

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INATIVAÇÃO DA *Borrelia anserina* PELA AÇÃO DA LUZ
ULTRAVIOLETA ASSOCIADA À RIBOFLAVINA EM SORO
SANGUÍNEO DE *Gallus gallus domesticus*

DANIELA MARQUES MACIEL DABUS

Botucatu – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INATIVAÇÃO DA *Borrelia anserina* PELA AÇÃO DA LUZ
ULTRAVIOLETA ASSOCIADA À RIBOFLAVINA EM SORO
SANGUÍNEO DE *Gallus gallus domesticus*

DANIELA MARQUES MACIEL DABUS

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes
Co-orientador: Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca

Botucatu – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dabus, Daniela Marques Maciel.

Inativação da *Borrelia anserina* pela ação da luz ultravioleta associada à riboflavina em soro sanguíneo de *Gallus gallus domesticus* / Daniela Marques Maciel Dabus. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Raimundo Souza Lopes

Coorientador: Adivaldo Henrique da Fonseca

Capes: 50503030

1. Aves - Doenças. 2. *Borrelia*. 3. Fotoquimioterapia. 4. Galinha. 5. Radiação ultravioleta.

Palavras-chave: Borreliose aviária; Galinhas; Terapia fotodinâmica.

Nome da autora: Daniela Marques Maciel Dabus

Título: INATIVAÇÃO DA *Borrelia anserina* PELA AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA ASSOCIADA À RIBOFLAVINA EM SORO SANGUÍNEO DE *Gallus gallus domesticus*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ –UNESP – Botucatu – SP

Profª Drª Regina Kiomi Takahira
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu – SP

Prof. Dr. Pedro Paulo Pires
Membro
Setor de Sanidade Animal
Embrapa Gado de Corte – Campo Grande - MS

Data da Defesa: 01 de outubro de 2015.

COMISSÃO DE ÉTICA**Protocolo nº 36/2014 – CEUA**

Este experimento está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu, Protocolo nº 36/2014 – CEUA (Anexo 1).

*"Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida,
ou como um resultado que aponta uma nova direção"*
Steve Jobs

*Aos meus pais e aos meus anjos de quatro patas, em especial
"Luck e Dino", por me ensinarem o verdadeiro significado de
amor.*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, pela coragem e segurança, me guiando para a realização de todo o mestrado, e por sempre colocar em minha vida pessoas tão especiais.

Aos meus pais de sangue e coração, Marcia Maciel e José Fontão Odria, Paulo Dabus e Ângela Gonçalves, sem vocês não seria ninguém. Obrigada por me ensinarem a amar de tantas formas, e a entender que o amor é liberdade. Obrigada por me apoiarem por toda a minha vida, muitas vezes se esquecendo de vocês mesmo. Amo vocês!

Ao meu namorado, Cassiano Tomé por estar comigo nas melhores e piores situações, por me amar, me apoiar, me entender e ter paciência em toda nossa história, principalmente para a realização do mestrado. Não tenho palavras para agradecer a você. Te amo pra sempre!

As minhas avós Georgette Dabus e Pedrina Maciel “*in memorian*”, por todo o amor e dedicação. Não há um dia em que não me lembre de vocês, e sei que de onde estiverem estão vivendo esta etapa de minha vida comigo.

Aos meus irmