de subterfúgios para escapar do sistema imune do hospedeiro e/ou resistir a

variações de temperaturas na qual o carrapato habita. Qualquer interferência neste equilíbrio parasita x vetor, pode prejudicar a viabilidade das espiroquetas, interferir na sua fisiologia e até na sua transmissão (NAKAYAMA et al., 1989). Muitas pesquisas envolvendo esta relação parasitária foram realizadas, e algumas revelaram que existe certa dependência química da *Borrelia* quando da sua presença no intestino do carrapato, já que neste local ocorre uma intensa replicação bacteriana (HOOGSTRAAL, 1985; SCHWAN, 1996; RANDOLPH et al., 1996).

A transmissão das bactérias através do carrapato argasídeo pode ocorrer pelas formas transestadial e transovariana. Embora ambas sejam eficientes, a transovariana é a principal forma de transmissão das espiroquetas entre carrapatos (HOOGSTRAAL, 1985; BARBOUR; HAYES, 1986).

O estabelecimento das espiroquetas no carrapato é sinalizado quando da sua presença nos intestinos e na hemolinfa presente nos interstícios celulares deste órgão. Segundo Zung et al (1989) e Balashov (2005), a alimentação dos carrapatos estimula a migração das espiroquetas via hemolinfa da cavidade corporal em direção as regiões mais extremas das glândulas salivares, gânglio nervoso e outras regiões mais internas. Todo o processo de desenvolvimento e multiplicação bacteriana no vetor é influenciado por inúmeros processos fisiológicos durante seu ciclo de vida. Alguns exemplos que limitam a eficiência de sua transmissão são a redução do número de espiroquetas conforme o carrapato muda de estágio e o número excessivo de espiroquetas.

Atualmente existem cinco tipos de enfermidades causadas por agentes etiológicos do gênero *Borrelia*, podendo acometer animais e humanos. A primeira borreliose a ser descrita, foi a causadora da febre recorrente em humanos, tendo como agente responsável a *Borrelia recurrentis* (Lebert 1874) Bergey et al, 1925 (WANG et al., 1997) lato sensu com mais de 20 espécies, cujos vetores são carrapatos do gênero *Ornithodoros* Koch, 1837 (PAVLOVSKY, 1965). A borreliose ou espiroquetose aviária tem como seu agente causador, a *B. anserina*, cujos vetores são carrapatos argasídeos do gênero *Argas*, acometendo diversas espécies aviárias (QUINN, 1994). A *Borrelia theileri* (Leveran, 1903), agente que pode infectar bovinos, ovinos e equinos, tem como vetores o carrapato ixodídeo *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (NEITZ, 1956; CALLOW, 1967). A enfermidade mais recente é o chamado aborto epizootico bovino, transmitido pela *Borrelia coriaceae* Johnson, 1987 e por *Ornithodoros coriaceus* Koch, 1844 (JOHNSON et al., 1987; ZINGG; LEFEBVRE, 1994).

A Borreliose de Lyme é considerada a enfermidade de maior grupo entre as causadas pelo gênero *Borrelia*. É uma doença infecto-contagiosa de caráter multissistêmico, acometendo animais e humanos. Segundo a literatura, os principais agentes envolvidos neste grupo pertencem às seguintes espécies: *Borrelia burgdorferi* Johnson et al., 1984, *Borrelia garinii* (Baranton et al., 1992), *Borrelia lusitaniae* Le Fleche et al., 1997, *Borrelia valaisiana* Wang et al., 1997, *Borrelia afzelli* (Canica et al., 1993), *Borrelia japonica* Kawabatta et al., 1993, *Borrelia miyamotoi* (Fukunaga et al. 1995 et al., 1993), *Borrelia andersoni* Marconi et al., 1995 e *Borrelia lonestari* (Barbour et al., 1996).

2.2. *Borrelia anserina*

2.2.1. Histórico e Taxonomia

Este agente etiológico foi descrito pela primeira vez por Sakharoff no ano de 1891, quando relatou um considerável surto infeccioso em uma população de gansos *Anser cygnoides* (Linnaeus, 1758) na região do Caucasus na Rússia. Devido a este relato, a espiroquetose aviária foi considerada por um bom tempo como a maior causa de mortalidade em aves, sejam em áreas tropicais e subtropicais da Europa, África, Índia e Indonésia; assim como também em regiões da Austrália, América Central e do Sul (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; McNEIL et al., 1949).

De acordo com McNeil et al., 1949, a infecção também foi relatada acometendo galinhas, perus e faisões mongolianos (MATHEY, 1955) nos Estados Unidos (ROKEY; SNELL, 1961) e em alguns casos no Novo México e Texas (FRANCIS, 1956). No Oriente Médio, mais precisamente no Sudão, o primeiro caso de Borreliose aviária foi encontrado em galinhas domésticas, sendo a enfermidade considerada a maior causa de óbitos naquele período. A bactéria também foi encontrada e isolada do carrapato vetor *Argas* sp. no Paquistão (ASLAM et al., 2012)

No Brasil, Marchoux e Salimbeni (1903) relataram um surto de infecção por *B. anserina* em galinhas, e pela primeira vez, demonstraram que o carrapato do gênero *Argas* seria o responsável pela transmissão da bactéria de aves enfermas para outras susceptíveis. Em décadas passadas, a borreliose aviária foi reportada como uma enfermidade aguda e severa, que afetava drasticamente a indústria e o comércio avícola (ARAGÃO, 1911; GORRIE, 1950) e atualmente se encontra restrita a pequenas e médias criações rústicas de

aves coloniais, voltadas para a subsistência e comércio local. Fatores estes que contribuem para a presença do carrapato vetor.

Em 1891, Sakharoff descreveu e nomeou o microrganismo como *Spirochaeta anserina* (WENYON, 1926). No decorrer do século XX, o agente *B. anserina* foi denominada de diversas maneiras (KNOWLES et al., 1932) e suas sinonímias como *Spirochaeta gallinarum*, *Treponema anserinum*, *Spirochaeta anatis* (KRIEG; HOLT, 1984) podem ser encontradas em literatura específica, como no caso do Manual Bergey de Bacteriologia Determinativa, edição de 1984. Os diversos nomes científicos dados a esta espécie, foi devido à realização de muitos testes imunológicos que obtiveram em seus resultados, reações cruzadas em aves de laboratório, utilizando-se cepas obtidas de diferentes regiões, onde o resultado.

Conforme os táxons de bactérias (BARBOUR; HAYES, 1986; NCBI, 2005), esta espiroqueta está taxonomicamente representada da seguinte forma:

Reino - Procaryotae

Classe - Spirochaetes

Ordem - Spirochaetales

Família - Spirochaetaceae

Gênero - *Borrelia*

Espécie - *Borrelia anserina*

2.2.2. Caracterização morfológica da espiroqueta

A espiroqueta *B. anserina* é uma bactéria gram-negativa, microaerófila, de formato helicoidal, apresentando aproximadamente de 15 a 20 fibrilas axiais ou flagelos periplasmáticos (HOLT et al., 1994). São ágeis e extremamente móveis, possuindo ondulações e um cílio em cada extremidade que contribuem para que as mesmas possam desenvolver tais habilidades (BOERO, 1967). Apresentam um cilindro periplasmático, onde em sua região terminal estão inseridos seus flagelos periplasmáticos (BARBOUR; HAYES, 1986). O gênero *Borrelia*, possui uma quantidade reduzida de espiras em relação a outras bactérias da Família (PFISTER et al., 1994; QUINN et al., 1994), porém dentro de uma mesma espécie podem ocorrer casos de pleomorfismo (BENNETT., 1995). Seu processo de multiplicação ocorre por meio da fissão binária transversal ou cissiparidade (AUSTIN, 1993).

2.2.3. Manutenção da cepa de *Borrelia anserina*

O método de criopreservação é a forma mais eficaz de manutenção de uma cepa, tendo em vista a eficácia no fornecimento de células e microrganismos vivos geneticamente estáveis e viáveis para uso em diversas finalidades, além de auxiliar na contribuição experimental em pesquisas e avanços no campo da medicina (BROCKBANK et al., 2007). Uma enorme gama de bactérias são preservadas e mantidas por longos períodos em laboratório, através da padronização das técnicas de congelamento (HOLLAND et al., 2003). De acordo com estudos realizados por Michel e Garcia (2003), procedimentos experimentais utilizando-se bactérias procedentes de criopreservação, tem se mostrado eficazes, já que o agente etiológico após a preservação mantém sua virulência e sua capacidade infectante. Alguns experimentos, como o realizado por Cepeda (2015), comprovaram que a cepa PL de *B. anserina* criopreservada e posteriormente descongelada se mostrou virulenta e altamente infectante, quando inoculada em aves susceptíveis.

Anteriormente ao processo de criopreservação em nitrogênio líquido, Labruna et al (1999), submeteram amostras de soros de aves experimentalmente infectadas a dois processos distintos de estabilização, o glicerol a 50% e o Dimetil-sulfóxido (DMSO) a 10%. Ambos mantêm a infectividade da cepa, mas seus estudos mostraram que o DMSO a 10% se mostrou mais eficaz em relação a sua criopreservação. Dhawedkar e Dhanesar (1983), ao estudarem a eficiência da *B. anserina* conservada em nitrogênio líquido, comprovaram que o sangue infectado adicionado de citrato de sódio, estabilizante de glicerol 6 a 10% e o meio de Hank para suspensão, obtiveram resultados mais consistentes e satisfatórios.

Em alguns laboratórios, a cepa de *B. anserina* tem sido mantida através de passagens sanguíneas sucessivas em aves jovens e no passado em ovos embrionados (LEVINE et al., 1990; BARNES, 1997). Esta mesma cepa foi submetida por McKercher (1949) a vinte passagens sucessivas em ovos embrionados, quando foi observada a presença das espiroquetas na membrana cório-alantóide do embrião.

A técnica de cultivo *in vitro* de *B. anserina* é um procedimento dispendioso, pelo fato desta bactéria possuir característica fastidiosa, necessitando de meios específicos com alto valor nutricional (McNEIL et al., 1949; MERCHANT; PACKER, 1965; HOLT et al., 1994). Após estudar o comportamento e os mecanismos envolvidos na manutenção da *B. anserina* no meio BSK, Levine et al (1990), relatou que as espiroquetas, ao sofrerem experimentalmente doze passagens sucessivas em aves susceptíveis, tiveram sua capacidade virulenta bastante reduzida.

2.3. Biologia do carrapato vetor

O vetor causador da borreliose aviária é um carrapato pertencente à Família Argasidae (Canestrini, 1890) e ao gênero *Argas*. A maioria das espécies deste gênero estão distribuídas na região neotropical, totalizando cerca de 60 espécies em todo o mundo. Na Europa, a transmissão da enfermidade ocorre pelas espécies *A. persicus* e *A. reflexus*. Em Portugal, foi relatada a transmissão da doença pela primeira vez pelo *A. (A) reflexus reflexus*, em ninhos de pombos e pardais em frestas de madeiras, locais estes de fácil instalação do carrapato vetor (ROSA et al., 2004). No Oriente médio e África a transmissão se dá pelo *A. persicus*, e os primeiros registros de *A. persicus* *stricto sensu* foram evidenciados no sul da Austrália, sendo encontrado parasitando aves domésticas (PETNEY, 2004). Já no continente africano, *Argas africanus* Hoogstraal et al., 1975 foi estudado em todos os seus estágios de vida em laboratório (HOOGSTRAAL et al., 1975) e o seu parasitismo ocorrendo em aves nativas da região. No continente Americano, o carrapato *A. miniatus* é o responsável pela transmissão da doença (HUTYRA, et al., 1974).

2.3.1. O carrapato argasídeo *Argas (Persicargas) miniatus*

O carrapato da espécie *A. (P.) miniatus* é único deste gênero encontrado no Brasil, podendo parasitar aves domésticas e ocasionalmente silvestres. Nas Américas, foi reportado sua presença principalmente no Brasil, quando Rohr (1909), Magalhães (1979) e Schumaker et al. (1988) descreveram seu comportamento e biologia. Os aspectos biológicos do carrapato adulto, foi avaliado por Santos et al., 2011, quando avaliaram o comportamento do *A. miniatus* em condições controladas no laboratório (em estufa B.O.D 27±1°C e 80±10% UR) e em condições ambientais não controladas (ambiente de laboratório nas estações chuvosa e seca).

Segundo Kohls et al (1970), o referente vetor possui extrema importância clínica e epidemiológica no Continente Americano, pois seu parasitismo está associado a um quadro de intensa espoliação e anemia considerável das aves acometidas, assim como a capacidade de transmitir a *B. anserina* e outros patógenos.

Este carrapato pode ser encontrado no seu ambiente natural, parasitando aves de pequenas e médias criações rústicas de galinhas domésticas. Economicamente, esse parasitismo das aves pode acarretar em um quadro desfavorável quanto à produtividade de

uma criação, já que o hematofagismo e a transmissão da borrelia de um carrapato a outro pelas vias transestadial e transovariana, aumentam a população do vetor e impactam negativamente no estabelecimento de uma avicultura familiar (MARCHOUX; SALIMBENI, 1903; HOOGSTRAAL, 1979; LISBÔA, 2006).

Em situações que as aves jovens se encontram em maciça infestação por carrapatos, um quadro paralítico pode ser evidenciado, principalmente quando ocasionado por larvas em final de ingurgitamento (GOTHE; KOOP, 1974; MAGALHÃES, 1979; MANS et al., 2004). Esta paralisia pode acontecer nas asas ou patas e cuja ocorrência gravidade dependem da quantidade de neurotoxina liberada pelos carrapatos nos tecidos das aves.

Este argasídeo pode sobreviver por longos períodos longe de seus hospedeiros naturais (HOOGSTRAAL, 1985), atuando como reservatórios e fonte de infecção natural, nos quais as espiroquetas podem se manter vivas por um longo tempo.

2.3.2. Ciclo evolutivo

O carrapato *A. miniatus* é heteroxeno, nidícola, alimenta-se preferencialmente à noite e apresenta em seu ciclo biológico (Figura 1) as seguintes fases evolutivas: uma fase larval, permanecendo sobre o hospedeiro de 3 a 7 dias completando o seu repasto; 4 ou 5 fases ninfais (sofrendo muda ou ecdise a cada mudança de fase) e fase adulta, alimentando-se de 10 a 45 minutos e apresentando dimorfismo sexual pouco evidente (KOHLS et al., 1970). As fêmeas dependem de realizar um repasto sanguíneo completo e uma cópula inicial para dar início a sua postura (RHOR, 1909). O jejum prolongado, por aproximadamente 60 dias, pode ocasionar mudanças no número e peso das futuras ninfas (SANTOS, 2008).

A diferenciação sexual é evidenciada morfológicamente pelas dimensões e suas características sexuais secundárias (MAGALHÃES, 1979).

Fora de seus hospedeiros naturais, o carrapato pode ser encontrado em ambientes propícios para sua instalação e desenvolvimento biológico, como em galinheiros com pouca luminosidade e troca de cama de frango. O período de fixação no hospedeiro está diretamente relacionado à eficiência da transmissão, embora para os argasídeos esse tempo não seja relevante (DODGE, 1973; HOOGSTRAAL, 1985; SONENSHINE, 1991).

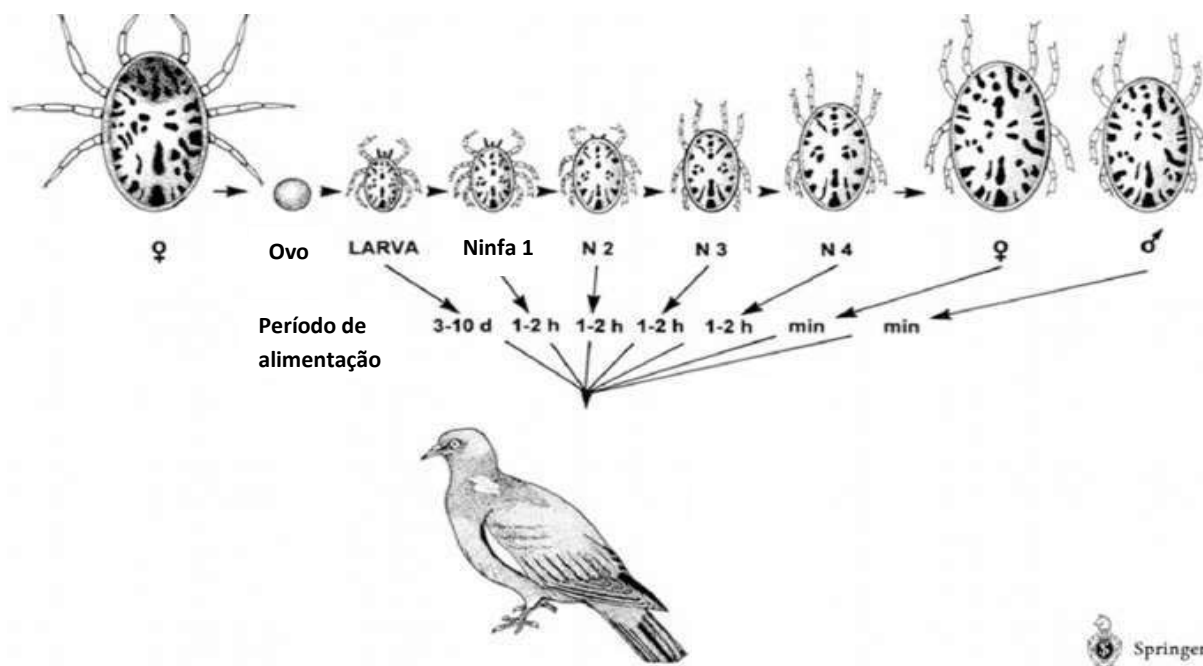


Figura 1. Ciclo biológico de *Argas miniatus*, detalhando suas fases evolutivas, além do período de repasto sanguíneo no hospedeiro referente a cada fase. Disponível em: <https://dokumen.tips/documents/ordem-ixodida.html>.

2.3.3. Relação parasito-hospedeiro

De acordo com Balashov (1972) e Hoogstraal (1985), a transmissão da borrelia por carrapatos da Família Argasidae pode ocorrer pela saliva e principalmente através do líquido coxal. Esta interação é tão íntima que a espécie pode ser isolada e identificada por meio do xenodiagnóstico (APPEL et al., 1993). Três dias após a alimentação em uma ave infectada, é possível detectar a presença das espiroquetas na hemolinfa e líquido coxal dos carrapatos. Completados aproximadamente 15 dias, as espiroquetas se multiplicam e já se encontram instaladas por todo o corpo do carrapato, principalmente nas glândulas salivares e túbulos de Malpighi (BIER, 1985). Ao ocorrer a transmissão do carrapato infectado para uma ave susceptível, a saliva age através de suas propriedades tóxicas, bloqueando células fagocitárias e inflamatórias, colaborando para o estabelecimento e multiplicação do agente etiológico (RIBEIRO et al, 1987; URIOSTE et al, 1994).

Segundo Boero (1967), quando o carrapato finaliza o repasto sanguíneo, completando seu total ingurgitamento, o líquido coxal é expelido na região próxima da peça bucal. As espiroquetas, que já se encontram em toda hemocele do carrapato, se direcionam para o órgão coxal, mediadas por estímulos bioquímicos, e são liberadas juntamente com o líquido coxal sobre a microfissura na pele do hospedeiro causada pela picada (BONÉ, 1939).

Todas as fases evolutivas de *A. miniatus* são capazes de transmitir *B. anserina* para aves susceptíveis (COOPER; BICKFORD, 1993).

Atualmente, cepas patogênicas de *B. anserina* são mantidas viáveis em colônias de carrapatos da espécie *A. miniatus* (LABRUNA et al., 1999). Estes carrapatos infectados podem sobreviver por um longo tempo, quando submetidos a condições laboratoriais em estufa de B.O.D (Biochemical Oxygen Demand), simulando em seu interior às mesmas condições ambientais (BURGDORFER, 1985).

2.4. A Borreliose aviária

2.4.1. Aspectos epidemiológicos

A borreliose aviária é uma doença septicêmica de caráter agudo, que pode acometer aves dos drupos dos anatídeos, galiformes, passeriformes, columbiformes e algumas aves silvestres (WOUDA et al., 1975; QUINN et al., 1994). Tem como seus principais hospedeiros naturais a galinha doméstica (*G. gallus*), patos (*A. cygnoides*), os perus (*Melleagris gallopavo*), faisões (*Phasianus colchius*) e os canários (*Serenus canarius*) (McNEIL, et al., 1949).

Alguns estudos contribuíram ao longo do tempo para reunir informações mais consistentes sobre a epidemiologia da doença. Hutyra et al (1947), relataram que o período pré-patente da infecção quando a transmissão nas aves ocorreu através da picada de carrapatos foi de quatro a seis dias e o período de incubação sendo em média de três a oito dias (BOERO, 1967; BIER, 1985). Em experimento recente, Cepeda, 2015 corroborou com os achados anteriores e revelou que em seu estudo a infecção indicou um período de pré-patência e de incubação equivalente há cinco dias, quando a mesma foi originada pela picada do carrapato. Neste mesmo estudo, relatou-se também que o 8ºDPI, foi descrito como o pico de parasitemia, ou seja, período que ocorre intensa multiplicação e atividade bacteriana.

2.4.2. Sintomatologia clínica

A enfermidade caracteriza-se inicialmente por um quadro de hipertermia e aumento na ingestão de água, severa fraqueza muscular, sonolência e penas arrepiadas (Figura 2), falta de

apetite, posteriormente evoluindo para alterações que cursam com distúrbio gastrointestinal e presença de uma diarreia verde escura (Figura 3). O quadro final cursa com uma hipotermia, paralisia corporal, podendo evoluir para o óbito (LISBÔA, 2006).



Figura 2. Ave infectada experimentalmente por *Borrelia anserina* apresentando estado de sonolência e penas arrepiadas. Arquivo pessoal.



Figura 3. Diarreia com aspecto pastoso e coloração esverdeada. Manifestação clínica presenciada na fase aguda da doença. Arquivo pessoal.

Um quadro clínico similar também foi revelado em estudo realizado por Nasri et al (2010), evidenciando sinais como anorexia, diarreia, palidez de crista e barbela, paralisia de asas e penas arrepiadas durante a fase aguda da infecção. Cepeda (2015) em seu estudo experimental também relatou sintomatologia clínica semelhante, como sonolência, penas arrepiadas e sem interesse pelo alimento, alteração na coloração das fezes, apresentando consistência líquida e cor esverdeada.

Alguns estudos descrevem os principais sinais clínicos da Borreliose aviária (ROA et al., 1958; ROKEY e SNELL, 1961; BARNES 1997). Outros trabalhos ainda relatam a existência de formas superaguda, aguda e subaguda da doença (Boero, 1967). Na forma aguda, ocorre elevação na temperatura, chegando a 43°C, presença de mucosas cianóticas e depressão. No 4º e 5º DPI surgem sinais de hiperventilação respiratória, fraqueza e / ou paralisia de pernas e asas (McNEIL et al. 1949; ROA, 1958). O óbito pode ocorrer devido à formação de embolia devido aos inúmeros organismos aglutinados (DELAMATER e SAURINO, 1952). Nas formas aguda e subaguda é observado anorexia, aumento da sede, fraqueza de asas e pernas, palidez de mucosas e diarreia esverdeada. Barnes (1997) descreveu os sinais clínicos da enfermidade como um aumento acentuado da temperatura corporal, desidratação, perda de peso, excesso de bile e uratos foram notados nas fezes durante os primeiros 4 a 5 dias de doença. Ainda na fase subaguda, as aves entram em coma apresentando temperatura abaixo do normal. A infecção com cepas de baixa virulência provoca a instalação de uma doença branda, podendo passar até mesmo despercebida. As aves que venham a se recuperar tem seu quadro clínico restabelecido e não se tornam portadoras (DICKIE e BARRERA, 1964).

O diagnóstico da Borreliose aviária na fase aguda pode ser realizado através de esfregaços sanguíneos periféricos preferencialmente corados pelo Giemsa, visualização de aglomerados de espiroquetas no sangue através da microscopia de campo escuro (Figura 4) e através de avaliação macroscópica das lesões na necropsia, assim como por exames histopatológicos dos tecidos acometidos, corados pela hematoxilina-eosina (SOARES et al., 2000). Utiliza-se também como apoio ao diagnóstico, o exame histopatológico dos tecidos dos carrapatos infectados e ainda exame de hemolinfa e líquido coxal em microscopia de campo escuro (BIER, 1985). O diagnóstico pode ser concluído através da análise do histórico da região e a observação de carrapatos no local e fixado às aves, assim como a presença de larvas ingurgitadas pelas frestas e paredes do galinheiro (BOERO, 1967).

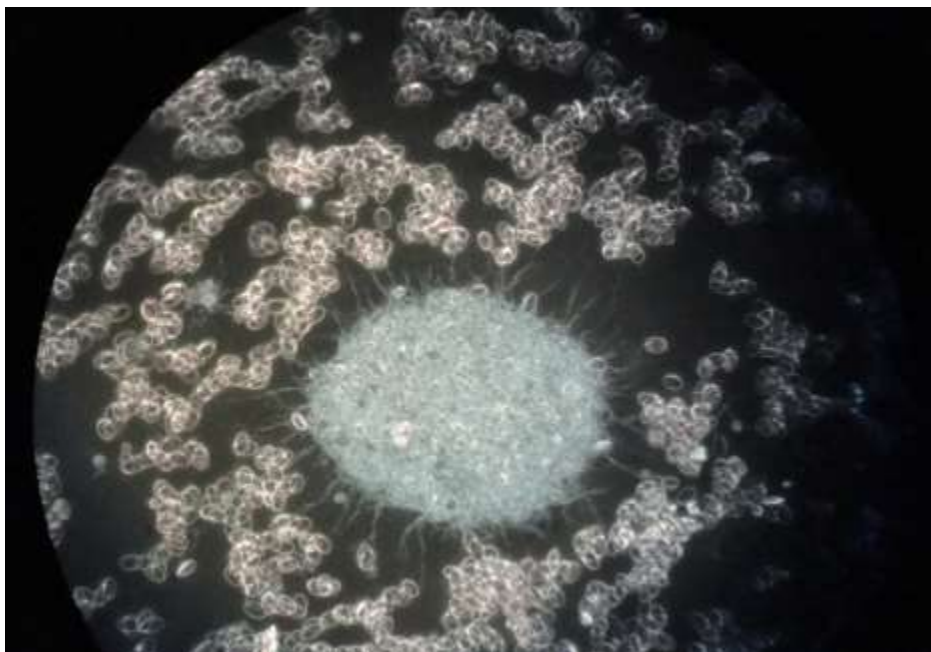


Figura 4. Registro fotográfico da visualização de um aglomerado de espiroquetas (ao centro, rodeado por eritrócitos) em sangue de ave infectada na fase aguda da enfermidade. Observação em microscopia de campo escuro. Obj.40x. Arquivo pessoal.

As técnicas sorológicas como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e de biologia molecular como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) são altamente sensíveis para o diagnóstico de borrelioses (APPEL et al., 1993; MOURITSEN et al., 1996).

As espiroquetas podem ser encontradas no plasma sanguíneo das aves infectadas durante a fase aguda da doença (DICKIE; BARRERA, 1964; BURGDORFER; SCHAWN, 1991). O diagnóstico laboratorial, em muitas vezes, é dificultado pela utilização de antibioticoterapia após longos surtos e mortalidade das aves (GARG; GAUTAM, 1969).

2.5. Descrição das fases clínicas da enfermidade

Segundo Boero (1967), a Borreliose aviária em seu curso de infecção apresenta três fases clínicas ou sinais patológicos que permitem a orientação para um diagnóstico mais eficiente e preciso. O curso da infecção da espiroquetose aviária desenvolve-se nas fases superaguda, aguda e finalmente uma subaguda ou crônica.

A forma clínica superaguda caracteriza-se pela rapidez de seu curso infectante e as aves enfermas podem vir a óbito de forma fulminante, apresentando uma intensa cianose de crista e barbela como únicos sinais perceptíveis. A ausência de sinais clínicos mais evidentes

nesta fase se deve à invasão maciça das espiroquetas no organismo e sua afinidade neurotrópica ocasionando ao sistema nervoso central do animal, uma grave encefalite, com acometimento de meninges e líquido cefalorraquidiano (BOERO, 1967). Esta infiltração cerebral é a causa do estado de torpor e profunda sonolência observados nas aves doentes à medida que a doença progride.

A forma aguda da Borreliose aviária é a fase de mais fácil observação nas aves acometidas pela infecção, desenvolvendo uma sintomatologia clínica que duram cinco ou seis dias e o comportamento mórbido de algumas aves, torna possível um diagnóstico clínico mais preciso. Inicialmente, a sintomatologia aguda cursa com uma intensa polidipsia devido ao aporte sanguíneo para órgãos de irrigação como fígado, rins e baço e um empobrecimento hídrico tecidual que também contribui para sede excessiva das aves doentes.

A intensa multiplicação das espiroquetas no sangue é a causa do aumento da temperatura corporal, chegando ao seu ápice quando se estabelece uma formação de aglomerados de bactérias e posteriormente a ave passa por uma fase apirética devido à ausência total de espiroquetas no sangue. Boero (1967) também afirma que esse comportamento clínico assemelha-se bastante ao desenvolvimento sintomatológico das borreliose humanas ou febres recorrentes.

A infecção gera uma severa enterite, prejuízo ao peristaltismo e derrames biliares são observados, produzindo uma diarreia fétida de coloração esverdeada. A cianose observada é o resultado da trombose causada pelo acúmulo de bactérias, estabelecendo uma estase sanguínea nessas regiões (BOERO, 1967).

A forma subaguda é de longa duração, com a menor presença de sinais clínicos evidentes da enfermidade. Nesta fase, transtornos paralíticos convulsivantes oriundos de possíveis lesões cerebrais podem afetar a coordenação motora do animal. Observa-se também a queda das asas, estado grave de prostração e uma hipotermia paralela. Segundo Boero (1967), esta perda da imobilidade é devido ao grande acúmulo de espiroquetas na circulação sanguínea, que após a crise produz uma grave toxemia no animal.

2.6. A Biologia molecular no auxílio do diagnóstico

As bactérias do gênero *Borrelia*, possuem formato espiralado, parede celular simples e fina, cujas dimensões variam de 10 a 30 μ de comprimento e 0,2 a 0,3 μ de diâmetro (STEERE

et al., 2004; KRUPKA et al., 2007). A sua extrema mobilidade se deve a ação de seus flagelos, que são encontrados juntos e dispostos em cada extremidade. Estes flagelos são compostos basicamente por dois tipos de flagelinas: a flagelina A (*flaA*), de tamanho menor, pesando aproximadamente 38kDa e outra maior, a flagelina B (*flaB*), de 41kDa. Estas estruturas estão presentes e bem preservadas em bactérias da espécie *B. burgdorferi* sensu lato. Estudos em laboratório têm mostrado que as borrelias perdem seus flagelos e sua morfologia espiralada, quando são submetidas a um cultivo *in vitro* (KRUPKA et al., 2007).

Diante destas informações genéticas, a aplicação de técnicas moleculares como a *nested* -PCR e *Real time*-PCR para confirmação do diagnóstico precoce de doenças causadas por espécies do gênero *Borrelia*, tornam-se pontuais e com um alto grau de confiabilidade (MILLAR et al., 2003).

As técnicas de biologia molecular foram ao longo do tempo se aperfeiçoando e proporcionaram o surgimento de métodos mais sensíveis, envolvendo a detecção de DNA de agentes etiológicos tanto em amostras ambientais, coletadas visando investigação epidemiológica, como em amostras de indivíduos infectados experimentalmente, amplificando o DNA do patógeno alvo (MONTANDON, 2012).

A Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) tem se mostrado, uma técnica usual e muito eficaz, para este propósito, devido a sua elevada sensibilidade e especificidade. A *nested*-PCR é uma variação da reação de PCR convencional e tem se mostrado mais sensível como ferramenta diagnóstica para patógenos de interesse em saúde pública. Ela baseia-se no uso da PCR para amplificar uma sequência mais interna de um fragmento previamente amplificado, aumentando assim a sensibilidade em detrimento à técnica convencional. Estudos anteriores revelaram o uso da *nested*-PCR para a detecção de Doença de Lyme e outras enfermidades causadas por espécies do gênero *Borrelia*, tanto em indivíduos infectados como em amostras ambientais (CLARK et al., 2004).

A biologia molecular é uma importante ferramenta no auxílio do diagnóstico das principais doenças avícolas, como por exemplo, no caso das zoonoses causadoras de grande mortalidade em granjas, como a salmonelose, micoplasmose e a clamidiose, esta última afetando mais pássaros exóticos. Em países em processo de desenvolvimento, onde os recursos laboratoriais são escassos, o diagnóstico destas e outras doenças se tornam dificultoso e impreciso apenas por cultura bacteriana e testes bioquímicos (CHEN; MIFLIN; ZANG et al., 1998) evidenciando assim a importância da PCR em relação à sensibilidade e confiabilidade do diagnóstico de bactérias de difícil crescimento em meio de cultura

(MOLINA; TOBO, 2004). Estudos anteriores mostraram que a caracterização molecular de *B. anserina* foi feita apenas em cepas oriundas dos Estados Unidos (BUNIKIS et al., 1998; MARCONI; GARON, 1992).

Atualmente no Oriente Médio, mais precisamente na região do Irã, foram realizados estudos que detectaram através de PCR, a presença da *B. anserina* no interior de glândulas salivares e intestinos de *A. persicus*, demonstrando que a cepa encontrada é semelhante filogeneticamente a outras já relatadas em outras partes do mundo (HOSSEINI-CHEGENI et al., 2017).

2.7. Caracterização anatomopatológica da Borreliose aviária

O marco inicial dos estudos anatomopatológicos envolvendo a Borreliose aviária se dá em 1949, quando McNeil estudou a infecção em perus e descreveu o exame histopatológico, descrevendo também as alterações causadas no baço, fígado, pulmões, rins, miocárdio, intestinos e sistema nervoso central. Conforme Hutyra et al (1947), as espiroquetas primeiramente multiplicam-se no fígado, baço e medula óssea. Após cinco a seis dias, as bactérias se dirigem à corrente sanguínea, onde ocorre intensa multiplicação, produção de substâncias tóxicas, levando o hospedeiro a um quadro septicêmico grave.

Shommein e Khogali (1974), após coletarem órgãos afetados pela infecção, avaliaram a presença de alterações teciduais, corando-os com hematoxilina-eosina (HE). As espiroquetas também são facilmente visualizadas em tecidos acometidos, principalmente na fase aguda da infecção, quando se utiliza técnica de impregnação pela prata (BARBOUR; HAYES, 1986; QUINN et al. 1994).

Os órgãos mais acometidos pela doença são o fígado e o baço, sendo assim os mais observados no exame *post-mortem* das aves infectadas.

2.7.1. Medula Óssea

Nas aves, a medula óssea é o principal quartel-general da eritropoiese, embora divida com o baço esta função formadora de eritrócitos. Ela também é responsável pela formação dos leucócitos granuloses, plaquetas e em pequena escala linfócitos. A maturação dos linfócitos T e B ocorrem na medula óssea e sua maturação e diferenciação em outros órgãos

primários. No seu interior, são encontrados capilares e tecido adiposo preenchendo e constituindo a medula amarela.

Ao nível microscópico, a medula das aves é formada de um retículo e fibras de reticulina, caracterizando a rede reticular do tecido. São nesse emaranhado de fibrilas, que são encontradas células da série granulosa em fases diversas de evolução, eritrócitos completando seu ciclo e células grandes como os megacariócitos (SANTOS, 1978).

Shommein & Khogali (1974) e Lisbôa (2008) descreveram um episódio marcante na série vermelha de aves infectadas por *B. anserina*, como diminuição no número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina. Bandopadhyay & Vegad (1983), relataram que a anemia apresentada no quadro clínico da Borreliose aviária pode ser causada pela destruição de eritrócitos ou por diminuição da produção, que são os mesmos mecanismos que ocorrem em mamíferos. De acordo com Hutyra et al. (1947), essa redução da produção de eritrócitos ocorre devido à multiplicação inicial das espiroquetas no baço e principalmente medula óssea, devido provavelmente à liberação de substâncias tóxicas na corrente sanguínea.

2.7.2. Bursa de Fabricius

A Bursa de Fabrício é um órgão linfóide em forma de bolsa, localizada na região dorsal, na porção final da cloaca, responsável pela maturação de linfócitos B. Assim como o timo, a bursa e as células tronco hematopoiéticas juntam-se à massa celular embrionária e desenvolvem-se para fazer a linfopoiese de células T e B. Ao término da fase embrionária e durante o crescimento da ave, os progenitores linfóides que colonizam a bursa, originam-se da medula óssea (MUELLER et al., 1962).

Este órgão possui em seu interior, um ambiente essencial para a diferenciação dos linfócitos B. Alguns experimentos com aves bursectomizadas foram realizados, demonstrando uma redução significativa na resposta imune humoral (FELLAH et al., 2008)

Da Massa e Adler (1979) infectaram galinhas domésticas com *B. anserina* e avaliaram o estabelecimento da doença em animais saudáveis, bursectomizados e submetidos a doses de dexametasona. Neste experimento, comprovou-se a importância da Bursa de Fabricius no sistema imunológico das aves, já que as aves bursectomizadas e tratadas com dexametasona não obtiveram resposta humoral eficiente perante a presença do antígeno.

2.7.3. Baço

O sistema imunológico das aves assemelha-se bastante ao dos mamíferos (VAINIO; IMHOF, 1995), todavia, estruturalmente os órgãos linfóides apresentam algumas diferenças. O baço possui um papel imunológico secundário no sistema imune das aves, de formato arredondado e formado por dois segmentos: a polpa vermelha, responsável por armazenar eritrócitos e neutralizar a ação de antígenos e a polpa branca, porção rica em linfócitos encarregada da resposta imunológica (TIZARD, 2002). Na borreliose aviária, é evidenciado quadro de esplenomegalia, com um aumento considerável do órgão, apresentando lesões caracterizadas por áreas multifocais de infartos anêmicos e hemorrágicos. Toda essa lesão, provavelmente é causada pelo acúmulo excessivo de espiroquetas durante a fase aguda da infecção, levando conseqüentemente a várias embolias capilares (BOERO, 1967).

Bandopadhyay e Vegad (1983) e Nasri et al (2010) realizaram um estudo sequencial em aves de diversas idades, e puderam comprovar que o baço de todas as aves infectadas apresentaram tais lesões em menor ou maior grau, em relação ao tamanho do órgão e manchas na superfície. Percebeu-se então a capacidade imunológica mais apurada do baço de animais mais jovens. Microscopicamente, o tecido esplênico revela a presença de um considerável infiltrado inflamatório com células monocitárias. Encontra-se também a presença de inclusões e diversas vacuolizações devido à intensa atividade fagocítica dos macrófagos (BOERO, 1967).

2.7.4. Fígado

Diversas alterações hepáticas podem ser encontradas em aves, podendo incluir distúrbios circulatórios, tóxicos, neoplásicos e infecciosos. As lesões no fígado propriamente dito são inespecíficas quanto à sua etiologia, embora possam prover informações sobre a ocorrência de enfermidades sistêmicas (HOERR, 1996). O fígado alterado pela infecção por *B. anserina*, apresenta-se modificado em relação ao tamanho, forma, coloração e presença de extensas áreas de lesão. Segundo Boero (1967), estabelece-se um quadro de hepatomegalia, com órgão se mostrando friável ao corte, superfície com pequenos focos de necrose, coloração amarelada, sugerindo uma degeneração gordurosa difusa do órgão.

Quanto à vesícula biliar, esta se encontra repleta e distendida, armazenando uma bile verde escura e espessa.

2.7.5. Rins

No curso agudo da infecção, os rins encontram-se totalmente hiperêmicos, hemorrágicos, friáveis, aumentados em seu tamanho e com extensos focos de congestão. Microscopicamente, pode-se notar uma intensa atividade degenerativa do ducto coletor, revelando a presença de depósitos hialinos e um infiltrado inflamatório linfocítico no tecido intersticial (BOERO, 1967).

2.7.6. Coração

As principais lesões e alterações são encontradas ao nível do miocárdio, com a presença de um considerável infiltrado inflamatório. Alterações mais importantes podem ser relatadas, como, tumefação das fibras cardíacas, endocardite e pericardite com acúmulo de exsudato fibrinoso na cavidade (McNEIL, 1949; BOERO, 1967).

2.7.7. Sistema Nervoso Central (SNC)

Boero (1967) e Cepeda (2015) descreveram alterações da enfermidade mais consistentes ao nível de cérebro e cerebelo, com grandes áreas de congestão e edema submeningeano, presença de perivasculite e hiperemia de córtex. Ginawi e Shommein (1980) também descreveram inchaço e fragmentação de fibras neurogliais e formação de um edema perineural.

2.7.8. Pulmões e sacos aéreos

O sistema respiratório das aves é constituído por duas narinas, laringe, traqueia, laringe, brônquios primários, secundários e terciários, pulmões e sacos aéreos (STEINER e DAVIS, 1985). Alguns patógenos podem acometer o sistema respiratório concentrando-se na porção superior, podendo causar inchaço e edema de parte da cabeça, em virtude de infecções

nos seios nasais. Nas lesões mais severas de trato respiratório inferior observadas são traqueíte, bronquite, pneumonia e aerossaculite (CASTRO, 2000).

Histologicamente, o tecido pulmonar acometido pela Borreliose aviária apresenta-se com áreas de obstrução, evidenciando a presença de trombos. Há a uma intensa hiperplasia epitelial e brônquica, hipersecreção de células caliciformes com deformação dos cílios e intenso infiltrado inflamatório linfocítico com macrófagos. (SRINIVASAN e RAO, 1966). Já os sacos aéreos podem estar distendidos e com aspecto opaco, mostrando uma coloração esbranquiçada em sua superfície.

2.7.9. Pâncreas

Longitudinalmente, o pâncreas nas aves localiza-se no mesentério dorsal, desde o fígado até a flexura cranial do duodeno, sustentando-se às alças duodenais por ligamentos. Segundo NICKEL et al. (1977), o órgão emite três diferentes ductos pancreáticos nas aves e nos pombos, dois dos quais surgem de um ventral e do lobo dorsal. Esta morfologia foi comparada por GULMEZ (2003), quando afirmou que, no ganso, há apenas dois ductos e de LIU et al. (1998) que afirmam que no pato existem apenas dois ductos.

Microscopicamente, o pâncreas de galinhas corresponde a uma estrutura composta por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo frouxo (KADHIM et al. 2010). Não há trabalhos recentes na literatura sobre as consequências da infecção por *B. anserina* em pâncreas de galinhas domésticas.

2.7.10. Intestinos

O arranjo anatômico confere aos intestinos uma enorme superfície de contato, que permite às aves absorver eficientemente água e nutrientes. Substâncias como toxinas e patógenos lesionam a superfície intestinal e reduzem a sua capacidade absorptiva (RUTZ et al., 2015).

A ocorrência da diarreia esverdeada é um sinal característico da Borreliose aviária (GROSS, 1978). Desenvolve-se um quadro de enterite severa, devido à presença de substâncias tóxicas produzidas pela ação das espiroquetas (SHOMMEIN e KHOGALI, 1974). Na microscopia, é encontrado alterações como hemossiderose de 72 a 144 horas após a infecção. Sugere-se que esta mudança na coloração das fezes ocorra devido a uma enterite

catarral causada por uma inflamação da lâmina própria intestinal e também a presença de hemossiderina (BANDOPADHYAY e VEGAD, 1983).

2.7.11. Ovário e oviduto

O sistema reprodutor feminino das aves é formado por um ovário esquerdo e um oviduto associado, desembocando em uma cloaca (JOHNSON, 2006; SAMUELSON, 2007). O ovário funcional localiza-se anterior ao rim e posterior ao pulmão, fixado à parede dorsal do corpo. Após a diferenciação sexual, o ovário apresenta uma medula, formada por tecido conjuntivo, nervos e uma rede vascular, e um córtex onde se observam folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (GILES et al., 2006; JOHNSON, 2006).

O folículo ovariano consiste de um oócito em crescimento formado por vitelo e uma vesícula germinativa, além de uma parede folicular formada por uma membrana perivitelínica, uma membrana granulosa, por uma teca interna e uma teca externa (BACHA & BACHA, 2003; JOHNSON, 2006).

Já o oviduto, mostra-se como um tubo muscular espiralado, percorrendo desde o ovário esquerdo até a cloaca. Este órgão é dividido em cinco regiões funcionais, distintas anatomicamente e histologicamente: o infundíbulo, o magno, istmo, útero e a vagina.

Atualmente, são escassos os estudos sobre as alterações ocorridas no sistema reprodutor das aves decorrente do quadro agudo da infecção por *B. anserina*.

2.8. Impregnação pela prata

A visualização das espiroquetas nos tecidos acometidos pela enfermidade é auxiliada por técnicas largamente utilizadas para esta finalidade, como a impregnação pela prata. Esta técnica se torna muito eficiente na detecção tecidual de algumas bactérias específicas, como *Helicobacter pylori* (Marshall e Warren, 1980), *Legionella pneumophila* (Brenner; Steigerwalt; McDade, 1979), além do grupo das espiroquetas.

Levaditi (1905) utilizou a impregnação por prata em blocos de tecido para visualizar *Treponema pallidum* (Schaudinn e Hoffman, 1905) o agente causador da sífilis. Vail (1987) e Churukian (1988) descreveram a utilização de forno microondas como uma das modificações feitas para aprimorar a técnica de coloração de prata. Burns (1982), utilizando o método

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

2.9. Imuno-histoquímica: uma revisão sobre a técnica

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica empregada na rotina diagnóstica e na pesquisa humana desde 1970, contudo, o seu uso na medicina veterinária é relativamente recente, principalmente com a intenção de diagnosticar doenças infecciosas e neoplásicas (RUIZ et al., 2005). A IHQ utiliza como material principal, amostras de tecidos fixados em formol e inclusos em parafina e que são, portanto, viáveis para o diagnóstico e pesquisa por longos períodos de tempo (BERTHEAU et al., 1998).

O objetivo primordial da técnica é demonstrar a presença de antígenos em cortes de tecidos por meio da utilização de anticorpos específicos, uma vez que, antígeno e anticorpo ligam-se covalentemente, ocorrendo uma reação química, com precipitação de cromógenos visíveis por microscopia de luz. Atualmente têm se estudado o avanço da técnica, através de muitos testes que favorecem a padronização da reação, avaliando-a quanto sua sensibilidade, podendo até em alguns casos detectar um ou mais antígenos simultaneamente ou mesmo avaliar a presença de um antígeno em particular em vários tecidos em uma única seção (RAMOS-VARA et al, 2005)

Segundo Ramos-Vara et al (2008), a técnica pode ser dividida em quatro etapas: a silanização e o tratamento dos cortes histológicos com álcoois, xilol e água destilada, antecedendo à incubação com o anticorpo primário; a segunda inclui as reações imunológicas propriamente ditas; a terceira etapa inclui as técnicas de visualização da reação antígeno-anticorpo e o último passo, a interpretação dos resultados.

A utilização da imuno-histoquímica permite analisar se o agente identificado está presente na lesão, sendo considerado um importante teste de diagnóstico *post mortem* (NUNOYA et al. 1995; NUNOYA et al. 1997; RADY et al. 2000). É um método que apresenta resultados satisfatórios, permitindo a visualização das borrelias, caracterizando microscopicamente as lesões produzidas, e revelando as marcações antigênicas do patógeno nos tecidos (LEBECH et al., 1995). A imunofluorescência também é usada em tecidos de carrapatos para a observação de espiroquetas.

A Coloração Warthin-Starry (impregnação por Ag) e imuno-histoquímica são importantes instrumentos para observação de espiroquetas (Kerber et al., 2001), e são largamente utilizadas no auxílio do diagnóstico nos casos de leptospirose, sífilis e borrelioses.

Há escassos relatos sobre a utilização da técnica de imuno-histoquímica como auxílio no diagnóstico da borreliose aviária. Sua eficiência é comprovada devido ao sucesso de inúmeros experimentos relatando sua utilização no diagnóstico de lesões causadas por bactérias da família das espiroquetas. Para que o diagnóstico da borreliose aviária seja efetivo, é fundamental associar os dados do quadro clínico, das lesões macroscópicas e histopatológicas, com a identificação do agente etiológico (YILMAZ et al., 2011; TIMURKAAN, 2011).

2.10. Controle e Profilaxia

O controle da Borreliose aviária em galinhas domésticas é um procedimento difícil, tendo em vista o comportamento e a biologia do carrapato argasídeo. A melhor forma de profilaxia da doença é quando a mesma se encontra em estado endêmico em determinada área, não introduzindo aves susceptíveis em meio a aves infestadas por carrapatos.

O controle dos vetores é essencial para diminuir a disseminação da doença, ajudando a controlar os surtos e a mortalidade nas granjas. O controle também pode ser feito de forma individual, mergulhando as aves em uma solução de malathion a 0,5% (BARNES, 1997) e ambiental, utilizando o mesmo princípio ativo em frestas e fendas, ou em qualquer local que o carrapato possa se esconder e completar seu ciclo biológico (RODEY e SONI, 1977).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aprovação do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA)

Este estudo está em concordância com os princípios éticos de experimentação animal e foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob o protocolo número 4886061115/2017

(CEUA-IV/UFRRJ). O bem-estar de todos os animais envolvidos foi preservado, em relação à dieta alimentar e hídrica, instalações e conforto térmico em todas as fases do delineamento experimental.

3.2. Obtenção e instalação das aves

Para execução do experimento foram adquiridas 31 aves de 1 dia de vida, da espécie *G. gallus domesticus* e linhagem “Redbro Plumé” ou “Caipira Colonial Francês”. A escolha dos animais foi realizada de forma que fosse mantido o mesmo lote, sexo (apenas fêmeas) e aptidão (aves de corte). As aves foram obtidas de um núcleo avícola situado na cidade de Caxias do Sul – RS e classificado através de sua atividade principal como Granja de Matrizes de Galinha. As aves foram imunizadas ainda no incubatório contra Doença de Marek e Boubá Aviária, monitoradas rigorosamente de acordo com o certificado de vacinação e acompanhadas em seu transporte conforme descrito no formulário de Guia de Trânsito Animal (GTA). Além disto, suas matrizes ainda na granja foram consideradas isentas de *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp.

Durante todo o período experimental, as aves foram mantidas em seus respectivos alojamentos, respeitando as condições ideais para cada fase de criação. Do primeiro ao 10º dia de vida, as aves foram acondicionadas em um círculo de proteção com a utilização de campânula e cama de maravalha. A partir do 10º dia, as aves foram mantidas em gaiolas individuais pertencentes ao Laboratório de Doenças Parasitárias, contendo comedouro e bebedouro individuais, onde receberam ração de crescimento farelada e água *ad libitum*. Diariamente e de forma cuidadosa, um responsável técnico realizou a limpeza das gaiolas, removendo assim sobras de ração, fezes e urina, evitando o excesso de odores.

3.3. Local de execução do Estudo

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

aves foram realizadas na Sala de Necropsia, adjacente ao biotério e pertencente ao Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

O processamento e as análises de todo o material coletado foram realizados nos Laboratórios de Doenças Parasitárias e Histopatologia da UFRRJ.

3.4. Criação e manejo das aves

Após a chegada das aves de 1 dia de vida no biotério, prontamente foram acondicionadas em um círculo de proteção característico para fase inicial de crescimento das aves, apresentando dimensões ideais como altura e diâmetro, oferta de água e ração diária e à vontade. Todas estas medidas iniciais foram fundamentais para a adaptação das aves ao novo ambiente, oferecendo as condições necessárias para o conforto e crescimento dos animais e evitando assim possíveis perdas nesta fase de criação (Figura 5).



Figura 5. Círculo de proteção utilizado como alojamento das aves na fase inicial de criação. Arquivo pessoal.

A cama de frango no interior do círculo de proteção foi revestida por maravalha, sendo trocada diariamente, para facilitar a absorção dos excrementos e acúmulo de água de bebida, evitando assim possíveis contaminações.

Antes da chegada dos animais, foi instalada uma campânula para fornecer o aquecimento adequado do ambiente, atingindo assim uma temperatura ideal de 32° C (Figura 6). Até o 10º dia de vida das aves, a temperatura foi mantida por volta dos 30°C, o círculo de proteção foi sendo aberto gradativamente e as aves foram alojadas em gaiolas individuais e suspensas. As técnicas e procedimentos executados nesta etapa inicial de criação e manejo das aves tiveram a finalidade de ofertar condições ideais de conforto e bem-estar, sendo seguidos assim de forma rigorosa e cautelosa (AVILA, 2004).



Figura 6. Aferição da temperatura no interior do círculo de proteção. Arquivo pessoal.

Após a segunda semana de vida até a finalização do experimento, as aves permaneceram em gaiolas suspensas, em um recinto com janelas teladas, ventilado e com a presença de um sistema de exaustão de ar. As aves foram identificadas por anilhas, alojadas em gaiolas individuais, com fornecimento *ad libitum* de ração e água e submetidas às mesmas condições de luminosidade, ventilação, umidade do ar e temperatura. Este controle ambiental foi necessário para minimizar possíveis alterações que possam ocasionar estresse aos animais.

As atividades experimentais e a manipulação das aves foram realizadas no período de agosto a novembro de 2016.

3.5. Aquisição, formulação e componentes da ração fornecida às aves

Durante o experimento, o manejo alimentar das aves foi conduzido de modo a atender todas as necessidades e exigências nutricionais para frangos com aptidão de corte desta linhagem específica. Para obter o desenvolvimento adequado das aves, em todas as fases de seu crescimento, foram seguidas formulações, quantidades e exigências nutricionais padronizadas para a fabricação. A ração foi produzida na Fábrica de Ração do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e elaborada à base de suplementos minerais e vitamínicos com total ausência de coccidiostáticos, antibióticos e de promotores de crescimento. Sua formulação, composição e exigências nutricionais foram calculadas e fabricadas de acordo com o peso e a fase de crescimento em que a ave se encontrava, que compreendeu as fases inicial (1ª a 4ª semana de vida), de crescimento (10ª a 18ª semana de vida) e de acabamento (18ª semana de vida em diante). As rações foram formuladas de acordo com as tabelas de “Exigências Nutricionais para frangos de corte colonial Embrapa 041 por fase de criação” (BASSI et al., 2006) e de “Sugestão de fórmulas de ração para frangos de corte colonial” (AVILA et al., 2005). O fornecimento de ração ofertado às aves durante os experimentos foi aumentado gradativamente para compor as necessidades nutricionais e fisiológicas dos animais.

3.6. Confirmação do estado de higidez das aves

Para esta pesquisa foi determinado, na chegada das aves e na véspera do procedimento de infecção experimental (aos 35 dias de vida) a análise do sangue por meio de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa (eosina azul de metileno, Giemsa – Merck) e fezes para avaliação da presença ou não de hemoparasitos e coccídios, respectivamente. Todas as aves nessas etapas descritas anteriormente revelaram-se negativas segundo análise microscópica.

3.7. Origem do isolado, preparo do inóculo e obtenção de cepa patogênica

A amostra de soro infectado por *B. anserina* foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Estas amostras foram mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido e submetidas a uma temperatura

negativa de 196°C, adicionado de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetil) a 10% como fator 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.

Para obter uma cepa de *B. anserina* com uma capacidade patogênica mais eficaz, foi necessário descongelar uma amostra em banho-maria à temperatura de 32°C ± 1°C e inoculado 0,5 mL de soro infectado (LISBOA et al., 2009), administrado por via intramuscular na região peitoral de uma ave adulta comprovadamente livre de hemoparasitos. No dia anterior esta ave já havia recebido, por via intramuscular, uma dose única de 30mg/Kg/PV de Acetato de metilprednisolona (Depo-Medrol®) (SOUZA, 1998) para promover um quadro de imunossupressão e potencializar a instalação e infecção da bactéria. Nos quatro dias que seguiram a infecção, diariamente, foram coletadas amostras de sangue, submetidas à centrifugação para obtenção do soro e posteriormente analisado em microscopia de campo escuro para verificar a presença de espiroquetas. No quarto dia pós-infecção (DPI), foi constatado o pico da parasitemia (CEPEDA, 2015), assim coletou-se uma nova amostra de sangue e após a centrifugação, o soro já potencialmente mais patogênico foi criopreservado em nitrogênio líquido.

3.8. Origem e infecção dos carrapatos utilizados no experimento

Os carrapatos utilizados no experimento foram obtidos de infestações naturais em criações rústicas e familiares de galinhas domésticas, localizadas no município de Três Rios, RJ e Rio de Janeiro, bairro de Santa Cruz. Foram identificados taxonomicamente como pertencentes à espécie *A. (P.) miniatus*, segundo Magalhães (1979). Os argasídeos foram mantidos no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) em uma estufa Demanda Biológica de Oxigênio “Biological Oxygen Demand” (B.O.D) à temperatura de 27 ± 1°C e umidade relativa acima de 80% em todas as fases evolutivas de seu ciclo biológico.

Com o intuito de aumentar o número de carrapatos suficientes para promover uma infecção consistente, foram infestados com larvas, pintos de 10 dias de vida, alojados em uma caixa com dimensões adequadas para as necessidades das aves, com ração e água à vontade. A caixa foi coberta totalmente por uma lona branca e porosa para que as larvas ao se desprenderem das aves pudessem ser facilmente visualizadas. Devido ao seu hábito de formar ninhos, o chão da caixa foi revestido com pedaços de papelão sanfonado para que os

carrapatos pudessem se abrigar da luz. Após quatro dias, já era possível visualizar as larvas ingurgitadas pelo interior da caixa e na superfície interna da lona. Após se alimentarem nos pintos, a ecdise se deu em mais ou menos 10 a 12 dias (SCHUMAKER & OBA, 1988) assim surgindo a primeira fase ninfal (N1). Estas ninfas foram alimentadas mais duas vezes: em uma ave sadia, para atingir o segundo estágio ninfal e por fim em uma ave infectada por *B. anserina* no pico de parasitemia, visando obter carrapatos de terceiro estágio ninfal (N3) positivos e apropriados para o início da infecção. Esta ave primária, cuja serviu para originar a infecção dos carrapatos foi comprovadamente diagnosticada com a enfermidade, através de exame microscópico do soro com a presença das espiroquetas e acompanhado de um exame anatomopatológico, segundo o laudo de necropsia e histopatológico emitido pelo Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Após duas semanas, foi possível visualizar por microscopia de campo escuro, a presença de incontáveis espiroquetas na hemolinfa e principalmente líquido coxal das ninfas de terceiro estágio.

3.9. Delineamento experimental

O experimento teve início aos 36 dias de vida das aves, período este que as mesmas já estavam adultas e completamente desenvolvidas quanto a sua anatomia e fisiologia, possibilitando uma maior confiabilidade nos procedimentos e resultados esperados.

As aves foram alojadas em gaiolas suspensas individuais e foram identificadas por meio de anilhas de plástico colocadas em uma das patas, com o respectivo número do animal. Os grupos de animais foram assim identificados: um grupo infectado contendo 38 aves infestadas cada uma por quatro ninfas de terceiro estágio infectadas por *B. anserina* e para parâmetro de comparação e controle, duas aves infestadas cada uma por 4 ninfas de terceiro estágio livres de *B. anserina*. Todas as aves foram submetidas às mesmas condições experimentais neste estudo.

As ninfas infectadas foram expostas para alimentar-se nas aves até completar o seu total ingurgitamento e posterior desprendimento. Durante o repasto, as aves eram contidas pelas patas e cabeça, visando evitar a ingestão das ninfas. Os carrapatos eram colocados na face interna das asas e região ventral do animal, onde era possível visualizá-las durante todo o processo.

O delineamento experimental obedeceu à dinâmica e ao curso da infecção por *B. anserina* em aves domésticas, ou seja, com a identificação de uma fase superaguda, durando quatro dias, culminando com o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença (CEPEDA, 2015); uma fase aguda durando cinco dias e uma subaguda (sete dias avaliados), sendo coletado sangue e órgãos e avaliações experimentais até 33 dias depois da melhora clínica das aves.

Todo o manejo e procedimentos experimentais com as aves duraram 44 dias e ocorreram conforme descrito nos tópicos abaixo:

* **Dia 0** → Exposição às aves de ninfas de terceiro estágio de *A. miniatus* infectados por *B. anserina*, coleta de sangue e obtenção de soro sanguíneo.

FASE SUPERAGUDA (em dias pós-infecção – DPI)

* **Dias 1 a 4** → Coleta de sangue e obtenção de soro de 10 aves / Necropsia de duas aves por dia e coleta de fragmentos de órgãos, para as análises histopatológicas, moleculares e imunohistoquímicas.

FASE AGUDA (em dias pós-infecção – DPI)

* **Dias 5 a 10** → Coleta de sangue e obtenção de soro de 10 aves / Necropsia de duas aves por dia e coleta de fragmentos de órgãos, para as análises histopatológicas, moleculares e imunohistoquímicas.

FASE SUBAGUDA (em dias pós-infecção – DPI)

Dias 14, 17, 21, 24, 31 e 44 → Coleta de sangue e obtenção do soro das mesmas 10 aves da fase aguda.

Dias 15, 21, 31 e 44 → Coleta de sangue antes da eutanásia / Necropsia de duas aves por dia e coleta de fragmentos de órgãos, para as análises histopatológicas, moleculares e imunohistoquímicas.

Duas aves foram submetidas às mesmas condições experimentais testadas em cada fase da doença, quanto ao manejo, condições ambientais e técnicas utilizadas. Todos os procedimentos foram realizados com este grupo para efeitos de comparação.

3.10. Visualização das espiroquetas e avaliação dos sinais clínicos

Durante a fase aguda da infecção, foram coletadas amostras de sangue das aves infectadas e acondicionadas em tubos capilares de microhematócrito sem anticoagulantes e posteriormente submetidos à centrifugação para obtenção do soro.

O soro obtido foi diluído em solução salina de PBS e a visualização foi feita em microscópio OLYMPUS BX 41 de contraste de fase com campo escuro.

Diariamente foi realizada uma intensa inspeção nos animais para avaliar a presença dos sinais clínicos da infecção. Foi aferida a temperatura, observado o comportamento alimentar, consistência das fezes, aspecto das penas e coloração de mucosas.

3.11. Coleta de sangue e obtenção do soro

Amostras de sangue total das aves foram coletadas em tubo sem anticoagulante, um dia antes do início do experimento e depois durante o curso da infecção, nas fases superaguda, aguda e subaguda. A coleta foi padronizada, de uma forma que sempre fosse realizada pela manhã e antes do procedimento da necropsia.

A veia de eleição para a venopunção foi a metatársica medial (Figura 7), utilizando uma seringa de 3 mL e um tubo de Eppendorf de 2,5 mL para acondicionar o sangue. As amostras foram transportadas em um isopor com gelo, onde seriam imediatamente submetidas à centrifugação para obtenção do soro.

O soro foi armazenado em freezer a -20°C para posterior utilização nas análises moleculares através da utilização da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). As amostras foram gradativamente sendo processadas no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) quanto à extração do DNA de *B.anserina*.



Figura 7. Coleta de sangue realizada em veia metatársica medial de *Gallus gallus domesticus*.

3.12. Eutanásia, necropsia e coleta do material

Durante as fases clínicas superaguda, aguda e subaguda foram eutanasiadas duas aves por dia. Os procedimentos para a realização das eutanásias estiveram de acordo com as normas vigentes e respeitaram os métodos recomendáveis descritos nas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA para aves (2013), as quais recomendam a eutanásia dos animais através do uso de barbitúricos intravenosos ou intracelomáticos (em casos excepcionais quando da impossibilidade de administração intravenosa).

Na execução desta etapa, optou-se pela administração por via intravenosa de Tiopental sódico (Thiopentax ®), na dose de 1mL/Kg/PV. Após a prática, as aves foram auscultadas para verificar ausência de batimento cardíaco e realizado o exame de perda do reflexo corneal, que foi avaliado por compressão digital da córnea com retração reflexa do globo ocular. Fragmentos de fígado, baço, coração, rins, pulmões, cérebro/cerebelo, pâncreas, medula óssea, intestino delgado e ovário/oviduto foram coletados. A coleta do tecido ovariano ocorreu apenas a partir do 7º DPI, haja vista que antes deste período o órgão ainda não se encontrava desenvolvido o suficiente para permitir a sua fragmentação para as análises.

A necropsia e coleta de material para a avaliação macroscópica e histopatológica seguiram de acordo com o Manual de Necropsia do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CPDA/UFRGS). Os laudos

de necropsia das aves submetidas à infecção experimental por *B. anserina*, foram descritos seguindo ficha própria, possuindo informações como anamnese e diagnóstico patológico. Já a coleta de material (amostras de tecidos) para análises moleculares foi realizada conforme protocolo de Melo et al (2010) sobre a coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular.

3.13. Avaliação clínica

As aves expostas aos carrapatos infectados foram observadas clinicamente durante o curso clínico superagudo, agudo e subagudo. Semiologicamente, nestas fases foram avaliadas coloração de mucosas, coloração e consistência de fezes, letargia ou prostração, aspecto das penas, dieta alimentar e hídrica e verificação da temperatura corporal. A mensuração da temperatura retal foi feita utilizando termômetro clínico digital, levando-se em consideração a individualidade fisiológica de cada animal, como a influência do peso, idade, umidade relativa do ar, conversão alimentar e possíveis mudanças climáticas.

3.14. Análises moleculares

3.14.1. Extração de DNA das amostras de soro e órgãos

As amostras de soro foram descongeladas e submetidas ao procedimento de extração de DNA total, utilizando o protocolo fenol e fenol-clorofórmio, estabelecido por Santolin (2013). A lise celular foi realizada através da adição de 250 µL de PBS, 250 µL de solução de digestão (20mM, Tris-HCl, 20mM EDTA, 400mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulphate, 10mM CaCl₂) com 20 µL de Proteinase K (20mg/mL) em incubação em banho-maria a uma temperatura de 56°C pelo método “overnight”. No dia seguinte, adicionou-se uma solução de precipitação de Acetato de Potássio 5M. O pellet de DNA das amostras (originado após a centrifugação de 16000 xg) foi lavado uma vez com 700 µL de isopropanol gelado, uma vez com etanol, duas vezes com etanol 70% gelado, ressuscitado em 100 µL de tampão de rehidratação de DNA (10mM Tris-HCl, 0,5mM EDTA pH 9,0). As ressuspensões foram incubadas em banho seco com agitação (Thermo Shaker) a 65° C por 1 hora e depois

armazenadas em freezer a -20°C até o momento da realização da PCR. Em cada bateria de extração de DNA, foram adicionadas algumas amostras de soro de aves saudáveis e livres de infecção para garantir que não houvesse possíveis contaminações nesta etapa.

Em relação às amostras de tecidos das aves, as mesmas foram descongeladas e retiradas do RNA later® e sequencialmente lavadas com PBS para retirar o excesso do conservante. A extração de DNA foi realizada individualmente para cada tecido das aves infectadas e controle pelo método fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo estabelecido por Santolin (2013), não sendo utilizada a solução de Acetato de Potássio para precipitação.

3.14.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A *nested*-PCR foi utilizada para avaliar a presença de DNA de *B. anserina* nas amostras de soro e órgãos durante o curso da infecção nas fases clínicas da doença. A técnica de PCR foi realizada conforme protocolo de Ataliba (2006) e baseada em fragmento de um gene de *Borrelia* spp., a Flagelina (*flaB*). Para triagem das amostras, foram empregados na primeira reação os *primers* externos FLALL (5'- ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT-3') e FLARL (5'- GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT-3'), da proteína do gancho flagelar da *Borrelia*, que amplificam um fragmento de 658pb e na segunda reação os *primers* internos FLALS (5'- TCTGATGCTGCTGGTATGG-3') e FLARS (5'- AGGTTTTCAATAGCATACTC-3'), mais sensíveis e que amplificam um fragmento de 330pb, específicos para o gênero *Borrelia* spp.

Para todas as reações, o master mix continha 1,5 µL de DNA (100 ng de amostra padronizada), 5,775 µL de água, 1,25 µL dos iniciadores (contendo 0,8 µM de cada), 1,25 µL de tampão 5X (1X), 0,375 µL de MgCl₂ (2,5mM), 1 µL dos dNTP's (0,2mM) e 0,1 Taq Platinum polimerase (0,375U) (Life Technology ®) em um volume final de 12,5 µL.

As seguintes condições foram utilizadas para as reações de PCR: Na primeira reação a desnaturação inicial ocorreu a 95°C por quatro minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e com extensão final a 72°C por 5 minutos; e a segunda reação, a desnaturação inicial ocorreu a 95°C por quatro minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e com extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações ocorreram em termociclador modelo T100 (Bio-rad®). Como

controle positivo das reações foi utilizado DNA de *B. burgdorferi* cepa G39/40. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura aplicada dentro e fora do fluxo laminar de preparação do master mix, além de um controle de extração (amostra sabidamente negativa extraída junto com as amostras teste).

3.14.3. Eletroforese e análise dos resultados

Um volume de 15 µL dos amplicons obtidos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), sendo separados por eletroforese (5V/cm), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100bases DNA Ladder, product #SM024, Thermo Scientific).

3.15. Histopatologia e Impregnação pela prata

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

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

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

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

Os cortes histológicos foram submetidos às colorações de Hematoxilina-Eosina (Harris, 1900) e pelo método de impregnação por prata (Whartin & Starry, 1920). As

alterações histopatológicas foram observadas em microscópio HUND WETZALAR H600 e as imagens capturadas pela câmera digital NIKON COOLPIX 4300. As espiroquetas foram visualizadas pelo mesmo microscópio, utilizando-se óleo de imersão e objetiva de 100x.

3.16. Técnica de Imuno-histoquímica

Secções histológicas dos órgãos coletados na necropsia foram cortadas em micrótomo a 5µm e aderidas a lâminas de vidro, previamente tratadas com silano (3-aminopropyl-triethoxysilane). As secções foram desparafinadas em xilol, lavadas em álcool e hidratadas em água destilada. A peroxidase endógena tecidual foi inativada com água oxigenada (H₂O₂) a 3% em metanol por 20 minutos. As secções foram lavadas com água destilada, e a recuperação antigênica foi realizada com a utilização de Tampão Citrato (pH 6,0 a 6,1) e incubado em uma estufa por 30 minutos à uma temperatura de 37°C. Novamente as secções foram lavadas com água destilada, e realizou-se o bloqueio das reações inespecíficas com leite em pó desnatado Molico® a 5% diluído em PBS por 15 minutos à temperatura ambiente. As secções histológicas foram incubadas com anticorpo primário policlonal anti-*B. burgdorferi*, “overnight” a 6°C em diluição de 1:3000 em “phosphate buffer saline” (PBS), pH 7,4. Após a lavagem utilizou-se o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc.) por 20 minutos e a revelação das reações foi realizada com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). As secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas com lamínulas.

Lâminas de controles positivos foram casos de borreliose aviária previamente confirmados (CEPEDA et al., 2016). As secções foram consideradas positivas através da visualização de imagens compatíveis com a morfologia das espiroquetas íntegras e restos celulares bacterianos no interstício, no interior de artérias e células parenquimatosas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As manifestações clínicas e patológicas, assim como os resultados obtidos foram divididas por convenção nas fases superaguda, fase aguda e subaguda. Esta divisão foi assim realizada para obter uma exposição dos resultados mais clara e objetiva, seguindo os relatos sobre a clínica da doença reportados por Boero (1967).

4.1. Dados clínicos e epidemiológicos

As aves submetidas à infecção pelo carrapato manifestaram os primeiros sinais clínicos evidentes da doença no 5º DPI, como prostração, comportamento sonolento, penas arrepiadas (Figura 8), inapetência, crista e barbela hipocoradas (Figura 9) e diarreia pastosa e esverdeada. Foram observadas também alterações na temperatura corporal das aves e redução no peso das aves infectadas. As aves do grupo controle mantiveram a saúde e os parâmetros normais durante toda a avaliação clínica.

No 7ºDPI uma ave foi a óbito e imediatamente utilizada para necropsia e coleta de material. Este óbito provavelmente ocorreu devido à intensa toxemia bacteriana e lesões produzidas pela infecção. No 10ºDPI, as aves gradativamente começaram a restabelecer sua saúde, apresentando melhora clínica considerável, solidez na consistência das fezes e voltaram a se alimentar normalmente.



Figura 8. Ave infectada experimentalmente por *Borrelia anserina* apresentando prostração e penas arrepiadas decorrentes do processo infeccioso. Arquivo pessoal.



Figura 9. Ave experimentalmente infectada por *Borrelia.anserina* evidenciando crista e barbela hipocoradas. Arquivo pessoal.

As aves manifestaram os primeiros sinais clínicos da doença apenas no 5º DPI, corroborando com o observado por Boero (1967) e Cepeda (2015) em seus estudos sobre a

sintomatologia da doença, quando o agente etiológico é transmitido pela picada do carrapato infectado. A intensidade dos sinais clínicos também coincidiu com o pico de parasitemia.

A intensa ingestão de água pelos animais na fase aguda da doença ocorre devido ao grande aporte sanguíneo enviado para os principais órgãos de irrigação como o fígado, baço, rins e intestinos. Já o estado de torpor e sonolência que as aves enfermas apresentam durante a infecção se deve à exacerbada penetração das espiroquetas no cérebro, que atravessam a barreira hematoencefálica, alcançando as meninges, causando um edema na região e determinando um caráter neurotrópico à parasitemia (BOERO, 1967). No presente experimento, o curso da infecção apresentou um caráter sobreagudo, evoluindo para agudo e subagudo, com este último apresentando lesões anatomopatológicas importantes.

Estudando experimentalmente a patologia da doença, Nasri et al (2010) observou nas aves doentes manifestações clínicas que cursavam com um quadro de anorexia, diarreia, palidez de crista e barbela, paralisia de asas e penas arrepiadas. Sinais clínicos semelhantes foram observados neste experimento. Bandopadhayay e Vegad (1983) relataram que as alterações gastrintestinais, principalmente em relação à diarreia esverdeada observadas na fase aguda da infecção se deve à presença de enterite e hemossiderose, embora as espiroquetas desapareçam na luz intestinal em 96 horas após a infecção.

Ainda sobre a sintomatologia da doença, Boero (1967) relatou em seus estudos que esta coloração esverdeada das fezes também seja proveniente da biliverdina (extravasamento biliar), que recobre as fezes de uma forma mais intensa. O peristaltismo fica imensamente prejudicado, assim como o mecanismo de absorção de água e nutrientes, formando fezes mais líquidas ou pastosas, que voltam ao normal ao término da fase aguda da enfermidade.

O peso corporal das aves também é intensamente interferido pela doença. O estado de prostração e sonolência fazem com que a ave perca o interesse pelo alimento. Segundo Marchoux e Salimbeni (1903), as aves que conseguem se recuperar após a fase aguda da doença, ganham peso, já que voltam a se alimentar normalmente.

A temperatura corporal normal das aves varia entre 41 e 42 °C (WELKER et al., 2008). O aumento da temperatura se deve à grande quantidade de espiroquetas no sangue e sua intensa multiplicação. Segundo Boero (1967), a febre produz um quadro de fraqueza muscular, pois a bactéria consome grande parte da glicose do plasma e do glicogênio muscular. As aves do presente estudo apresentaram aumento da temperatura corporal, perda

de peso e interromperam o consumo de ração e água durante a fase aguda da doença. Portanto esses dados vão de encontro como relatado na literatura.

4.2. Biologia Molecular

Após a realização da PCR convencional das amostras coletadas no 8ºDPI das aves infectadas no experimento, o soro mostrou ter sensibilidade à diluição de 10^{-4} oriundo do pool de amostras positivas, analisando-se um total de oito diluições das amostras originais.

A eletroforese em gel de agarose abaixo demonstra o resultado obtido após esta padronização (Figura 10).

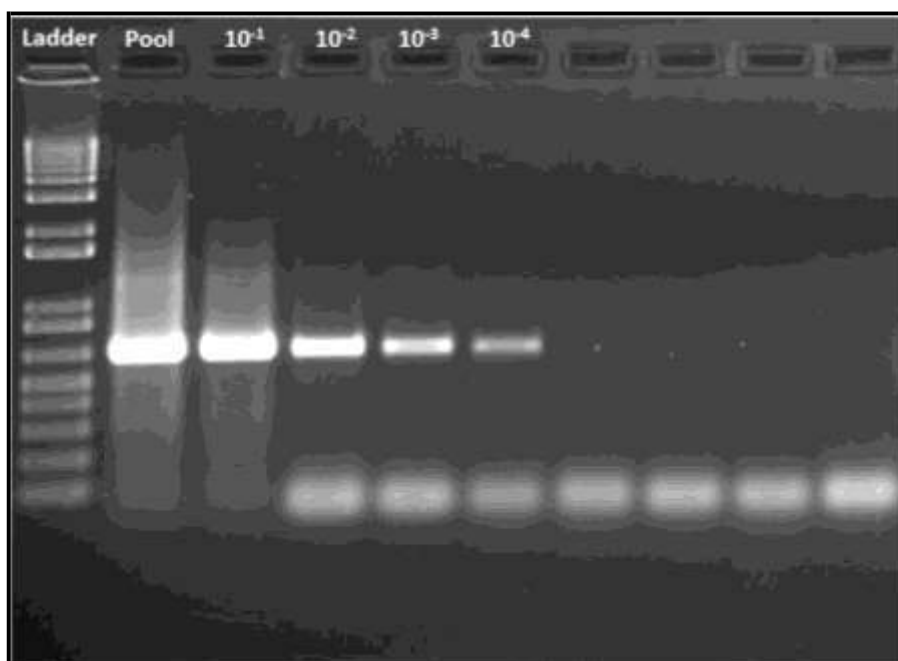


Figura 10. Resultado da PCR visando à padronização das amostras de DNA extraídas no experimento. Amostras de soro coletadas no 8ºDPI e o teste das diluições. Pool - mistura de amostras positivas de aves infectadas por *Borrelia anserina*. Arquivo pessoal.

A escolha de amostras de soro a serem testadas na PCR ocorreu devido a *B. anserina* se encontrar em grande quantidade neste líquido, durante a fase aguda, e ao centrifugar, ocorre sua separação dos elementos figurados do sangue, revelando a presença de inúmeras espiroquetas no sobrenadante e conseqüentemente originando maior quantidade e qualidade de DNA das bactérias.

Algumas amostras de soro infectadas com *B. anserina* amplificaram na PCR para o gene flagelina (*flaB*). A amplificação deu início no 5ºDPI em todas as aves e se perdurou até o 6ºDPI (1 ave), 7ºDPI (1 ave), 8ºDPI (1 ave) (Figura 11), 9ºDPI (2 aves) e 10ºDPI (1 ave). Apenas uma ave não obteve amplificação do DNA nos dias estudados no experimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Amplificação do DNA das amostras de soro infectadas com *Borrelia. anserina*, após a realização da PCR para o gene flagelina *flaB*.

		Dias Pós-Infecção (DPI)															
Ave	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	14º	17º	21º	24º	31º	44º	
1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	

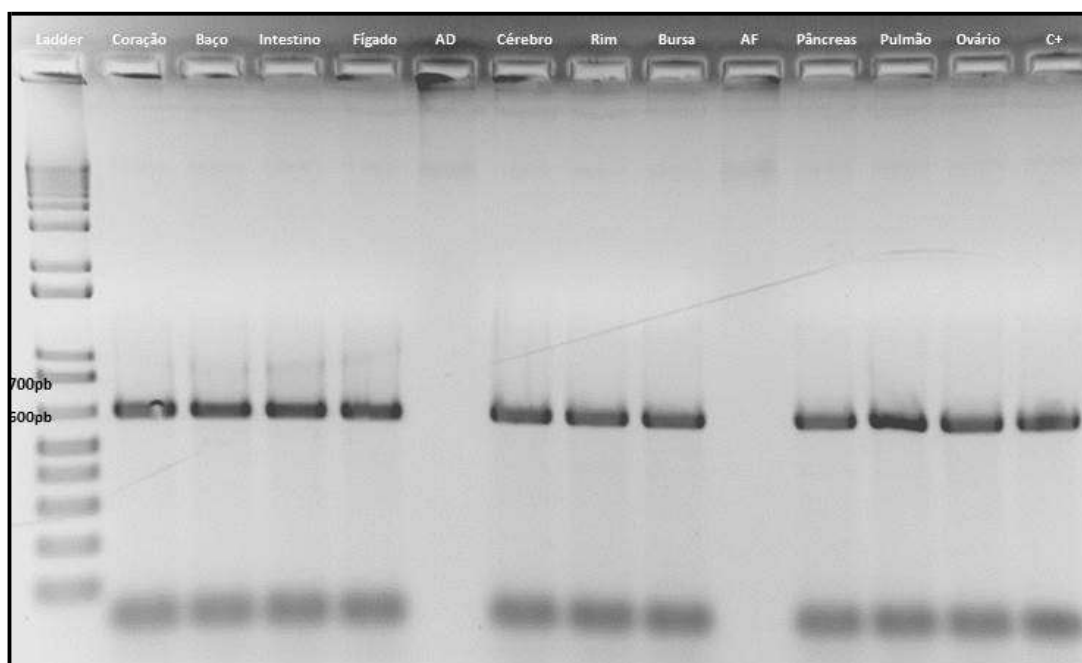


Figura 11. Resultado da PCR (1ª reação) dos órgãos das aves infectadas por *Borrelia anserina* coletados no 8ºDPI. Amplificação de bandas de 658 pares de base para o gene *flaB*. Ladder de 100pb da Life Technologies®. Controle negativo (Água dentro - AD); controle negativo (Água fora - AF); Controle positivo *Borrelia burgdorferi* cepa.

As amostras de órgãos amplificaram para o gene *flaB*, do 4ºDPI até o 8ºDPI (**Tabela 2**). As amostras de baço e fígado amplificaram em todos os dias deste intervalo agudo de infecção. O cérebro começou a amplificar apenas no 5ºDPI e os dias 7º e 8ºDPI, amplificaram o gene para o gênero *Borrelia* em todos os órgãos estudados.

Tabela 2. Amplificação do DNA das amostras de órgãos infectadas com *Borrelia anserina* após a realização da PCR para o gene flagelina *flaB*.

Órgãos	Dias Pós-Infecção													
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	15º	21º	31º	44º
Fígado	-	-	-	1	2	1	2	2	-	-	-	-	-	-
Baço	-	-	-	1	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-
Coração	-	-	-	2	2	1	1	2	-	-	-	-	-	-
Intestino	-	-	-	1	2	1	2	2	-	-	-	-	-	-
Rins	-	-	-	1	1	1	2	2	-	-	-	-	-	-
Pulmão	-	-	-	2	1	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Bursa de Fabricius	-	-	-	1	1	1	2	2	-	-	-	-	-	-
Cérebro	-	-	-	-	2	1	2	2	-	-	-	-	-	-
Pâncreas	-	-	-	-	2	1	2	-	-	-	-	-	-	-
Ovário	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-

Os testes moleculares realizados no presente experimento vêm a contribuir com os estudos anteriores, determinando através da PCR o curso agudo da infecção e promovendo um diagnóstico mais sensível e preciso da enfermidade. A análise molecular da doença foi pela primeira vez detalhado por Ataliba (2006), sendo este autor o primeiro a isolar e caracterizar a doença neste continente, quando caracterizou uma cepa de *B.anserina* originária da América Latina. A Borreliose aviária é reportada em países latinos como a Argentina, Brasil, Guiana e Martinique (BOERO, 1967; KNOWLES et al., 1932; LABRUNA et al., 1999).

No Oriente médio, mais precisamente no Irã, Hosseini-Chegeni (2017) detectou a presença de DNA de *B.anserina* em glândulas salivares e intestinos de carrapatos da espécie *A.persicus*. Algumas cepas atenuadas ou virulentas de *B.anserina* foram isoladas após serem detectadas molecularmente (DJANKOV et al., 1972; DAMASSA e ADLER, 1979; SONI e JOSHI, 1980), obtendo-se um alto índice de amplificação desse DNA entre 98 a 100%,

utilizando-se o gene *flaB* (ATALIBA et al., 2007). O fragmento do gene flagelina *flaB* também foi utilizado no presente estudo e os resultados foram satisfatórios.

De acordo com Boero (1967), as espiroquetas são destruídas totalmente por macrófagos no processo de fagocitose, sendo difícil sua observação na corrente sanguínea e nos órgãos infectados das aves enfermas, após 10 e 12 dias decorrentes da infecção, respectivamente. Esta informação corrobora com os resultados moleculares encontrados neste experimento, onde a partir do 10ºDPI as aves praticamente não apresentavam mais a presença de qualquer DNA de *B.anserina* no soro sanguíneo e nos órgãos.

A amplificação de bandas de 658 pares de base para o gene *flaB*, confirmando molecularmente a infecção das aves por *B.anserina*, associada aos dados clínicos já estudados anteriormente (CEPEDA, 2015), determinaram o caráter septicêmico e agudo da doença.

4.3. Análise macroscópica e histopatológica dos órgãos

A avaliação macroscópica foi realizada durante a necropsia com os órgãos ainda na carcaça e posteriormente a extração e ao corte. Os tecidos e a cavidade celomática também foram inspecionados com a finalidade de verificar a presença ou não de lesões e/ou alterações causadas pelo processo infeccioso.

No 7ºDPI, antes da realização da eutanásia, uma ave veio a óbito, há poucos minutos antes da necropsia. O referido animal foi preparado para a necropsia e utilizado como indivíduo a ser avaliado no experimento. Em relação à avaliação macro e microscópica, apenas as aves necropsiadas no 1ºDPI não apresentaram nenhuma lesão característica da enfermidade.

4.3.1. Avaliação hepática

A grande maioria das aves apresentaram graves lesões durante o curso da infecção, embora dois animais, um no 5º DPI e outro no 9ºDPI, não tenham desenvolvido alterações hepáticas. O fígado destas aves apresentou uma considerável hepatomegalia, ocupando boa parte da cavidade celomática (Figura 12). Os órgãos aumentados em seu tamanho e espessura

mostraram-se ainda com bordas e margens lobulares irregulares com superfície de cor tendendo a vermelho-azulado, sugerindo um quadro de cianose. Estas diferenças tornaram-se bem evidenciadas, quando comparadas a um fígado de uma ave saudável (**Figura 13**)



Figura 12. Hepatomegalia causada pela infecção por *Borrelia anserina*, com o órgão ocupando grande parte da cavidade celomática. Arquivo pessoal.

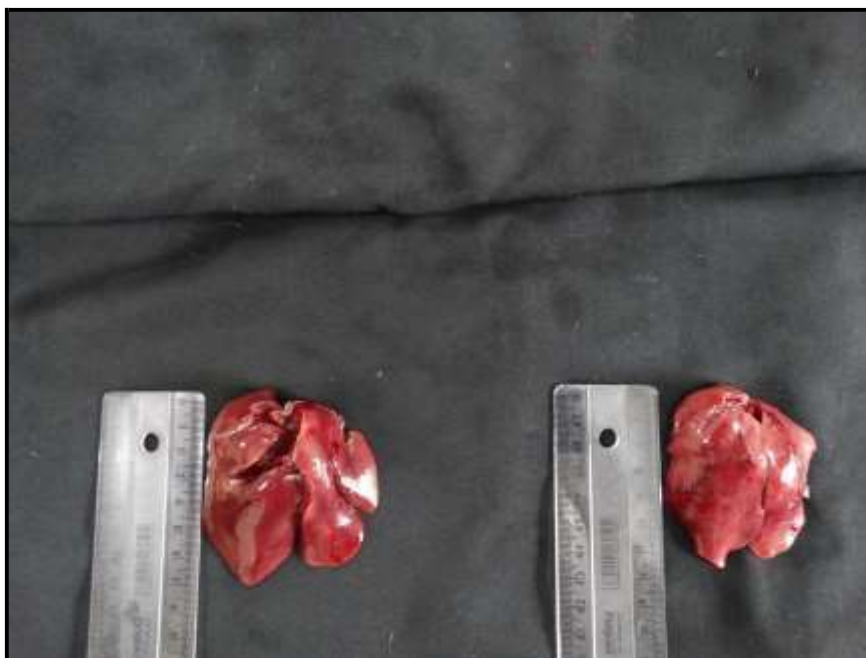


Figura 13. Comparação de um fígado acometido pela Borreliose aviária, apresentando hepatomegalia, presença de áreas de congestão e bordas irregulares (à esquerda) em relação ao fígado de uma ave saudável (à direita). Arquivo pessoal.

Revelou-se também a presença de inúmeras manchas esbranquiçadas com áreas de necrose na superfície dos órgãos. Ao corte, os fígados se encontravam friáveis após sua manipulação. Quanto às vesículas biliares, as mesmas se encontravam cheias, evidenciando uma condição de bilestase, com a bile apresentando-se viscosa e de cor escurecida.

FASE SUPERAGUDA

2ºDPI: Presença de áreas multifocais aleatórias de necrose leve circundadas por infiltrado de linfócitos. **(Diagnóstico Morfológico (DM): Hepatite linfocítica necrosante subaguda multifocal leve);** Presença de infiltrado com grande quantidade de macrófagos e pequena quantidade de linfócitos periportal multifocal leve. Há áreas multifocais de necrose periportal leve. Ocorrência de moderada quantidade de fibrina intravascular. **(DM: Hepatite histiocítica, subaguda, necrosante, periportal multifocal leve, com fibrina intravascular).**

3ºDPI: Presença de infiltrado de linfócitos e macrófagos periportais multifocal a coalescente discreto moderado **(DM: Hepatite linfocítica subaguda periportal multifocal moderada);** Presença de infiltrado de linfócitos e macrófagos periportal multifocal moderado. Vacuolização hepatocelular difusa moderada, caracterizando uma degeneração gordurosa. **(DM: Hepatite linfocítica subaguda periportal multifocal moderada com degeneração gordurosa).**

4ºDPI: Presença de infiltrado de linfócitos e macrófagos periportais discretos **(DM: Hepatite linfocítica subaguda multifocal periportal discreta);** Presença de infiltrado linfocítico periportal focal discreto. **(DM: Hepatite linfocítica subaguda periportal focal discreta).**

FASE AGUDA

5ºDPI: Presença de infiltrado de macrófagos e linfócitos periportal multifocal leve. Infiltrado de macrófagos e linfócitos na túnica média de artérias e tumefação e necrose de células endoteliais (vasculite). **(DM: Hepatite linfocítica subaguda multifocal moderada e vasculite linfocítica multifocal moderada);**

6ºDPI: Presença de infiltrado linfohistiocítico periportal focal leve (**DM: hepatite linfohistiocítica subaguda periportal multifocal leve com vasculite mural**); Presença de infiltrado de macrófagos em grande quantidade e pouca quantidade de linfócitos e plasmócitos periportal multifocal moderado. Esse infiltrado ocupa vasos transmural e há grande quantidade de estrias eosinofílicas de fibrina (vasculite). (**DM: Hepatite histiocítica subaguda periportal multifocal moderada com vasculite e fibrina intravascular**).

7ºDPI: Necrose hepatocelular multifocal moderada associada a infiltrado de macrófagos e heterófilos degenerados (Figura 14). Há infiltrado periportal multifocal de macrófagos e linfócitos e heterófilos degenerados. Há vacuolização hepatocelular difusa moderada; Presença de infiltrado histiocítico multifocal moderado nos espaços porta com depósitos de fibrina intravasculares. Vacuolização hepatocelular, degeneração e necrose com infiltrados multifocais de linfócitos (Figura 15).

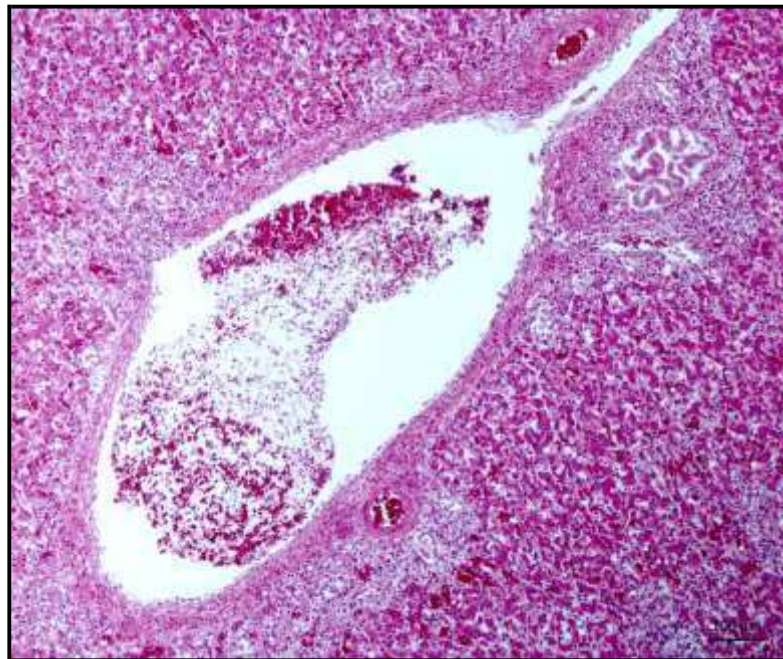


Figura 14. Hepatite linfohistiocítica subaguda multifocal moderada com heterófilos degenerados, necrose hepatocelular multifocal e degeneração gordurosa (Obj. 10x).

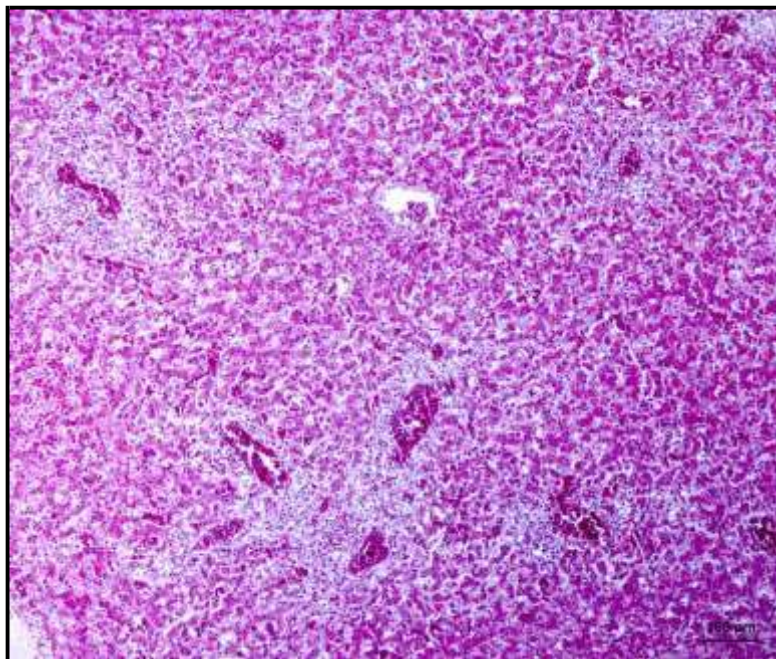


Figura 15. Hepatite linfohistiocítica, subaguda, necrosante, multifocal moderada com degeneração gordurosa (Obj.10x).

8ºDPI: Espaço porta com infiltrado de linfócitos e macrófagos multifocal a coalescente severo. Há áreas multifocais moderadas de necrose. Há estrias eosinofílicas intravasculares (fibrina) (Figura 16); Presença de áreas multifocais a coalescente periportais de infiltrados compostos por macrófagos em maior quantidade e linfócitos em menor quantidade moderada e áreas multifocais discretas de necrose hepatocelular moderada e vacuolização hepatocelular difusa (degeneração gordurosa) (Figura 17).

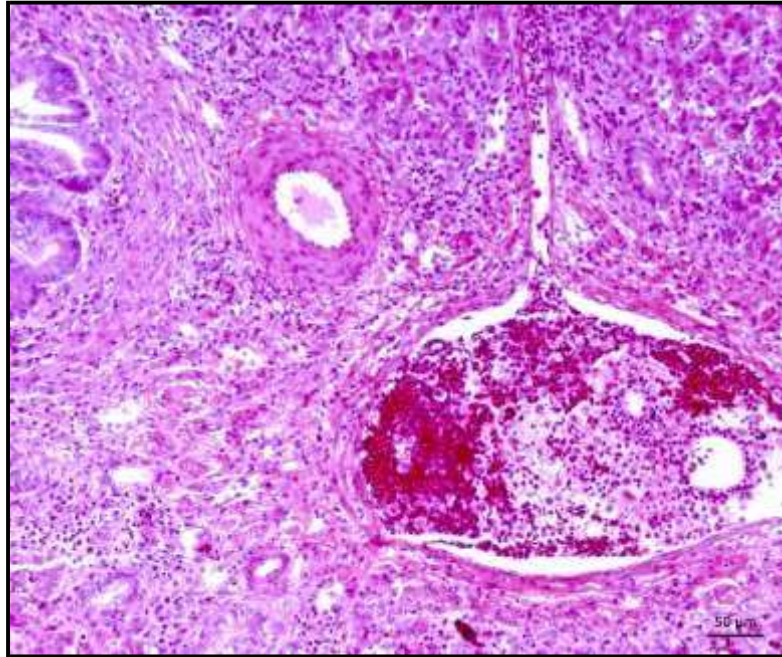


Figura 16. Hepatite linfocítica, necrosante subaguda periportal multifocal severa com fibrina intravascular (Obj.20x).

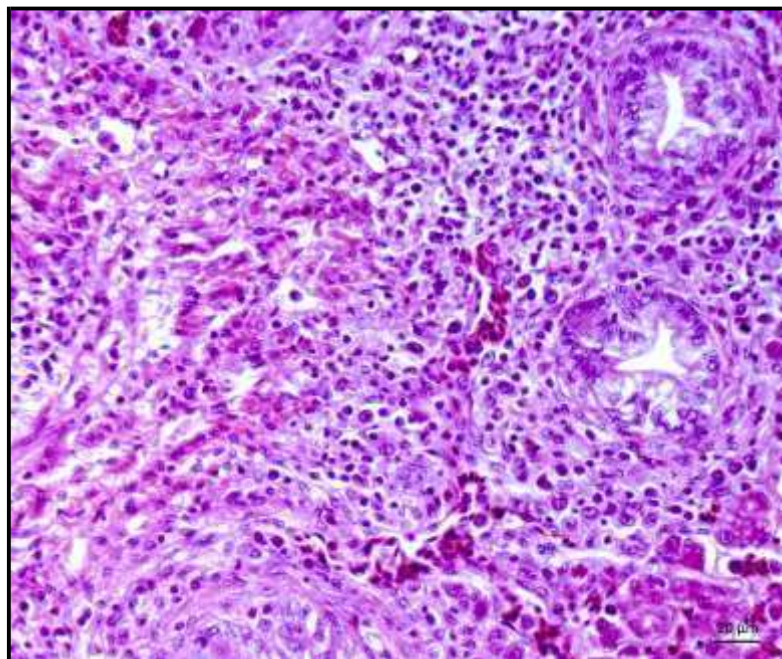


Figura 17. Hepatite linfocítica, subaguda, necrosante multifocal a coalescente moderada. (Obj.40x).

9ºDPI: Infiltrado periportal de macrófagos e linfócitos multifocal moderado. Há vacuolização hepatocelular difusa moderada (degeneração gordurosa). Há estrias eosinofílicas

intravasculares (fibrina). **(DM: hepatite periportal linfohistiocítica multifocal moderada com degeneração gordurosa).**

10ºDPI: Infiltrado periportal de macrófagos e linfócitos multifocal moderada. **(DM: hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal moderado);** Infiltrado periportal de macrófagos e linfócitos multifocal leve. Há estrias eosinofílicas intravasculares (fibrina) e tumefação de núcleos de células endoteliais. **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve).**

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Infiltrados multifocais periportais compostos por grande quantidade de linfócitos e menor quantidade de macrófagos leve. Há estrias eosinofílicas (fibrina) intravasculares multifocais leve. **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve);** Infiltrados linfohistiocíticos periportais multifocais leves. **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve).**

21ºDPI: Infiltrados periportais multifocais de linfócitos e histiócitos e fibrina perivascular leve. **(DM: hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve);** Infiltrados periportais multifocais de linfócitos e macrófagos leve. **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve).**

31º DPI: Infiltrados periportais multifocais leve de linfócitos e macrófagos com estrias eosinofílicas (fibrina) intravasculares. **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve com fibrina intravascular);** Infiltrado de linfócitos e macrófagos multifocal leve. Há estrias eosinofílicas no interior de vasos sanguíneos (fibrina). **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, multifocal leve com fibrina intravascular).**

44ºDPI: Infiltrado periportal de linfócitos e macrófagos, multifocal leve. Há estrias de material eosinofílicos (fibrina). **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve com estrias de fibrina);** Infiltrado periportal de linfócitos e macrófagos, multifocal leve. Há estrias de material eosinofílicos (fibrina). **(DM: Hepatite linfohistiocítica, subaguda, periportal multifocal leve com estrias de fibrina).**

De acordo com Boero (1967), um processo inflamatório agudo intenso é observado no tecido hepático de aves acometidas por *B. anserina*. É evidenciada uma hepatomegalia, acúmulo de gordura e áreas de necrose. Este acúmulo no órgão pode ser difuso ou focal, observando-se um aspecto amarelado, consistência friável, como resultado de lesões dos hepatócitos, prejudicando assim o processo de metabolização hepática (Butler, 1976).

Os achados de necropsia relativos ao fígado, evidenciados neste estudo, são compatíveis com as lesões encontradas por estes autores e confirmam o dano hepático causado pela infecção.

Após diversos estudos envolvendo aves infectadas por *B. anserina*, de diferentes faixas de idade, Nasri et al (2010) também mostraram alterações hepáticas na necropsia em três a cinco dias após a infecção, evidenciando um órgão congesto e friável. Estas alterações de fragilidade tecidual estiveram presentes em todas as aves enfermas do experimento. Estudando a enfermidade em perus, McNeil (1949), observou algumas diferenças nas alterações hepáticas em relação à infecção nas galinhas. Nos perus, o fígado apresentava esporadicamente petéquias, pequenos abscessos superficiais e áreas de infarto na periferia do órgão, porém não tão significativas como as encontradas nos fígados das galinhas submetidas à infecção neste presente estudo.

Sugere-se que o aumento da congestão hepática nas aves infectadas pode estar relacionado à intensa atividade bacteriana, produzindo substâncias tóxicas durante o quadro septicêmico causado pela infecção e pelo processo inflamatório intenso no órgão.

Segundo Boero (1967), microscopicamente o tecido hepático afetado pela infecção por *B. anserina* revela a presença de intenso infiltrado inflamatório, com células monocitárias, presença de vacuolizações e inclusões produzidas pela atuação dos macrófagos em sua atividade fagocitária. Essas alterações também foram encontradas no tecido hepático das aves com sete e oito dias pós-infecção. Em seu experimento visando o estudo da infecção hepática em galinhas acometidas por *B. anserina*, Vashist (2011) revelou alterações semelhantes a encontradas no presente trabalho, como congestão, dilatação dos capilares sinusóides e presença de um infiltrado inflamatório linfocítico, além da degeneração hepatocelular.

Alterações microscópicas hepáticas importantes decorrentes da infecção foram evidenciadas neste estudo e corroboram os achados de Nasri et al (2010), que relatou uma hepatite linfocítica no tecido conectivo interlobular e vasculite com dilatação de veia

porta. Já Srinivasan e Rao (1966) e Shommein e Khogali (1974), descreveram em seus experimentos, uma degeneração gordurosa em seus hepatócitos e infiltração de células mononucleares nos sinusóides, além de uma marcante necrose progressiva, também relatada nas aves do presente estudo durante o curso da infecção.

A presença de necrose hepatocelular multifocal constatada na fase aguda da doença, principalmente no pico de parasitemia, provavelmente ocorreu devido à intensa destruição celular causada pela atividade bacteriana, resultando posteriormente a uma deposição de fibrina intravascular.

4.3.2. Avaliação esplênica

Ainda na cavidade, os baços examinados apresentavam-se em esplenomegalia e com inúmeras manchas esbranquiçadas em sua superfície (Figura 18). Ao compará-los com um órgão saudável, notou-se a diferença em aspecto e tamanho (Figura 19). Os órgãos estavam congestionados e friáveis no momento da retirada e ao cortá-los longitudinalmente para fragmentação, pôde-se verificar uma evidência dos folículos linfóides. Apenas uma ave no 44ºDPI não apresentou lesões e/ou alterações consideráveis na microscopia. A partir do 15ºDPI, os novos folículos começam a ser regenerados pelo órgão.



Figura 18. Esplenomegalia e presença de inúmeras manchas esbranquiçadas na superfície do órgão.



Figura 19. Esplenomegalia. Comparação de um baço afetado pela doença (à esquerda) em relação a um baço saudável.

FASE SUPERAGUDA

2º DPI: Áreas multifocais a coalescentes de necrose moderada com infiltrado de heterófilos degenerados multifocal moderado. As células endoteliais vasculares estão com o citoplasma e núcleo tumefeitos; Infiltrado de macrófagos perivascular multifocal discreto (Figura 20 A)

3º DPI: Infiltrado de macrófagos multifocal discreto. (**DM: esplenite histiocítica subaguda multifocal discreta**); Infiltrado de macrófagos perivascular multifocal discreto. (**DM: Esplenite histiocítica subaguda perivascular multifocal discreta**)

4º DPI: Infiltrado de macrófagos perivascular multifocal leve. Infiltrado de heterófilos multifocal leve com depósito de fibrina perivascular. (Figura 20 B); Infiltrado de macrófagos perivascular multifocal leve. Infiltrado de heterófilos multifocal discreto. (**DM: Esplenite heterofílica e histiocítica subaguda multifocal leve**).

FASE AGUDA

5º DPI: Necrose multifocal moderada associada à infiltrado de macrófagos. Infiltrado de heterófilos multifocal leve e infiltrado de macrófagos multifocal moderado. Há tumefação de

núcleos de células endoteliais. **(DM: Esplenite necrosante heterofílica e histiocítica subaguda multifocal moderada)**; Necrose multifocal moderada com coágulos de fibrina associada à infiltrados de heterófilos e macrófagos e tumefação do citoplasma e núcleo das células endoteliais. (Figura 20 C).

6ºDPI: Necrose multifocal moderada associada a infiltrados de macrófagos e tumefação de citoplasma e núcleo das células endoteliais. **(DM: Esplenite histiocítica, necrosante, subaguda, multifocal moderada)**; Áreas de necrose multifocal moderada associada a infiltrado de macrófagos. Há infiltrado de heterófilos multifocal leve. Coágulos de material eosinofílico multifocais perivascularares (fibrina). Há tumefação de núcleos de células endoteliais. **(DM: Esplenite heterofílica e histiocítica subaguda, necrosante, multifocal moderada com vasculite fibrinóide).**

7ºDPI: Áreas multifocais a coalescentes de necrose severa associada a extensos coágulos eosinofílicos (fibrina). Há tumefação de citoplasma e núcleos de células endoteliais (vasculite fibrinóide). Há infiltrados de macrófagos e moderada quantidade de heterófilos degenerados. (Figura 20 D); Infiltrados de linfócitos e macrófagos multifocais a coalescentes associados a centros de necrose severa com coágulos de fibrina. **(DM: Esplenite linfocítica, subaguda, necrosante, multifocal a coalescente severa).**

8ºDPI: Áreas multifocais a coalescentes de necrose severa com coágulos eosinofílicos (fibrina) associado a infiltrado de macrófagos e heterófilos. Há pigmento castanho no interior de macrófagos multifocal moderado (eritrofagocitose). Há tumefação de núcleos de células endoteliais. Há áreas multifocais de hemorragia. **(DM: Esplenite heterofílica e histiocítica subaguda, necrosante, multifocal a coalescente severa com coágulos de fibrina)**; Há áreas multifocais a coalescentes de necrose severa com coágulos de fibrina associados à infiltrados de macrófagos e heterófilos degenerados com tumefação do núcleo das células endoteliais. **(DM: Esplenite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal a coalescente severa).**

9ºDPI: Áreas multifocais a coalescentes de necrose moderada associada a infiltrados moderados de macrófagos e heterófilos com tumefação de núcleo de células endoteliais. **(DM: esplenite necrosante heterofílica e histiocítica, subaguda, multifocal moderada com ativação de células endoteliais)**; Áreas multifocais de necrose leve associada a infiltrado leve de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Há tumefação de núcleos de células endoteliais. **(DM: Esplenite linfocítica, subaguda, necrosante multifocal leve).**

10ºDPI: Necrose multifocal a coalescente severa associada a coágulos eosinofílicos (fibrina). Há fibrina perivascular, infiltrado de macrófagos e tumefação de núcleos e citoplasma de células endoteliais (vasculite fibrinoide). Há pigmento castanho no interior de macrófagos tumefeitos (siderófagos). Há infiltrado multifocal leve de heterófilos. **(DM: Esplenite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal a coalescente severa com vasculite fibrinoide);** Necrose multifocal a coalescente moderada com pequenos coágulos eosinofílicos (fibrina) e tumefação de células endoteliais e infiltrado multifocal de macrófagos perivascular. Pigmento castanho no interior de macrófagos tumefeitos (hemossiderina). **(DM: Esplenite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal a moderada).**

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Áreas multifocais de necrose discreta associadas a infiltrados de macrófagos perivasculares e tumefação de células endoteliais. **(DM: Esplenite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal discreta);** Áreas de necrose multifocais leve associadas a infiltrados perivasculares de macrófagos e tumefação de núcleo e citoplasma de células endoteliais. **(DM: Esplenite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal leve).**

21ºDPI: Áreas de necrose multifocais a coalescente severas associadas a infiltrados compostos por macrófagos e heterófilos e tumefação das células endoteliais. **(DM: esplenite histiocítica e heterofílica, subaguda, necrosante multifocal a coalescente severa);** Áreas de necrose multifocal leve e tumefação das células endoteliais e infiltrados perivasculares de macrófagos. **(DM: Esplenite histiocítica, subaguda, necrosante, multifocal leve).**

31ºDPI: Infiltrados perivasculares multifocais leves de macrófagos e heterófilos e tumefação das células endoteliais. **(DM: Esplenite histiocítica, subaguda, multifocal leve);** Necrose multifocal discreta, infiltrado heterofílico multifocal leve e tumefação de núcleos de células endoteliais. **(DM: Esplenite heterofílica, aguda, necrosante e multifocal leve com ativação de células endoteliais).**

44ºDPI: Necrose multifocal leve com infiltrado multifocal leve de heterófilos. Há infiltrado perivascular leve de macrófagos e tumefação e núcleos e citoplasmas de células endoteliais. **(DM: Esplenite heterofílica e histiocítica, subaguda, necrosante, multifocal leve);**

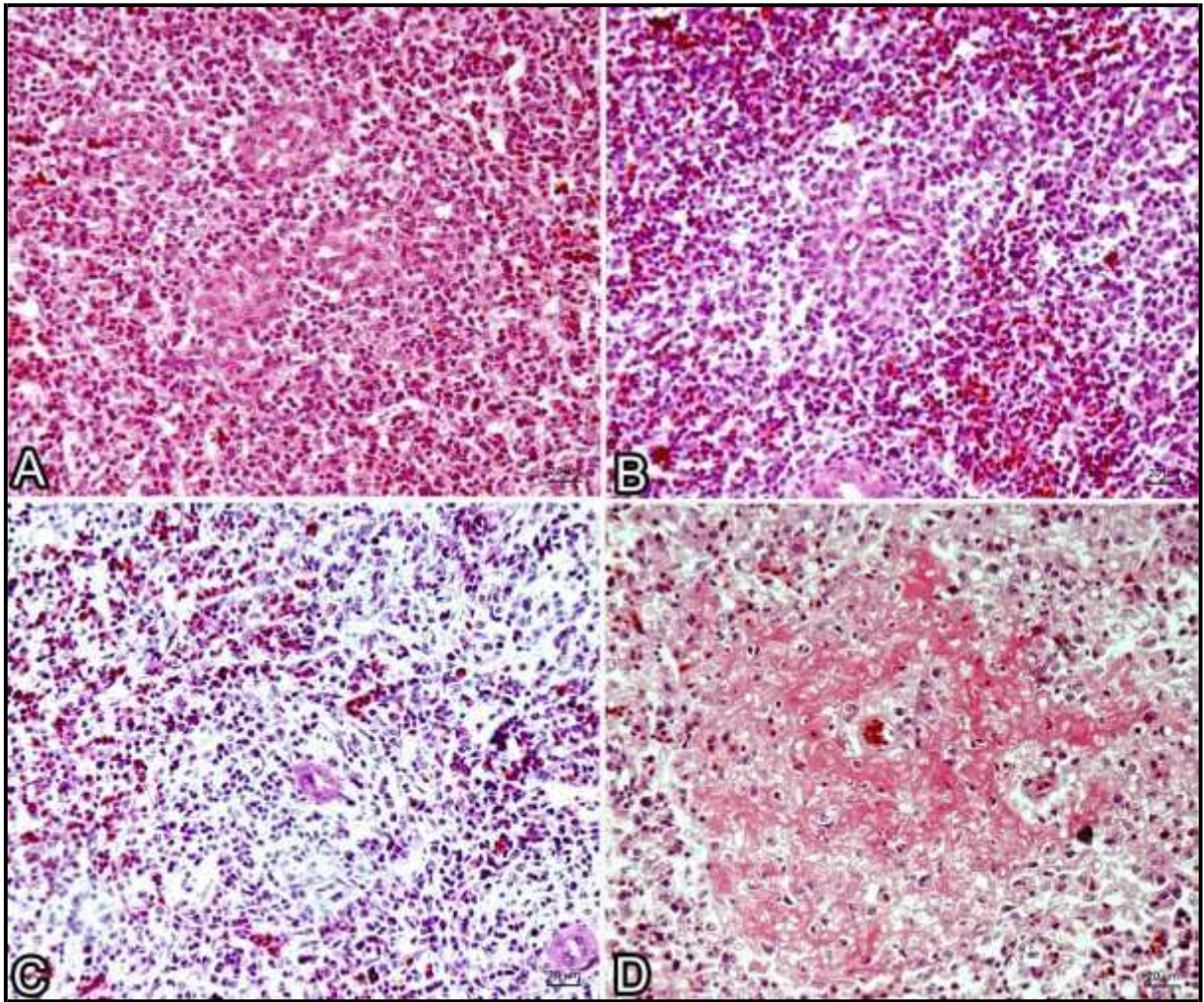


Figura 20. Lesões em baços de *Gallus gallus domesticus* experimentalmente infectados por *Borrelia anserina*. A- Esplenite histiocítica subaguda multifocal discreta (2ºDPI); B- Esplenite heterofílica e histiocítica subaguda multifocal leve com fibrina perivascular (4ºDPI); C- Esplenite necrosante histiocítica subaguda multifocal moderada com vasculite fibrinóide (5ºDPI); D- Esplenite necrosante multifocal a coalescente severa com vasculite fibrinóide e coágulos de fibrina (7ºDPI).

Ao nível macroscópico, as lesões esplênicas vão de encontro aos achados patológicos evidenciados por Shommein e Khogali (1974), que descreveram em seu experimento um aumento exagerado no órgão. Bandopadhyay & Vegad (1983) observaram alterações na superfície do baço na forma de manchas esbranquiçadas, indicando o comprometimento da região cortical do órgão. Estes estudos afirmam que a esplenomegalia ocasionada pelo processo infeccioso é causada pelo processo inflamatório intenso, conduzido por hiperplasia reticular e presença maciça de hemossiderose. Os danos celulares causados pela infecção, a síntese de eritrócitos fica comprometida e a destruição dos eritrócitos se torna maior que a sua produção.

Lesões hemorrágicas são encontradas na superfície do órgão e podem ser visualizadas áreas extensas de infarto anêmico, desenvolvidas por embolias capilares, que se estabelecem devido ao grande acúmulo de espiroquetas presentes durante o pico de parasitemia da doença (BOERO, 1967).

O órgão revelou uma considerável diminuição do tecido linfóide, apresentando uma esplenite com áreas de necrose variando de leve a coalescente severa, além da presença de vasculite e depósitos de fibrina na região medular do órgão. Estes achados patológicos corroboram com os resultados apresentados por Shommein e Khogali (1974), onde relataram a presença de um tecido apresentando um infiltrado inflamatório eosinofílico e um alargamento das artérias, caracterizando um quadro de esplenomegalia.

Segundo o Bandopadhyay & Vegad (1983), uma hiperplasia reticular foi a causa da esplenomegalia, sendo àquela necessária para o organismo tentar combater a infecção. A histopatologia descrita por estes autores revelou um intenso processo de eritofagocitose em consequência da destruição das hemácias e produção de hemossiderina. Neste experimento foram encontrados muitos heterófilos degenerados no tecido esplênico e presença de pigmentos de cor castanha no interior de macrófagos tumefeitos (siderófagos). Áreas de necrose foram relatadas por Nasri et al (2010) associadas com aumento dos capilares, o que também foi descrito neste estudo.

4.3.3. Avaliação renal e adrenais

Os rins encontravam-se no momento da necropsia, com aspecto de congestão e aumentados 2/3 do seu tamanho normal, ocupando parte considerável da região dorsal da ave (Figura 21). À palpação, fragmentos de rins estavam friáveis, com superfícies irregulares e lóbulos edemaciados em relação a fragmentos saudáveis (Figura 22). Duas aves no 5ºDPI, uma no 6ºDPI e uma no 15ºDPI não apresentaram lesões e/ou alterações teciduais na microscopia. Apenas duas aves tiveram alterações nas adrenais, uma na fase aguda e outra na fase crônica da doença.



Figura 21. Cavidade celômica mostrando o aumento no tamanho dos rins devido à infecção por *Borrelia anserina*, evidenciando a congestão dos órgãos. Arquivo pessoal.

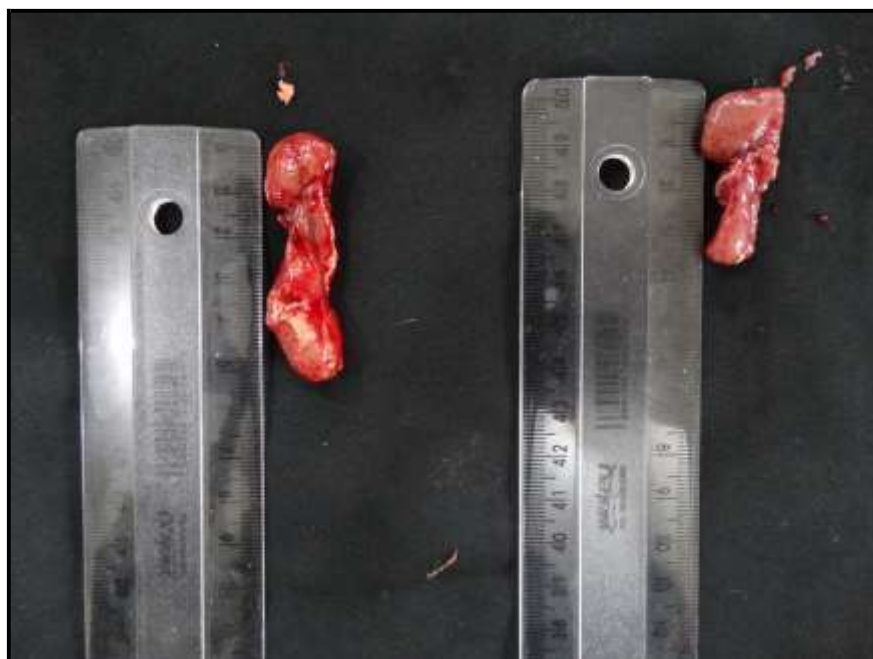


Figura 22. Comparação de um fragmento de rim alterado pela infecção por *Borrelia anserina*, apresentando áreas hemorrágicas e aumentado de tamanho (à esquerda) em relação ao fragmento de rim obtido de uma ave saudável. Arquivo pessoal.

FASE SUPERAGUDA

2ºDPI: Infiltrado de linfócitos e macrófagos multifocal leve (**DM: Nefrite linfohistiocítica subaguda multifocal leve**); Infiltrado intersticial multifocal com grande quantidade de linfócitos e moderada quantidade de macrófagos (**DM: Nefrite linfohistiocítica subaguda multifocal moderada**).

3ºDPI: Infiltrado de linfócitos multifocal moderado. (**DM: Nefrite linfocítica subaguda multifocal moderada**); Infiltrado intersticial de macrófagos multifocal moderado. (**DM: Nefrite histiocítica subaguda intersticial multifocal moderada**)

4ºDPI: Infiltrado de linfócitos e macrófagos em menor quantidade no interstício renal. (**DM: Nefrite linfohistiocítica subaguda multifocal intersticial discreta**); Infiltrado de linfócitos e macrófagos em menor quantidade no interstício renal. (**DM: Nefrite linfohistiocítica subaguda multifocal intersticial discreta**).

FASE AGUDA

6ºDPI: Ducto coletor com infiltrado de macrófagos em grande quantidade e pouca quantidade de linfócitos periductal multifocal moderado (**DM: Nefrite histiocítica subaguda multifocal moderada**).

7ºDPI: Infiltrado de macrófagos e linfócitos multifocal moderado associado à hemorragia (**DM: Nefrite linfohistiocítica subaguda multifocal moderada associada à hemorragia**); Infiltrado de macrófagos e linfócitos multifocal moderado associado à hemorragia (**DM: Nefrite linfohistiocítica subaguda multifocal moderada associada à hemorragia**).

8ºDPI: Infiltrado intersticial de macrófagos e linfócitos multifocal a coalescente moderado (**DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, intersticial multifocal a coalescente moderada**); Há um infiltrado focal discreto composto por macrófagos em grande quantidade e heterófilos em menor quantidade (**DM: Nefrite histiocítica, subaguda, intersticial focal discreta**).

9ºDPI: Infiltrados multifocais discretos de linfócitos e macrófagos no interstício renal e ureter. (**DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, multifocal moderada**); Infiltrado linfohistiocítico intersticial focal leve (**DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, focal leve**).

10ºDPI: Infiltrado linfohistiocítico multifocal intersticial moderado. (**DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, multifocal moderado**); Infiltrado intersticial multifocal de linfócitos moderado. (**DM: Nefrite linfocítica, subaguda, intersticial multifocal moderada**); Hipertrofia de células medulares da Adrenal

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Infiltrados linfohistiocíticos multifocais leves com cilindros proteicos intratubulares. **(DM: nefrite linfohistiocítica, subaguda, intersticial multifocal leve).**

21ºDPI: Infiltrados intersticiais multifocais de linfócitos e macrófagos leve. **(DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, intersticial multifocal leve);** Infiltrados intersticiais multifocais de linfócitos e macrófagos leve. **(DM: nefrite linfohistiocítica, subaguda, multifocal leve);** Adrenal: hipertrofia das células medulares e infiltrado focal de linfócitos leve. **(DM: adrenalite linfocítica focal leve e hipertrofia de células da medular)**

31ºDPI: Infiltrado de linfócitos e macrófagos intersticial e periureteral multifocal leve. **(DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, intersticial e periureteral multifocal leve);** Infiltrado de linfócitos e macrófagos intersticial multifocal severo. Há coágulos eosinofílicos no interior de túbulos (cilindros de proteína). **(DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, multifocal severa com cilíndricos proteicos).**

44ºDPI: Infiltrado intersticial multifocal leve de linfócitos e macrófagos. **(DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, multifocal leve);** Infiltrado de moderada quantidade de linfócitos e pequena quantidade de macrófagos peritubular multifocal leve. **(DM: Nefrite linfohistiocítica, subaguda, intersticial multifocal leve).**

Conforme Boero (1967), à necropsia o rim de uma ave infectada por *B.anserina* apresenta-se congesto, com bordas e lóbulos irregulares, altamente hiperêmico e aumentado de tamanho. Shommein e Khogali (1974) descreveram as mesmas alterações renais encontradas neste estudo, como aumento e friabilidade dos órgãos, além de uma intensa hemorragia subcapsular renal. Histopatologicamente, o tecido renal foi evidenciado um quadro de nefrite linfohistiocítica perivascular multifocal de leve a moderada. As veias intralobulares estavam alteradas, devido à congestão e a dilatação dos vasos adjacentes, além de alguns trombos de fibrina.

Este quadro de nefrite e alteração glomerular também foram relatados por Srinivasan e Rao (1966) ao visualizarem os cortes histológicos alterados pela enfermidade. Outros autores, como Cooper e Bickford (1993) observaram um intenso infiltrado inflamatório multifocal e uma fibroplasia intersticial nos rins.

4.3.4. Avaliação cardíaca

FASE SUPERAGUDA

Macroscopicamente, não houve alterações significativas na morfologia, aspecto e coloração dos órgãos. Na microscopia foram evidenciadas alterações em algumas aves, sendo a maioria apresentando intenso infiltrado inflamatório e conforme o avanço da infecção, um quadro de epicardite ou miocardite de moderado a severo.

2ºDPI: Infiltrado focalmente extenso moderado de linfócitos e macrófagos no epicárdio. **(DM: epicardite linfohistiocítica subaguda focalmente extensa e moderada);** Infiltrado focalmente extenso moderado de linfócitos e macrófagos no epicárdio. **(DM: epicardite linfohistiocítica subaguda focalmente extensa e moderada).**

4ºDPI: Infiltrado de macrófagos e linfócitos focal discreto. **(DM: miocardite linfohistiocítica subaguda focal discreta).**

FASE AGUDA

5ºDPI: Subendocárdio espessado por infiltrado de grande quantidade de macrófagos, moderada quantidade de linfócitos e poucos plasmócitos. Área subendocárdica focal com substituição de miocárdio fibrócitos por fibroblastos. Infiltrado de macrófagos entre as fibras multifocais leves **(DM: endocardite linfohistiocítica subaguda focalmente extensa severa com fibroplasia e miocardite histiocítica multifocal leve);** Infiltrado de linfócitos e macrófagos focal no miocárdio. Infiltrado focalmente extenso de linfócitos no epicárdio com raros macrófagos **(DM: Miocardite linfohistiocítica focal discreta).**

7ºDPI: Miocárdio: infiltrado de macrófagos entre as fibras multifocal moderado. Gordura epicárdica com infiltrado de macrófagos e linfócitos multifocal moderado. Há área focal de fibrose no miocárdio associada a infiltrado de macrófagos. (Figura 23); Esteatite epicárdica linfohistiocítica multifocal moderada); Infiltrado de linfócitos e plasmócitos focalmente extensos discretos no tecido adiposo epicardial. Infiltrados de macrófagos multifocais discretos no miocárdio. **(DM: epicardite e miocardite linfohistiocíticas subagudas multifocais severas).**

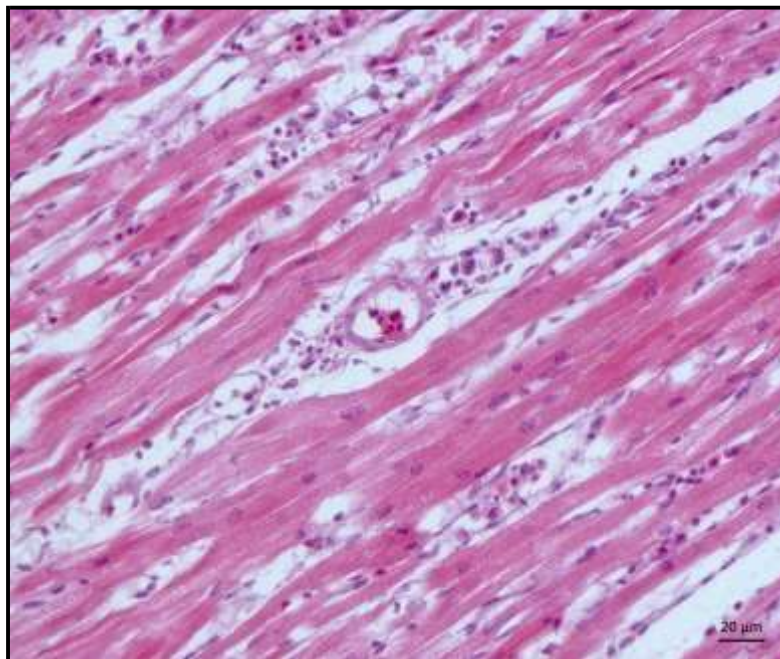


Figura 23. Miocardite histiocítica subaguda multifocal moderada com área focal de fibrose (Obj.40x).

8ºDPI: Áreas focalmente extensa de infiltrado composto majoritariamente por macrófagos e plasmócitos em menor quantidade leve. **(DM: epicardite linfoplasmocítica, subaguda, focalmente extensa leve);**

9ºDPI: Infiltrados multifocais de linfócitos em grande quantidade e macrófagos em menor quantidade no epicárdio e miocárdio severo. **(DM: Miocardite e epicardite linfohistiocítica multifocal severa).**

10ºDPI: Miocárdio, endocárdio e epicárdio com infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos e heterófilos, difuso severo, com espaçamento entre fibras (edemas). **(DM: miocardite, epicardite e endocardite linfohistiocítica subaguda difusa severa);** Epicárdio: infiltrado linfohistiocítico e heterofílico focalmente extenso severo (Figura 24).

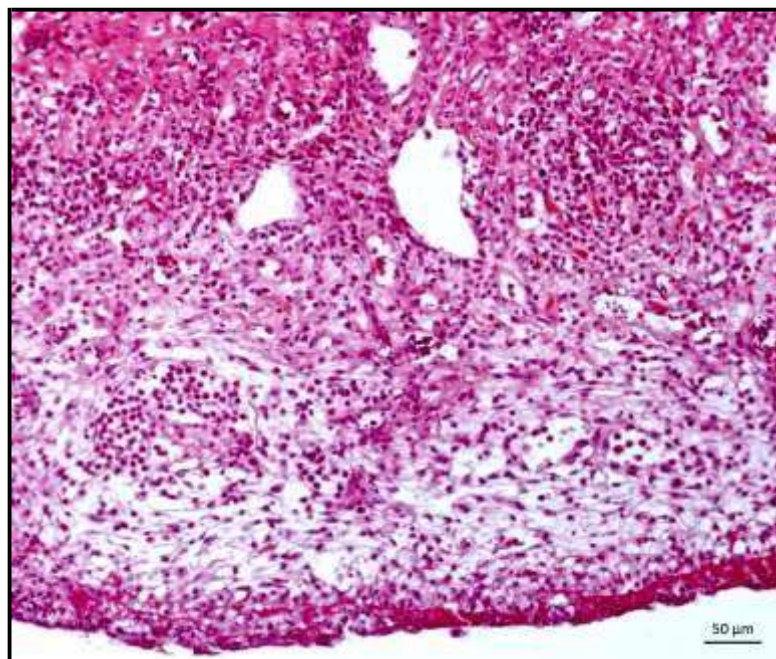


Figura 24. Epicardite heterofílica e linfohistiocítica, subaguda, focalmente extensa severa (Obj. 20x).

FASE SUBAGUDA

31ºDPI: Infiltrado multifocal moderado de macrófagos no miocárdio associados a estrias eosinofílicas (fibrina) (**DM: miocardite histiocítica, subaguda, multifocal moderada com fibrina**); Infiltrado de linfócitos e histiócitos/macrófagos focal leve. Há áreas multifocais leves de fibrose. (**DM: miocardite linfohistiocítica, subaguda, focal leve e fibrose multifocal leve**).

44ºDPI: Infiltrado de linfócitos e macrófagos focal leve no epicárdio. Infiltrado de heterófilos, linfócitos e macrófagos no miocárdio, multifocal leve. (**DM: epicardite linfohistiocítica, subaguda, focal leve e miocardite linfohistiocítica multifocal leve**).

4.3.5. Avaliação do Sistema Nervoso Central

Macroscopicamente não houve alterações na consistência, morfologia ou coloração dos cérebros examinados. Apenas algumas aves apresentaram lesões e/ou alterações cerebrais e apenas uma revelou alteração no cerebelo no 4º DPI.

FASE SUPERAGUDA

2ºDPI: Infiltrado de linfócitos multifocal discreto. (**DM: encefalite linfocítica subaguda multifocal discreto**)

4ºDPI: Infiltrado de linfócitos multifocal discreto. (**DM: encefalite linfocítica subaguda multifocal discreto**)

FASE AGUDA

6ºDPI: Plexo coróide: infiltrado de linfócitos focal discreto. (**DM: plexo coroidite linfocítica subaguda focal discreta**)

7ºDPI: Plexo coróide: infiltrado de linfócitos multifocal moderado. (**DM: plexo coroidite linfocítica subaguda multifocal moderada**).

8ºDPI: Plexo coróide: infiltrado de linfócitos e macrófagos multifocal leve. (Figura 25).



Figura 25. Plexo coroidite linfohistiocítica subaguda multifocal leve (Obj.20x).

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Infiltrado focal de linfócitos e macrófagos no plexo coroide leve. (DM: plexo coroidite linfohistiocítica, subaguda, focal leve).

A maioria das aves apresentaram durante o curso da infecção um quadro de encefalite leve a moderada até o 15ºDPI e outras uma leve a moderada plexo coroidite. Este processo inflamatório se estabeleceu de forma local e juntamente com a presença e a multiplicação bacteriana contribuiu com o estado de prostração e letargia no período clínico da doença.

Na literatura, trabalhos sobre a patologia da Borreliose aviária sobre o Sistema Nervoso Central de aves susceptíveis à doença ainda são muito escassos. O desenvolvimento de novos estudos sobre a patogenia da doença são necessários para elucidar com mais significância uma possível severidade neurológica.

4.3.6. Avaliação intestinal

Externamente as alças intestinais não se mostraram alteradas devido ao processo infeccioso, porém ao expor as mucosas observou-se uma extensa área hiperêmica (Figura 26), acarretando um quadro de enterite. Apenas três aves desenvolveram algum tipo de alteração, uma no 9ºDPI e duas no 31ºDPI.

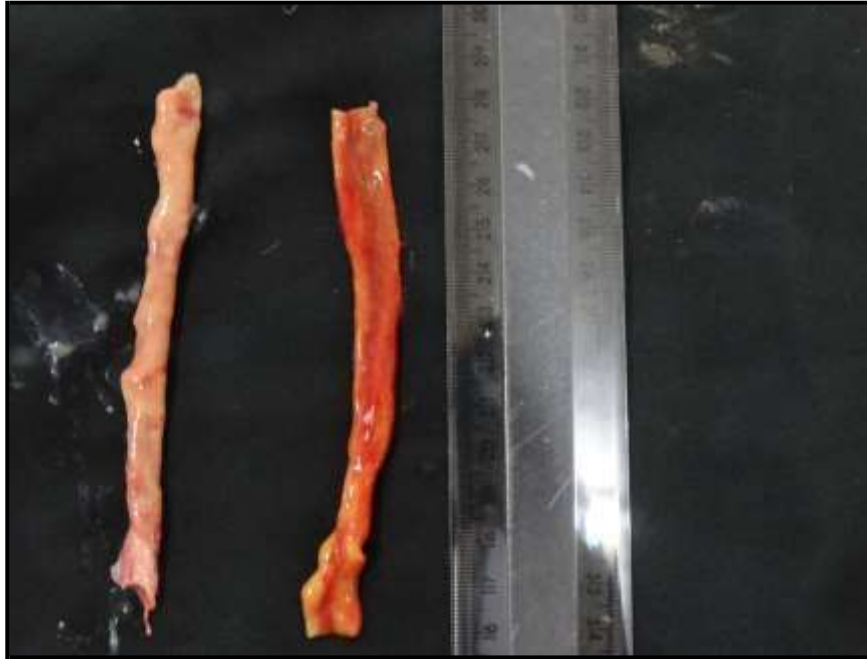


Figura 26. Porção do intestino delgado de ave infectada por *Borrelia anserina* (à direita). Para fins de comparação, uma porção do intestino de uma ave saudável do grupo controle (à esquerda)

FASE AGUDA

9ºDPI: Infiltrado focalmente extenso na serosa de leve quantidade de macrófagos e discreta quantidade de linfócitos e plasmócitos. Há espaçamento entre as fibras musculares lisas longitudinais e circulares (edema).

FASE SUBAGUDA

31ºDPI: Infiltrado difuso de linfócitos e macrófagos na mucosa leve. **(DM: enterite linfohistiocítica, subaguda, difusa leve);** Infiltrado de linfócitos e macrófagos multifocal moderado. **(DM: enterite linfohistiocítica, subaguda, multifocal moderada)**

Em estudos sobre a patogenia da borreliose aviária sobre os intestinos, Srinivasan e Rao (1966) descreveram um epitélio altamente irregular ao nível celular, havendo uma ligeira congestão de vasos na lâmina própria e a presença de intenso infiltrado inflamatório linfocitário. Já Shommein e Khogali (1974) baseado nos estudos do autor citado anteriormente, relatou no intestino delgado a presença de diferentes graus de hemorragia na mucosa.

Bandopadhyay e Vegad (1984) ao infectar galinhas domésticas com uma cepa virulenta de *B.anserina*, descreveu uma enterite aguda, presença de hemossiderose nas vilosidades intestinais e diarreia esverdeada. Sugere-se que as alterações teciduais não tenham relação com a presença das espiroquetas e sim com algum mecanismo imunológico (Bandopadhyay e Vegad, 1983).

Apesar destas alterações encontradas em literaturas anteriores, apenas duas aves apresentaram alterações na mucosa intestinal como uma enterite multifocal moderada e espaçamento entre as fibras musculares lisas.

4.3.7. Avaliação dos pulmões e sacos aéreos

Não foram encontradas alterações ou lesões decorrentes da infecção. Apenas em quatro aves foram encontradas alterações quando da avaliação microscópica do pulmão, todas na fase crônica, e uma ave com alteração de sacos aéreos no 2ºDPI.

FASE SUPERAGUDA

2ºDPI: Sacos aéreos: Infiltrado de linfócitos multifocal moderado (**DM: aerossaculite linfocítica subaguda multifocal moderada**).

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Infiltrados multifocais peri-parabronquiais de linfócitos e macrófagos leve. (**DM: pneumonia linfohistiocítica, subaguda, multifocal leve**).

21ºDPI: Pulmão: infiltrados multifocais parabronquiais de macrófagos, linfócitos e plasmócitos moderado. (**DM: pneumonia linfohistiocítica, subaguda, multifocal moderada**)

31º DPI: Pulmão: infiltrado de linfócitos, heterófilos e macrófagos multifocal peribronquial moderado. Há umas áreas focais com células gigantes multinucleadas, estrias de substância eosinofílicas, macrófagos, linfócitos e células epitelióides (granuloma). (**DM: pneumonia**

granulomatosa, crônica, focal moderada e pneumonia linfohistiocítica e heterofílica, subaguda, multifocal moderada).

44°DPI: Infiltrado de grande quantidade de linfócitos, moderada quantidade de macrófagos e heterófilos multifocal a coalescente moderada. **(DM: pneumonia linfohistiocítica e heterofílica, subaguda, multifocal a coalescente moderada).**

Não há relatos consistentes sobre a atividade da *B. anserina* nas vias aéreas superiores e inferiores das aves enfermas. Neste estudo foi possível descrever nos pulmões analisados histopatologicamente, a presença de infiltrado inflamatório peri e parabrônquial, acarretando em um quadro de pneumonia linfohistiocítica e heterofílica em quatro aves.

Em relação aos sacos aéreos, apesar de uma ave ter sido diagnosticada com aerossaculite no 2°DPI, alterações nesta estrutura decorrentes são possivelmente de um quadro infeccioso do sistema respiratório propriamente dito.

4.3.8. Avaliação pancreática

Algumas aves apresentaram lesões decorrentes da infecção, assim como a superfície de alguns pâncreas estavam um pouco hiperêmicas.

FASE AGUDA

7°DPI: Ductos pancreáticos: áreas multifocais aleatórias periductais ou perivasculares com infiltrado de macrófagos e linfócitos multifocal moderado. **(DM: pancreatite linfohistiocítica, subaguda, periductal ou perivascular multifocal moderada).**

8°DPI: Infiltrado linfohistiocítico multifocal moderado. (DM: pancreatite linfohistiocítica, subaguda, multifocal moderada); Ducto pancreático: há área focal periductal discreta composta majoritariamente por linfócitos em grande quantidade e heterófilos em pouca quantidade **(DM: pancreatite linfocítica, subaguda, ductal focal discreta).**

9°DPI: Infiltrado periductal de linfócitos e macrófagos multifocal a coalescente moderado **(DM: Pancreatite linfohistiocítica subaguda multifocal a coalescente moderada);**

Infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos periductal e intersticial multifocal moderada (**DM: Pancreatite linfohistiocítica, subaguda, multifocal moderada**).

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Infiltrados multifocais de linfócitos e macrófagos leves (**DM: pancreatite linfohistiocítica, subaguda, multifocal leve**).

21ºDPI: Infiltrados multifocais de linfócitos e macrófagos leves (**DM: pancreatite linfohistiocítica, subaguda, multifocal leve**); Infiltrados multifocais leves de linfócitos e macrófagos. (**DM: pancreatite multifocal linfohistiocítica leve**).

31ºDPI: Infiltrados multifocais de linfócitos e macrófagos leves. (**DM: pancreatite linfohistiocítica, subaguda, multifocal leve**).

As aves apresentaram uma pancreatite periductal ou perivascular leve a moderada com a presença de infiltrados inflamatórios. McNeil et al (1948) descreveram o pâncreas de galinhas infectadas dentro da normalidade, com apenas a presença na microscopia de uma ligeira vacuolização de células secretoras.

4.3.9. Avaliação da medula óssea

Dentre todas as aves infectadas por *B. anserina* no experimento, apenas nove animais não desenvolveram lesões e/ou alterações na medula óssea, todos os outros animais sofreram rarefações ósseas, que se agravaram durante o avanço da infecção.

FASE SUPERAGUDA

2ºDPI: Rarefação linfocítica difusa; Rarefação linfocítica difusa.

3ºDPI: Rarefação linfocítica difusa moderada;

4ºDPI: Rarefação difusa moderada; Rarefação difusa moderada.

FASE AGUDA

5ºDPI: Rarefação difusa moderada; Rarefação difusa moderada.

6ºDPI: Rarefação difusa moderada.

7ºDPI: Hiper celularidade multifocal moderada

9ºDPI: Rarefação difusa leve.

10ºDPI: Rarefação linfoide difusa leve.

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Rarefação linfocítica difusa moderada; Áreas de rarefação linfocítica difusa leve.

21ºDPI: Rarefação linfocítica difusa leve

31ºDPI: Rarefação linfocítica difusa severa; Rarefação linfoide difusa acentuada

44ºDPI: Rarefação difusa leve

Existem poucos relatos sobre possíveis alterações teciduais da infecção por *B.anserina* na medula óssea vermelha. Alguns trabalhos citam apenas a permanência das espiroquetas no estroma, onde se pode verificar a presença de células, fibras reticulares, macrófagos e adipócitos.

Algumas aves apresentaram um processo de rarefação linfocítica progressiva da medula óssea e uma hiper celularidade multifocal moderada. Como o sistema imune das aves e seu funcionamento normal dependem da presença de células derivadas da medula óssea (SCOTT, 2004), sugere-se que o processo infeccioso agudo tenha reduzido à capacidade de síntese de novas células linfoídes.

4.3.10. Avaliação da Bursa de Fabricius

No momento da necropsia, não foi constatada nenhuma alteração na superfície dos órgãos. Após sua retirada da carcaça, foi feito um corte longitudinal, sendo exposta sua

mucosa. Algumas bursas apresentavam mucosa consideravelmente hiperêmica. Do 6ºDPI em diante, foram encontradas alterações de moderada a severa nas Bursas de Fabricius das aves infectadas. No 31ºDPI, ocorreu o início do repovoamento dos linfócitos nos folículos da Bursa.

FASE AGUDA

6ºDPI: Infiltrado de macrófagos centrofolicular multifocal leve (DM: bursite histiocítica centrofolicular multifocal leve).

7ºDPI: Necrose centrofolicular com infiltrado de macrófagos, linfócitos e heterófilos e estrias eosinofílicas (fibrina). (Figuras 27 e 28); Áreas de necrose folicular multifocais a coalescentes severa associada a infiltrados de macrófagos e depósitos de fibrina (**DM: bursite histiocítica, subaguda, necrosante, multifocal a coalescente severa**).

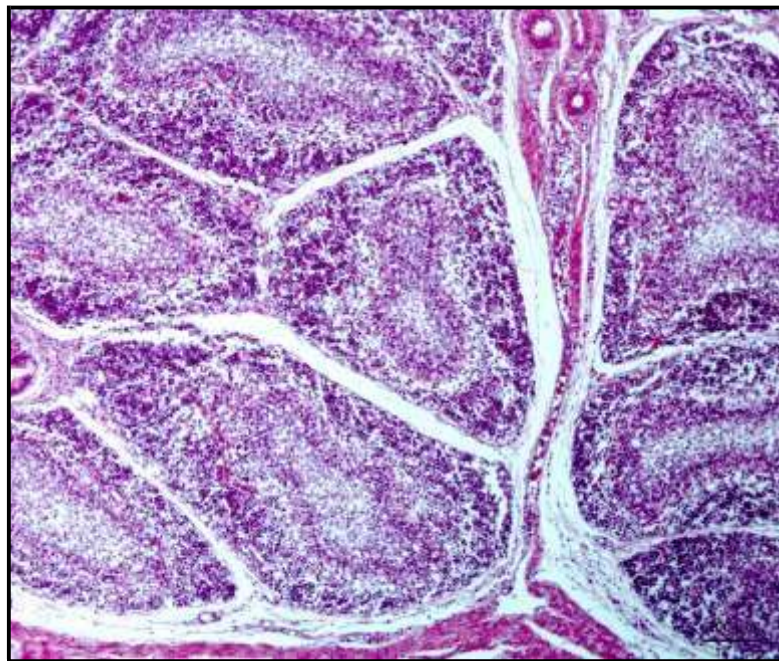


Figura 27. Bursite histiocítica subaguda, necrosante, multifocal moderada (Obj.10x).

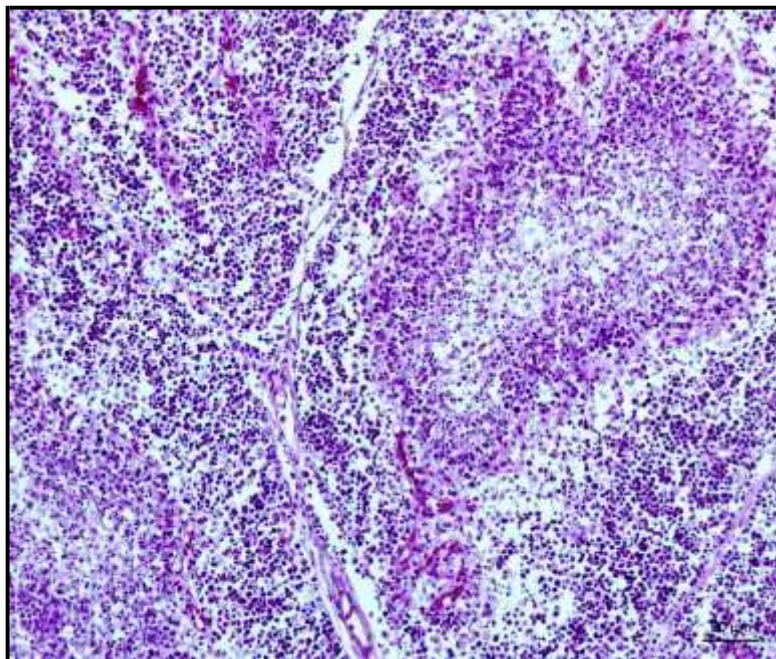


Figura 28. Bursite histiocítica subaguda, necrosante, multifocal moderada (Obj 20x).

8ºDPI: Áreas multifocais de necrose folicular moderadas associadas a infiltrados compostos majoritariamente por macrófagos e escassos heterófilos. **(DM: bursite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada).**

9ºDPI: Áreas de necrose centro folicular multifocal severa com infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos nas áreas de necrose. **(DM: bursite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal severa).**

10ºDPI: Necrose centrofolicular multifocal severa com infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. **(DM: bursite linfocitocítica, subaguda, necrosante multifocal severa);** Diminuição de volume de folículos com o centro folicular substituído por grande quantidade de macrófagos. **(DM: bursite histiocítica crônica multifocal moderada).**

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Necrose centrofolicular multifocal moderada associada com infiltrados moderados de linfócitos e leve infiltrado de macrófagos com estrias eosinofílicas (fibrina). **(DM: bursite linfocitocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada);** Áreas de necrose centrofolicular multifocais moderadas associadas a infiltrados de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. **(DM: bursite linfocitocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada).**

21ºDPI: Áreas de necrose centrofolicular multifocais moderadas associadas a macrófagos **(DM: bursite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada)**; Áreas multifocais de necrose centrofolicular multifocal, associadas a infiltrados de macrófagos. **(DM: bursite histiocítica, subaguda, necrosante, multifocal moderada).**

31ºDPI: Áreas de necrose centrofolicular multifocais discretas associadas a macrófagos. **(DM: bursite necrosante multifocal discreta).**

44ºDPI: Rarefação centrofolicular leve.

A literatura descreve na macroscopia uma Bursa de Fabricius aumentada de tamanho e com áreas de hemorragia em sua mucosa (BOUZOUBAA et al, 1991). Esta hiperemia de mucosas também foi evidenciada em algumas bursas neste estudo durante a necropsia, além disto, áreas de necrose folicular foram encontradas durante a fase aguda da doença, contribuindo com novas informações sobre a infecção por *B.anserina* no órgão e mostrando o dano causado no seu tecido linfóide primário.

4.3.11. Avaliação do Ovário e Oviduto

Macroscopicamente os ovários e ovidutos não evidenciaram alterações ou lesões, porém a nível histológico, foram encontradas diversas alterações que foram marcadas e evidenciadas, principalmente nos ovários. Estas alterações foram observadas a partir do 7ºDPI, ou seja, quando o ovário estava desenvolvido suficientemente para a reprodução da ave e para o exame histopatológico.

FASE AGUDA

7ºDPI: Infiltrado de grande quantidade de macrófagos e pequena quantidade de linfócitos, plasmócitos e heterofilos **(DM: ooforite histiocítica subaguda multifocal moderada).**

8ºDPI: Folículos com áreas multifocais de necrose, circundados por infiltrados de macrófagos. (Figuras 29 e 30); Folículos com áreas focais de necrose circundada por infiltrados de macrófagos. **(DM: ooforite histiocítica, subaguda, necrosante focal discreta).**

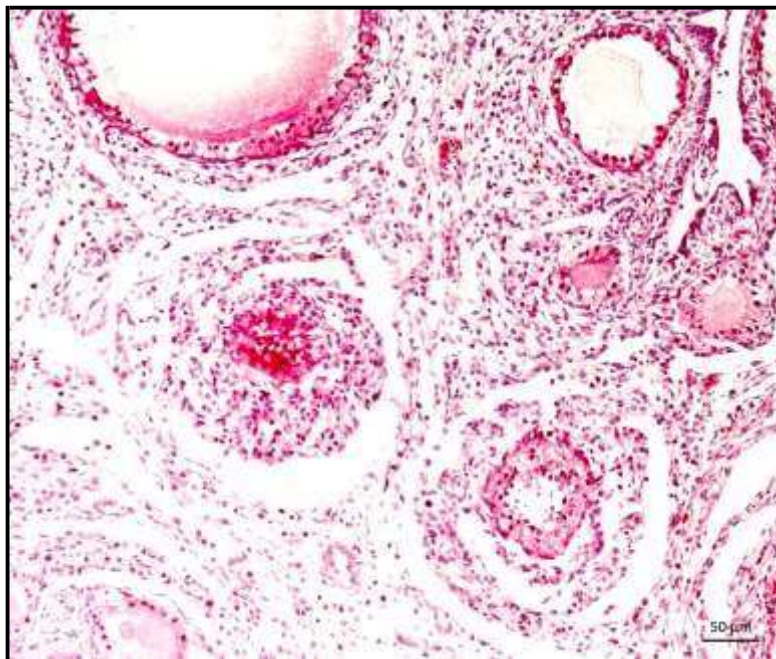


Figura 29. Ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada (Obj.20x).

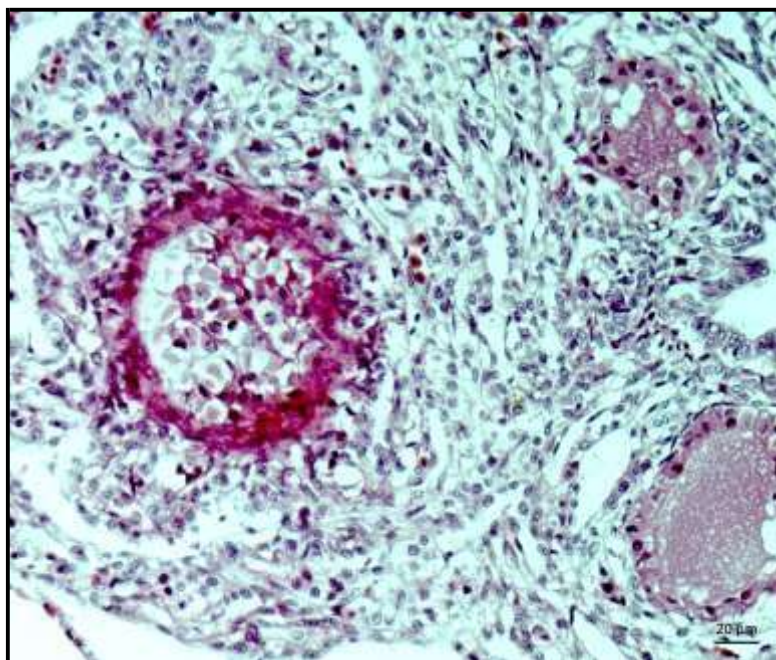


Figura 30. Ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada (Obj.40x).

9ºDPI: Áreas de necrose em folículos associado a infiltrado moderado de linfócitos e macrófagos. (**DM: ooforite necrosante subaguda multifocal moderada**); Necrose de folículos multifocal moderada associada a infiltrado de moderada quantidade de linfócitos e

macrófagos perifoliculares. **(DM: ooforite linfohistiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada).**

10ºDPI: Necrose folicular multifocal discreta com infiltrado linfohistiocítico. **(DM: ooforite linfohistiocítica, subaguda, necrosante multifocal leve);** Necrose de folículos multifocal moderada associada a infiltrado de macrófagos perifolicular. **(DM: ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada).**

FASE SUBAGUDA

15ºDPI: Necrose folicular multifocal moderada associada a infiltrados perifoliculares de macrófagos. **(DM: ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada);** Áreas de necrose foliculares multifocais leve associada a infiltrados perivasculares de macrófagos. **(DM: ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal leve).**

21ºDPI: Áreas de necrose folicular multifocais leve associadas a infiltrados multifocais leve de macrófagos. **(DM: ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal leve)**

31ºDPI: Áreas de necrose folicular multifocais moderada associadas a infiltrados de macrófagos. **(DM: ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada);** Necrose folicular multifocal moderada e infiltrado de macrófagos perifoliculares **(DM: ooforite histiocítica, subaguda, necrosante multifocal moderada)**

44ºDPI: Necrose de folículos multifocal leve, infiltrado de grande quantidade de heterófilos multifocal a coalescente com leve a moderada quantidade de macrófagos e linfócitos. **(DM: ooforite heterofílica, aguda, necrosante multifocal moderada);** Necrose folicular multifocal. Há infiltrado de moderada quantidade de macrófagos, heterófilos e linfócitos. **(DM: ooforite linfohistiocítica e heterofílica, subaguda, necrosante multifocal moderada)**

Estudando a patologia da doença na esfera reprodutiva de fêmeas, Shommein e Khogali (1974) observaram certa dissimilaridade morfológica nos ovários das galinhas infectadas e também uma diminuição no número de folículos ovarianos. À necropsia, os ovários avaliados neste estudo não evidenciariam essas alterações descritas por estes autores. Já ao nível histopatológico, o tecido ovariano revelou a presença de um intenso infiltrado inflamatório, acarretando em uma ooforite com áreas de necrose.

4.4. Impregnação pela prata

A impregnação pela prata através do método de Whartin Starry evidenciou a presença de microrganismos compatíveis com a *B. anserina* em praticamente todos os cortes histológicos em experimentação. Foi observada a presença das espiroquetas no fígado, baço, cérebro, coração, rins, medula óssea e ovário das aves infectadas, principalmente na fase aguda da doença, onde o crescimento e a multiplicação bacteriana ocorreram de forma mais intensa.

No tecido hepático foi possível através desta impregnação, mostrar a presença da *B. anserina* em grande número, entre as células e/ou sendo fagocitadas por macrófagos, assim como a presença da mesma no interior de vasos (Figura 31 A e 31 B).

Foi possível observar a presença das espiroquetas marcadas pela prata no fígado, baço, rins e coração das aves, a partir do 5ºDPI. Nos dois dias seguintes (6ºDPI e 7ºDPI), a visualização foi facilitada pela inúmera quantidade de espiroquetas. No 8ºDPI, foi possível visualizar um intenso depósito de espiroquetas em todos os órgãos analisados, inclusive no ovário, mais precisamente no interior do ovócito localizado centralmente ao folículo ovariano (Figura 31 C). No interior da medula óssea foi detectada a presença das espiroquetas em meio ao tecido esponjoso (Figura 31 D).

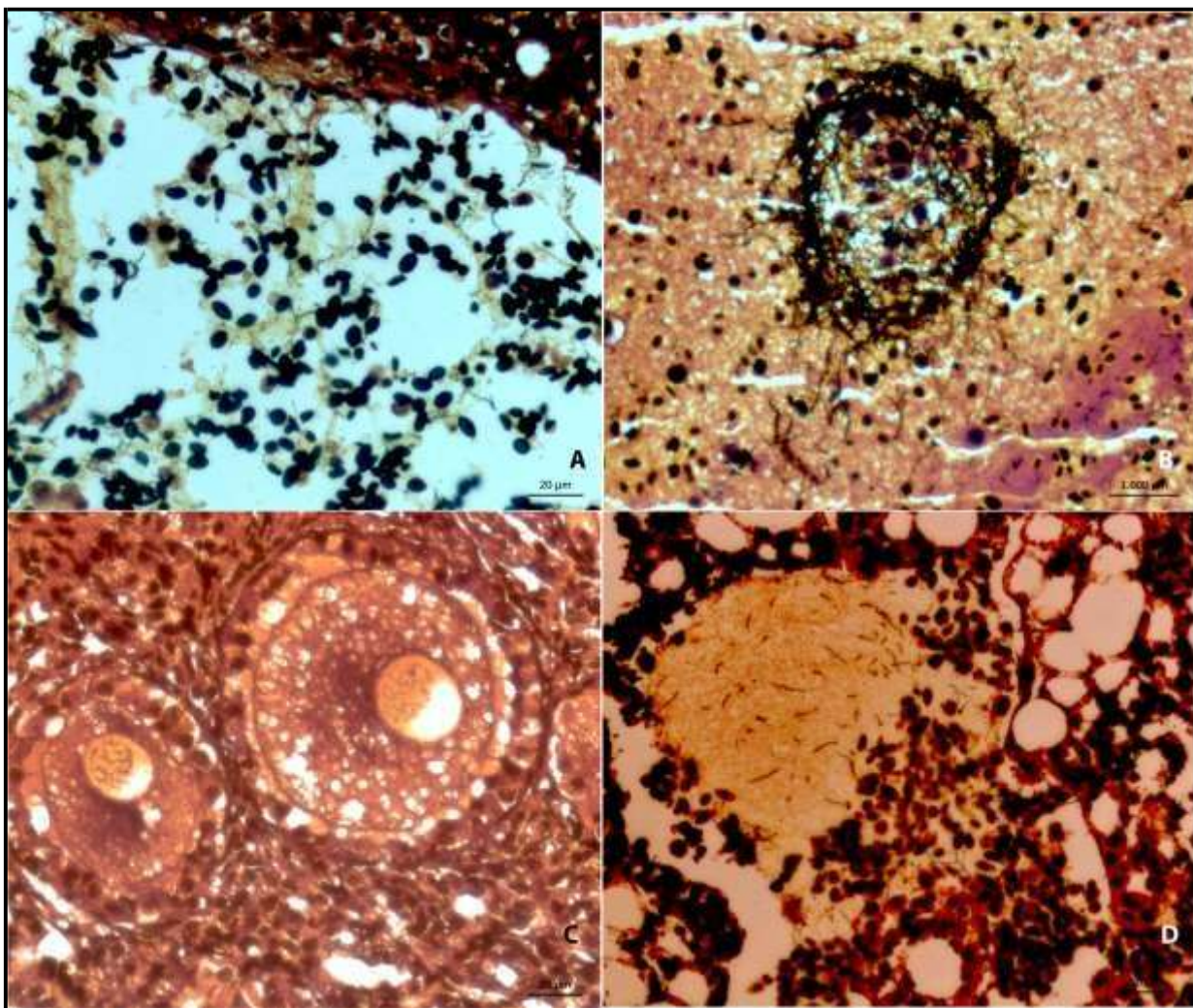


Figura 31. Registro fotográfico dos diferentes tecidos das aves infectadas por *Borrelia anserina*, impregnados pela prata, por meio da técnica de Whartin-Starry. **A**- Fígado: espiroquetas no interior de um vaso (Obj.100x); **B** - Fígado: aglomerado de espiroquetas no interior de um vaso (Obj.100x); **C** - Ovário: presença de inúmeras espiroquetas em ovócito no interior de folículo ovariano (Obj.100x); **D** – Medula óssea: em meio ao estroma (Obj. 100x).

O método de impregnação pela prata realizado através da técnica de Wharthin-Starry é muito utilizada em âmbito laboratorial e permite a marcação e a visualização simultânea de bactérias, lesões gástricas provocadas por *H. pylori* e em outras patologias do sistema gastrintestinal (ZIMAITY et al., 1999).

De acordo com Kiernan (2002), este método de impregnação confirma a presença das espiroquetas e largamente utilizados para o diagnóstico de Leptospirose, Borrelioses e Sífilis em humanos. As espiroquetas são marcadas em negro distinguindo-se de outros microrganismos.

Garvey (1996) descreveu a utilização da impregnação pela prata no auxílio do diagnóstico de Doença de Lyme na América do Norte, observando a presença das espiroquetas em fragmentos retirados de pele das lesões características da doença.

As espiroquetas praticamente não se coram por corantes rotineiramente empregados. Quando coradas pela prata, podem ser visualizadas na cor marrom-escuro ou negra contracorada com um fundo castanho-amarelado.

Neste experimento, foi possível observar a presença de espiroquetas na fase aguda da doença em todos os tecidos avaliados. É importante ressaltar a presença das espiroquetas de forma maciça na medula óssea e principalmente no interior dos folículos ovarianos. Estes resultados são essenciais para contribuir com a literatura atual sobre a Borreliose Aviária, já que auxiliam no conhecimento sobre estudos futuros sobre a patogenia da doença que ainda não foram totalmente elucidados.

4.5. Imuno-histoquímica

Todas as amostras de tecido renal oriundas das aves infectadas no pico de parasitemia, ou seja, no 8ºDPI, foram testadas com o anticorpo primário policlonal anti-*B. burgorferi*, ocorrendo acentuada imunomarcção. Esta marcação foi compatível com a morfologia de *B. anserina* e ocorreu principalmente no interior de vasos e macrófagos, podendo ser possível visualizar os restos celulares bacterianos decorrentes do processo de fagocitose (Figura 32).

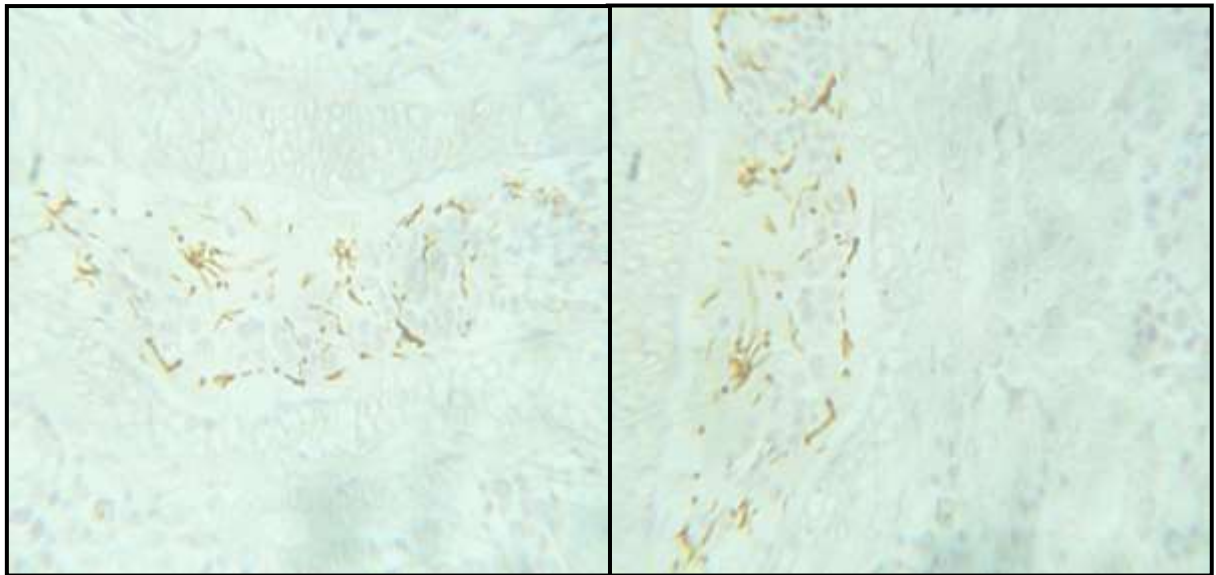


Figura 32. Corte histológico renal de ave infectada por *Borrelia anserina*, no pico de parasitemia, com imunomarcção no interior de um vaso. Observa-se a presença de estruturas morfológicamente compatíveis com *Borrelia anserina* e restos celulares bacterianos no interior de macrófagos. Anticorpo primário policlonal anti-*Borrelia burgdorferi*. Complexo avidina-biotina-peroxidase/DAB.

Em estudos anteriores e na literatura recente não constam muitas informações e relatos sobre a utilização da técnica de imuno-histoquímica no auxílio do diagnóstico da Borreliose aviária. Embora, alguns autores tenham citado a importância da técnica no estudo da interação antígeno-anticorpo que ocorre nos tecidos acometidos pela enfermidade.

Em uma pesquisa envolvendo pacientes humanos, Einsendle et al (2008), utilizou a técnica de imuno-histoquímica para avaliar as evidências da infecção por *B. burgdorferi* em lesões esclerosas tegumentares. A técnica revelou inúmeros microrganismos compatíveis morfológicamente como do gênero *Borrelia* nos tecidos analisados.

A *B. anserina* também pode ser detectada diretamente em tecidos de aves infectadas por meio de técnicas de imuno-histoquímica (HANDBERG et al., 1999). A imuno-histoquímica, uma ferramenta útil para o diagnóstico da infecção por *B. anserina*, também possibilita estudos sobre a patogênese da doença. Através da técnica de imuno-histoquímica é possível investigar o tropismo tecidual, a relação entre as lesões histopatológicas e a presença ou quantidade de espiroquetas no tecido e acompanhar a migração da bactéria durante a infecção (MONEIM et al., 2009; BENYEDA et al., 2010).

Para que o diagnóstico da Borreliose aviária seja eficaz, é necessário associar os dados do quadro clínico, das lesões anatomopatológicas e da histopatologia com a identificação do

agente etiológico. A utilização da imuno-histoquímica permite verificar se o agente etiológico está presente nas lesões, sendo considerado um teste fundamental no diagnóstico post-mortem (NUNOYA et al., 1995; NUNOYA et al., 1997; YILMAZ et al., 2011)..

5. CONCLUSÃO

1. As aves infectadas experimentalmente por *B. anserina* desenvolveram sintomatologia clínica característica da doença e semelhante ao relatado na literatura. Os principais sinais clínicos foram mucosas hipocoradas (principalmente de crista e barbela), penas arrepiadas, prostração, fezes diarreicas e esverdeadas, estado de torpor e inapetência.
2. Este estudo permitiu a descrição detalhada do curso da infecção por *B. anserina* em aves domésticas, evidenciando as suas fases clínicas características (superaguda, aguda e subaguda) e as alterações patológicas ocorridas em cada fase.
3. A interação de técnicas como a semiologia clínica, biologia molecular e histopatologia no estudo da infecção, retratou mais fielmente o estado de saúde das aves e contribuiu para um tratamento mais adequado da enfermidade.
4. A reação *nested*-PCR mostrou-se eficiente e sensível para a detecção do DNA de *B. anserina*.
5. A infecção por *B. anserina* provocou alterações macro e microscópicas de leves a severas nos órgãos estudados, principalmente no fígado, rins e baço, além da presença das espiroquetas em todos os tecidos avaliados na fase aguda da doença. Essas informações confirmam o seu caráter septicêmico.
6. A padronização da técnica de imuno-histoquímica permitiu a visualização das espiroquetas no tecido acometido, revelando a interação antígeno-anticorpo e tornando-se mais uma ferramenta no apoio ao diagnóstico.
7. O experimento evidenciou, na fase aguda, a presença de inúmeras espiroquetas no interior dos folículos ovarianos, sugerindo um possível acometimento da capacidade

reprodutiva da ave e/ou prejuízos à qualidade do ovo, comprometendo a produção animal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPEL, M.J.G.; ALLAN S.; JACOBSON R.H.; LAUDERDALE T.L.; CHANG Y.F.; SHIN S.J.; THOMFORD J.W.; TODHUNTER R.J.; SUMMERS B.A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. **Journal of Infect Diseases**. 167:651-664, 1993.

ARAGÃO, H.B. Soroterapia e vacinação na espiroquetoze das galinhas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 3, 3-39, 1911.

ASLAM, B.; HUSSAIN, I.; MAHMOOD, M.S.; RAHMAN, S.U.; SIDDIQUE, A.B. Flagellin gene based phylogenetic analysis of Pakistani strain of *Borrelia anserina* isolated from *Argas* ticks. **African Journal of Microbiology Research**. 6:3214-3221, 2012.

ATALIBA, A. C. **Estudo de *Borrelia* spp. no Brasil**. 61f: il. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, SP, 2006.

AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbondioxide in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 391, n. 12, p. 1103-1110, 1993.

AVILA, V. S.; ALBINO, J.; BASSI, L. **Cuidados Iniciais na Produção do Frango de Corte Colonial Embrapa 041**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Suínos e Aves. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2004. Disponível em:

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/cuidados_iniciais_prod_fc_colonial_emb_rapa_041_000fzo1kten02wx5ok0cpoo6aw1a2vz3.pdf> Acesso em: 24 de Junho de 2017.

AVILA, V.S.; CODLEBELLA, A; BRUM, P.A.R.; FIGUEIREDO, E.A.P.; ARMILIATO, N.M. **Níveis de energia metabolizável para frangos de corte de alto desempenho, em criações alternativas**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 398. 4p, 2005.

BACHA, W.J.; BACHA, L.M. **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. 2ª ed. Editora Roca, São Paulo, 320p, 2003.

BALASHOV, Y.S. **A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals**. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America. 8(5):159-376, 1972.

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

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

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

BASSI, L. J; ALBINO, J. J.; AVILA, V. S.; SCHIMDT, G. S.; JAENISCH, F. R. F. **Recomendações básicas para manejo de frangos de corte colonial**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. Documentos / Embrapa Suínos e Aves. 19p, 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/publicacao_i4t543i_000fjbmu08m02wyiv809gkz51a9e6qfs.pdf>. Acesso em: 07/12/17.

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

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

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

BERTHEAU, P.; CAZALS-HATEM, D.; MEIGNIN, V. et al. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 5, p. 370-4, 1998.

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

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

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

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

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

BUNIKIS, J; LUKE, C. J.; BUNIKIEME, E; BERGSTROM, S; BARBOUR, A.G. A surface-exposed region of a novel outer membrane protein (P66) of *Borrelia* spp is variable in size and sequence. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1618-1623, 1998.

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

BURGDORFER, W.; SCHWAN, T. G. **Borrelia**. In: BALOWS, W. J. HAUSLER, JR., K. L. HERRMANN, H. D. ISENBERG, AND H. J. SHAWDOMY, eds. Manual of clinical

microbiology, 5ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 560-566, 1991.

CASTRO, A.G.M. **Enfermidades do Sistema Respiratório**. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. Doenças das Aves. Campinas: FACTA, p. 71-74, 2000.

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

CDPA. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do SUL (UFRGS). **Manual de Necropsia**, p.14. Disponível em <www.cdpa.ufrgs.br>. Acesso em: 15 de nov. de 2017.

CEPEDA, M. B. **Transmissão Experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758): Parâmetros Clínicos, Bioquímicos e Anátomo – Histopatológicos**. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2015.

CEPEDA M.B.; CEPEDA P.B.; BAÊTA B.A., GAUDÊNCIO F.N.; CORDEIRO M.D; MAGALHÃES-MATOS P.C.; BRITO M.F.; FONSECA A.H. Biochemical, anatomical and histopathological changes in the liver of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Borrelia anserina* Sakharoff, 1891. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(8):687-693, 2016.

CHEN X., MIFLIN J.K., ZANG P. & BLACKALL P.J. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. **Avian Disease**, v. 40, n. 2, p.398-407, 1996.

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

CIAS. Central de Inteligência de Aves e Suínos. Disponível em: www.cnpsa.embrapa.br/cias/. Acesso em: 18 de novembro de 2018

CLARK, K; HENDRICKES, A; BURGE, D. Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards of Southeastern United States. **The American Society for Microbiology**, 71: 2616-2625. 2005.

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

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

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

DAVIS, G. E. The identification of spirochetes from human cases of relapsing fever by xenodiagnosis with comments on local specificity of tick vectors. **Experimental Parasitology**. 5:271–275,1956.

DELAMATER, E .D; SAURINO, V.R. Studies on immunology of Spirochetes .Bac.Proc.52nd general meeting society of American Bacteriology .Boston 127-130 cited by Charles, W.d and James, B. (1963): A study of carrier state of avian spirochetosis in the chicken. **Avian Diseases**. 8:191-195, 1952.

DHAWEDKAR, R. G.; DHANESAR, N. S. Preservation of *Borrelia anserina* by liquid-nitrogen refrigeration. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 53, n. 10, p. 1124-1127, 1983.

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

DJANKOV, I; SOUMROV, I.; LOZEVA, T. Use of the Immuno-fluorescence method for the serotype identification of *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) strain. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, B, 19:221-225, 1972.

DODGE, R.W. Culture of ethiopian *Borrelia recurrentis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 25(6):935-939, 1973.

EISENDLE, K.; GRABNER, T.; KUTZNER, H., ZELGER, B. Possible Role of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato infection in Lichen Sclerosus. **Archives of dermatological research**. 144(5):591-598, 2008.

FELLAH, J.S; JAFREDO, T; DUNON, D. Development of Avian Immune System. IN: DAVISON, F; KASPERS, B; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, CAP.4, P.5-67, 2008.

FRANCIS, D. W: A case of fowl spirochetosis in New Mexico. **Poultry Science**, 35: 1142-1143, 1956.

GARG, R. R.; GAUTAM, O. P. Serological diagnosis of fowl Spirochetosis. **Avian Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 1971.

GILES, J.R.; OLSON, L.M.; JOHNSON, P.A. Characterization of ovarian surface epithelial cells from the hen: a unique model for ovarian cancer. **Experimental Biology And Medicine**, 231: 1718-1725, 2006.

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

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

GOTHE, R.; KOOP, E. Zur Biologischen Bewertung der Validität von *Argas Persicargas persicus* (Oken, 1818), *Argas (Persicargas) arboreus* kaiser, Hoogstraal und Kohls, 1964 und

Argas (Persicargas) walkerae (Kaiser und Hoogstraal, 1969). I. Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie. **Zoological Parasitenkd**, v. 44, n.1, p. 299-317, 1974.

GULMEZ, N. Are glands present in goose pancreatic ducts? A light microscope study. **Journal of the Pancreas**, v.4, n.3,p.125-128, 2003. Disponível em: <http://www.joplink.net/prev/200305/200305_03.pdf>. Acesso em 16 mar. 2017.

HOERR, F.J. **Liver**: In.: RIDELL, C. Avian histopathology. Pensilvania: Library of Congress, P. 143-166, 1996.

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**. 543:217-234. 2003.

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

HOOGSTRAAL, H., KAISER, M.N., WALKER, J.B., LEDGER, J.A., CONVERSE, J.D. and RICE, R.C.A. Observations on the subgenus *Argas* (Ixodoidea: Argasidae: *Argas*), A. (A.) *africolumbae*, n. sp., a Pretoria virus-infected parasite of birds in Southern and Eastern Africa. **Journal Medicine Entomology**. 12: 194-201, 1975.

HOOGSTRAAL, H. Ticks and Spirochetes. **Acta Tropica**. 36: 133-136, 1979.

HOOGSTRAAL H.. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances Parasitology**.24: 135–238, 1985.

HOSSEINI-CHEGENI, A; TELMADARRAIY, Z., TAVAKOLI, M.; FAGHIH, F. Molecular detection of *Borrelia anserina* in *Argas persicus* (Acari: Argasidae) ticks collected from Lorestan province, West of Iran. **Persian Journal of Acarology**. Vol. 6, No. 4, pp. 287–297, 2017.

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

FELSENFELD, O. **Borrelia**. Warren H. Green Publishing. St. Louis, MO, 1971.

JOHNSON, P.A. **Reprodução de Aves**, p. 691-701. In: REECE, W.O. DUKES, *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2006.

JOHNSON, R. C.; BURGDORFER, W.; LANE, R. S.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.; HYDE, F. W. *Borrelia coriaceae* sp. nov. putative agent of epizootic bovine abortion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 1, p. 72-74, 1987.

KERBER, R. E.; REV. C.E.; GILBERT, K.R. Treatment of Chancroid. **Archives of Dermatology**. 100. 2001.

KHADIM, K. K.; ZAKARIA, A. B.; ZUKI, M.; AMIN BABJEE, S. M.; SAAD, M. Z. Morphological study of pancreatic ductin red jungle fowl. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.42, p. 7209-7215, 2010. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/pdf2010/18Oct/Kadhim%20et%20al.pdf>>. Acesso em 20 nov. 2017.

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

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

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

KRUPKA, M; RASKA M; BELAKOVA, J; HORYNOVA, M; NOVOTNY, R; WEIGL, E. Biological aspects of Lyme diseases spirochetes. Unique bactéria of the *Borrelia burgdorferi* species group. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký**, 151: 175-186, 2007.

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

LEBECH, A.M.; CLEMMENSEN, O.; HANSEN, K. Comparison of *in vitro* culture, immunohistochemical staining, and PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**. 33(9):2328- 2333, 1995.

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

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

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

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

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

LIU, J.W; EVANS, H., LARSEN, P.; PAN, D.; XU, S.Z.; DONG, H.C.; DENG, X.B.; WAN B.; GI,T. Gross anatomy of the pancreatic lobes and ducts in six breeds of domestic ducks and six species of wild ducks in china. **Anatomia Histologia Embryologia** v.27, p.413-417, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9972650>>. Acesso em 30 mar. 2017.

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

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

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

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

MARCONI, R.T; GARON,G.F. Phylogenetic analysis of the genus *Borrelia* e a comparison of North Americana d European isolates of *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Bacteriology**, V.174,p.241-244, 1992.

MARCONI R.T.; LIVERIS D.; SCHWARTZ I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in

Borrelia japonica sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 33(4):2427-2434. 1995.

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

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

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

MELO, M. R; MARTINS, A. R.; BARBOSA I. V.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 375-381, 2010.

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

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

MILLAR, B.C; XU, J; MOORE, J.E. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. **Current Issues in Molecular Biology**., 9: 21- 40, 2003.

MOLINA, A.L.; TOBO, P. R. **Série Biologia Molecular Parte 2- Uso das Técnicas de biologia molecular para diagnóstico**. Hospital Israelita Albert Einstein. São Paulo, SP.2004.

MONTANDON, C. E. **Investigação molecular e sorológica da *Borrelia burgdorferi* sensu lato, em áreas endêmicas para Febre Maculosa Brasileira na Bacia Hidrográfica do Rio**

doce, Estado de Minas Gerais, Brasil. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. 2012.

MOURITSEN C.L.; WITWER C.T.; LITWIN C.M.; YANG L.; WEIS J.J.; MARTINS T.B.; JASKOWSKI T.D.; HILL, H.R. Polymerase chain reaction of Lyme disease. *American Journal of Clinical Pathology*, 105(5):647-654, 1996.

MUELLER, A. P.; WOLFE, H. R.; MEYER, R. K.; ASPINALL, R. L. J. Further Studies on the Role of the Bursa of Fabricius in Antibody Production. **The Journal of Immunology**, 88 (3) 354-360, 1962.

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

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

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

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **The anatomy of the domestic birds**. 2.ed. Berlin: Verlag Paul Parey, 202p. 1977.

NUNOYA, T.; YAGIHASHI, T.; TAJIMA, M.; NAGASAWA, Y. Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. **Veterinary Pathology**, 32:11-18, 1995.

NUNOYA, T.; KANAI, K.; YAGIHASHI, T.; HOSHI, S.; SHIBUYA K.; TAJIMA M. Natural case of salpingitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. **Avian Pathology**, 26:391-398, 1997.

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

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

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

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

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

RADI, Z.A.; TRAMPEL, D.W.; SMITH, B.S.; ROSENBUSCH, R.F.; GOLL, F. Immunohistochemical detection of *Mycoplasma gallisepticum* antigens in turkey respiratory tissues. **Avian Diseases**. 44:399-407. 2000.

RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M.E. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n.4, p. 307-11, p. 2005.

RAMOS-VARA, J.A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B; CHELACK, B.; CZUB S, et al. Suggest guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 393-413, 2008.

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

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

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

ROA, S.B.V. Spirochetosis in poultry. **Indian Council of Agricultural research new dalhi India**. Research series, 18, 1958.

RODEY, M.V.; SONI, J.L. Epidemiology of spirochetosis in chickens, effective measures for control of ticks *Argas persicus*. **Poult Guide**, 14:35-37, 1977.

ROHR, C. **Estudo s6obre ix6odidas do Brasil**. Trabalho do Instituto Oswaldo Cruz, p. 220, 1909.

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

ROSA, F.; CRESPO, M. V.; ESTEVES, L.; MENDES, L. Distribui77o de *Argas (Argas) reflexus reflexus* (Fabricius, 1974) no Norte e Centro de Portugal. **Acta Parasitol6gica Portuguesa**. 11 (1-2): 33-35, 2004.

RUIZ F.S.; ALESSI A.C.; CHAGAS C.A.; PINTO, G. A.; VASSALLO, J.

Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n.4, p. 263-70, 2005.

RUTZ, F.; ROLL, V. F. B.; XAVIER, E. G.; ANCIUTI, M. A.; LOPES, D. C. N. Fisiologia da digest77o e da absor77o77o em aves. **XVI Simp6sio Brasil Sul de Avicultura e VII Brasil Sul, Poultry Fair**, 07 a 09 de abril, Chapec6, SC - Brasil, 2015.

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

SAMUELSON, D.A. **Textbook of Veterinary Histology**. Saunders, St. Louis, Missouri. 546p. 2007.

SANTOLIN, I.D.A.C.; FAMADAS, K.M.; MCINTOSH, D. Detec77o e identifica77o de esp6cies de *Rickettsia* em carrapatos coletados de aves silvestres no Brasil pela PCR-RFLP, 35(Supl.2):68-73,2013. Revista Brasileira de Medicina Veterin77ria, v. 35, p. 5, 2013.

SANTOS, H. A. **Ciclo Biol6gico Comparado de Argas (Persicargas) miniatus Koch, 1844 (Acari: Argasidae) alimentados em Gallus gallus**. 2009, 52f. Disserta77o (Mestrado em Parasitologia Veterin77ria) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SANTOS, J. A. **Patologia Geral dos Animais Dom6sticos (mam6feros e Aves)**. Editora: Interamericana, 407p.1978.

SANTOS, H.A. ANGELO, I. C.; FRANQUE, M. P.; BALDANI, C. D.; THOMÉ, S. M. G.; FACCINI, J. L. H.; MASSARD, C. L. Ciclo biológico de *Argas miniatus* em laboratório: estágio adulto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41,n.1, p.164-170,jan, 2011.

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

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

SCOTT, T. R. Our Current Understanding of Humoral of Poultry. **Poultry Science**, 83, 574-579, 2004.

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

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

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

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

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

STEERE, A.C.; COBURN, J.; GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. **Journal of Clinical Investigation**, 113: 10093-1101, 2004.

STEINER, C.V.; DAVIS, R.B. **Patologia de las Aves Enjauladas**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 165, 1985.

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

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

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

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

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

WANG, G.; VAN DAM, A. P.; LE FLECHE, A.; POSTIC, D.; PETER, O.; BARANTON, G.; BOER, R.; SPANJAARD, L.; DANKERT, J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 927-932, 1997.

WARTHIN, A. S; STARRY, A. C: A more rapid and improved method for demonstrating spirochetes in tissue. **American Journal of Syphilis, Gonorrhoea, and Venereal diseases**. 4: 97-102, 1920.

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

WOUDA W.; VEEN T.W.S.V.; BARNES H.J. *Borrelia anserina* in chickens previously exposed to *Borrelia theileri*. **Avian Diseases**. 19(1):209-210, 1975.

YILMAZ, F.; TIMURKAAN, N. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antigens by immunohistochemical method in pneumonic broiler chicken lungs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 10(19):2557- 2560, 2011.

YILMAZ, F.; TIMURKAAN, N.; KILIÇ, A.; KALENDER, H.; KILINÇ, Ü. Detection of *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* in chicken by immunohistochemical, PCR and culture methods. **Revue de Médecine Vétérinaire**. 162(2):79-86. 2011.

ZINGG, B.C.; LEFEBVRE, R.B. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia coriaceae*, putative agent of epizootic bovine abortion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 11, p. 1509-1515, 1994.

ZUNG, J. L.; LEWENGRUB, S.; RUDZINSKA, M. A.; SPIELMAN, A.; TELFORD, A. R.; PIESMAN, J. Fine structural evidence for the penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdoferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, n. 1, p. 1737-1748, 1989.

ANEXOS

ANEXO I

Certificado de Guia de Trânsito dos animais (GTA), certificando a finalidade de engorda das aves, procedência e a vacinação dos pintos ainda com 1 dia de vida para Doença de Marek e Boubá Aviária.

01.470.184

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

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

UF: RS SÉRIE: K NÚMERO: 698379

GUIA DE TRÂNSITO ANIMAL (GTA)

(VÁLIDA EM TODO O TERRITÓRIO NACIONAL)

1. BOVÍDEOS Bovinos Bubalinos

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

3. AVES

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

4. SUÍDEOS **5. OUTRAS ESPÉCIES**

Macho	Fêmea	Total	Peso (KG)	Unidades

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

até 6 meses		Acima de 6 meses		TOTAL	
M	F	M	F		

9. ANIMAIS AQUÁTICOS

<input type="checkbox"/> Peixes	<input type="checkbox"/> Adultos	<input type="checkbox"/> Ovos embolados	Peso(KG)	Unidades
<input type="checkbox"/> Crustáceos	<input type="checkbox"/> Alevinos	<input type="checkbox"/> Cistos		
<input type="checkbox"/> Moluscos	<input type="checkbox"/> Larvas	<input type="checkbox"/> Pós-Larvas		

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

11. PROCEDÊNCIA
CPF/CNPJ: 72.078.709/0002-14
Nome: GRAMADO AVICULTURA AGROPECUÁRIA LTDA
Estabelecimento: GRAMADO AVICULTURA AGROPECUÁRIA LTDA
Código do Estabelecimento: 43029602182
Município: CAXIAS DO SUL UF: RS

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

13. FINALIDADE Abate Engorda Reprodução Exposição Leiteiro Exporta

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

15. VACINAÇÕES FEBRE AFTOSA BRUCELOSE MAREK BOUBA AVIÁRIA

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

17. OBSERVAÇÃO
Nota Fiscal: 000.057.268. ORIGINÁRIOS DOS ESTAB. GRAMADO REGIST. MAPA RS-12655-1 E RS-11187-5, NÚCLEO ÚNICO, LOTE 29/12, ANEXO CERT. SANIT. DA GRANJA DE ORIGEM. VAC. NEWCASTLE MATR.: 15/10/13.

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

19. EMITENTE
Médico Veterinário Federal Estadual Habilitado Funcionário Autorizado

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

21. IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO EMITENTE
VANESSA CRISTINA BREUING
Médico Veterinário
Portaria: SF/AMAPA-RS N 392/12
CRMV-RS: 9443

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

* Documento para o trânsito de animais de acordo com o Decreto nº 5.741/07 de 16/03/2006.
** A presente GTA será inválida nos casos de...

431169837929112013060001600702900218205

30 NOV. 2013

ABRU LAGES MUNICI: CAXIAS DO SUL

CREDENCIAL NR

CAXIAS DO SUL

ANEXO II

Certificado de monitoramento sanitário da granja para *Salmonella* spp e *Mycoplasma* spp nas matrizes.



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

CERTIFICADO SANITÁRIO 050/2013/RS

Validade do Certificado: até 15 de Janeiro de 2014.

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

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

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

Fátima Christiane Barbasque
Fiscal Federal Agropecuário
Médica Veterinária CRMV/RS 6555
Médica Veterinária responsável pela avaliação

Roberto Caprioli Martins
Fiscal Federal Agropecuário
Médico Veterinário CRMV/RS 8429
Chefe do Serviço de Saúde Animal

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

ANEXO III

Medicamentos utilizados no experimento

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

ANEXO IV

Laudo de Necropsia e Histopatológico da ave que originou a infecção dos carrapatos



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

ANATOMIA PATOLÓGICA

LAUDO DE NECROPSIA E HISTOPATOLÓGICO SAP 33313

ANIMAL: não se aplica
ESPÉCIE: *Gallus gallus*
RAÇA: não informado
IDADE: não informado
SEXO: não informado
PENAGEM: não informado
MÉDICO VETERINÁRIO: não informado
PROPRIETÁRIO: Laboratório de Doenças Parasitárias
PROCEDÊNCIA/ENDEREÇO: Laboratório de Doenças Parasitárias
DATA DE RECEBIMENTO DA AMOSTRA: 01/09/2016

HISTÓRICO:

Segundo informação prestada pelo responsável: "ave infectada experimentalmente por *Borrelia anserina*. A ave antes da eutanásia apresentava alguns estertores respiratórios.

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA:

Segundo descrição feita pelo responsável:

"Fígado: hepatomegalia, congesto e presença de manchas esbranquiçadas por toda a superfície do órgão."

"Baço: esplenomegalia, baço congesto e friável ao corte."

"Rins: aumento de tamanho e hiperêmico."

"Coração, SNC, intestinos, Bursa de Fabricius: sem alterações."

"Pulmão: sem alteração."

Foi encaminhado ao SAP-UFRRJ, um recipiente contendo fragmentos de rim, baço, intestino, pulmão, coração e fígado. As amostras foram clivadas, identificadas e encaminhadas para processamento histológico de rotina.

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA:

Baço: visualiza-se áreas multifocais (em folículos linfóides) a focalmente extensas (polpa branca e polpa vermelha) de moderada a acentuada perda de arquitetura celular, caracterizadas por núcleos picnóticos e detritos celulares (necrose) e acentuada deposição de material fibrilar ou amorfo e espesso eosinofílico (fibrina). Observa-se moderada depleção difusa de polpa branca que é substituída por moderada proliferação de macrófagos. Nota-se nos seios esplênicos moderada infiltração por macrófagos, que, por vezes, contêm pigmento amorfo, granular intracitoplasmático amarronzado (hemossiderina). Nota-se arteríolas com espessamento discreto da musculatura lisa, edema e endotélio de núcleo ovalado e vesiculado (reativo).

Fígado: há áreas aleatórias de perda moderada da arquitetura tissular com núcleos picnóticos e detritos celulares (necrose), além de moderada a acentuada quantidade de material fibrilar eosinofílico (fibrina) em tais regiões. Há ainda moderado infiltrado predominantemente periportal composto por linfócitos e macrófagos (em menor quantidade). Nota-se em uma veia de médio calibre deposição de material fibrilar eosinofílico na túnica íntima com infiltrado moderado de linfócitos e macrófagos (endoflebite).

Coração: observa-se, no epicárdio, deposição focalmente extensa moderada de material amorfo, fibrilar eosinofílico (fibrina), além de infiltrado moderado de linfócitos e macrófagos e heterófilos em menor quantidade.

Pâncreas, rim, intestino, pulmão: sem alterações significativas dignas de nota.

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO:


Baço: esplenite fibrinonecrótica linfo-plasmocítica e histiocítica multifocal moderada. Depleção difusa de polpa branca com proliferação de macrófagos.

Fígado: hepatite fibrinonecrótica aleatória e periportal linfo-histiocítica discreta a moderada. Endoflebite fibrinosa e linfo-histiocítica focal moderada.


Coração: epicardite fibrinosa linfocítica e histio-heterofílica focalmente extensa moderada.

COMENTÁRIOS:

As lesões esplênicas são compatíveis com as encontradas na infecção experimental por *Borrelia anserina* em frangos (Nasri 2010).


Ticianá do Nascimento França
Vivian de Assunção Nogueira

Prof.s, Anatomia Patológica


Bartolomeu Neves
CRMV- 13687-RJ
Residente em Patologia Animal

Gabriela de Carvalho Cid
CRMV 13360-RJ
Doutoranda em Patologia Animal

ANEXO V

Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IV-UFRRJ)



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Imuno-histopatologia da Borreliose aviária em Gallus gallus (Linnaeus, 1758) e Avaliação dos parâmetros biológicos de Argas (Persicargas) miniatus (Acarí: Argasidae) infectados por Borrelia anserina (Sakharoff, 1891)", protocolada sob o CEUA nº 4886061115 (ID 005771), sob a responsabilidade de **Adivaldo Henrique da Fonseca e equipe; Marcio Barizon Cepeda; Matheus Dias Cordeiro; Paulo Cesar Magalhães Matos; Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim; Michele Bahia do Vale Silva; Adililton Pacheco de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 26/04/2017.

We certify that the proposal "Immuno-histopathology of avian borreliosis in Gallus gallus (Linnaeus, 1758) and Evaluation of biological parameters of Argas (Persicargas) miniatus (Acarí: Argasidae) infected with Borrelia anserina (Sakharoff, 1891)", utilizing 34 Birds (34 females), 1 Rabbits (1 females), protocol number CEUA 4886061115 (ID 005771), under the responsibility of **Adivaldo Henrique da Fonseca and team; Marcio Barizon Cepeda; Matheus Dias Cordeiro; Paulo Cesar Magalhães Matos; Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim; Michele Bahia do Vale Silva; Adililton Pacheco de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 04/26/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 06/2017 a 04/2019

Área: Doenças Parasitárias

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais						
Espécie:	Aves	sexo:	Fêmeas	idade:	7 a 17 semanas	N:	34
Linhagem:	Caipira colonial			Peso:	1 a 2 kg		
Origem:	Setor de Cunicultura da UFRRJ						
Espécie:	Coelhos	sexo:	Fêmeas	idade:	3 a 4 meses	N:	1
Linhagem:	New Zealand			Peso:	4 a 6 kg		

Local do experimento: O experimento será realizado no laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública - Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Laboratório de Histopatologia, ambos localizados no Prédio de Sanidade Animal (convênio UFRRJ/Embrapa), situado no município de Seropédica-RJ.

Seropédica, 29 de julho de 2019

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

ANEXO VI

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IV-UFRRJ):
Relatório Final.



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



Seropédica, 29 de julho de 2019
CEUA N 4886061115

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Adivaldo Henrique Da Fonseca
Área: Doenças Parasitárias

Título da proposta: "Imuno-histopatologia da Borreliose aviária em Gallus gallus (Linnaeus, 1758) e Avaliação dos parâmetros biológicos de Argas (Persicargas) miniatus (Acarí: Argasidae) infectados por Borrelia anserina (Sakharoff, 1891)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFRRJ (ID: 000679)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 21/junho/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Sim Os resultados obtidos propiciaram a criação de novas atividades? Resp: Sim 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Resp: Sim 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Sim. Apenas 01 ave foi à óbito 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução das atividades? Resp: Não 5. As atividades foram gravadas e/ou transmitidas de alguma forma? Resp: Não 6. Qual foi o número total de alunos participantes? Resp: 06 alunos".

Comentário da CEUA: " Recomendo a aprovação do relatório.".

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

ANEXO VII

Artigo publicado na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Pesq. Vet. Bras. 36(8):687-693, agosto 2016
DOI: 10.1590/S0100-73682016000800002

Alterações bioquímicas, anatômicas e histopatológicas em fígado de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentalmente infectados por *Borrelia anserina* Sakharoff, 1891¹

Marcio B. Cepeda², Patricia B. Cepeda², Bruna A. Baêta², Fabrício N. Gaudêncio³,
Matheus D. Cordeiro², Paulo C. Magalhães-Matos⁴, Marilene F. Brito⁵
e Adivaldo H. Fonseca^{2*}

ABSTRACT. Cepeda M.B., Cepeda P.B., Baêta B.A., Gaudêncio F.N., Cordeiro M.D., Magalhães-Matos P.C., Brito M.F. & Fonseca A.H. 2016. [Biochemical, anatomical and histopathological changes in the liver of *Gallus gallus* Linnaeus, 1758 experimentally infected by *Borrelia anserina* Sakharoff, 1891.] Alterações bioquímicas, anatômicas e histopatológicas em fígado de *Gallus gallus* Linnaeus, 1758, experimentalmente infectados por *Borrelia anserina* Sakharoff, 1891. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 36(8):687-693. Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: adivaldo.fonseca@yahoo.com

Spirochetosis avian is a septicemic disease of acute course and cosmopolitan can affect various avian species, caused by *Borrelia anserina* and transmitted by *Argas miniatus*. The experiment aimed to evaluate the biochemical, anatomical and histopathological changes in the liver of *Gallus gallus* caused by experimental infection with *B. anserina*. A total of 40 fowls of the species *G. gallus* were divided into four randomized groups of ten fowls each: G1 - inoculated with serum infected with *B. anserina*; G2 - inoculated with 0.9% saline; G3 - exposed to nymphs of 3rd instar of *A. miniatus* infected with *B. anserina*; G4 - exposed to ticks nymphs of 3rd instar of *A. miniatus* free of *B. anserina*. The fowls of Groups 1 and 3 expressed at 3 and 6 days post-inoculation (DAI) respectively, symptoms characteristic of the disease as lack of appetite, weight loss, drowsiness, greenish diarrhea, pale mucous membranes, ruffled feathers and hyperthermia. ALT of group 1 levels were significantly higher only at the 12th and 24th day after inoculation (DAI) compared with its control group (group 2), and in group 3 these levels remained high until the 20th DAI as compared with its control group (group 4). AST enzyme fluctuated little in the experimental groups, although elevations at 12th DAI has been found in group 1 and 3. The liver of fowls in groups 1 and 3, presented at necropsy moderate hepatomegaly, congestion, irregular surface and red color to cyanotic. It found even small whitish spots on the surface. The histopathology revealed congestion, mononuclear inflammatory infiltrates, fibrinoid necrotic foci, dilatation of sinusoids, and vacuolation of hepatocytes. The Warthin-Starry staining revealed in the liver of fowls in groups 1 and 3 the presence of spirochetes compatible with *B. anserina*, often within blood vessels.

INDEX TERMS: Liver, *Gallus gallus*, *Borrelia anserina*, spirochetosis, tick borne diseases, domestic chicken, serum biochemistry, histopathology.

¹ Recebido em 23 de junho de 2015.

Aceito para publicação em 23 de abril de 2016.

² Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. *Autor para correspondência: adivaldo.fonseca@yahoo.com

³ Laboratório de Biologia, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR-465 Km 47, Seropédica, RJ 23891-000, Brasil.

⁴ Setor de Anatomia Patológica, DESP, IV-UFRRJ, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil

RESUMO. A espiroquetose aviária é uma enfermidade septicêmica de curso agudo, cosmopolita, que acomete diversas espécies aviárias, causada por *Borrelia anserina* e transmitida pelo carrapato *Argas miniatus*. O experimento teve como objetivos avaliar as alterações bioquímicas e anatômico-histopatológicas no fígado de *Gallus gallus*, causadas pela infecção experimental por *B. anserina*. Quarenta aves da espécie *G. gallus* foram divididas em quatro grupos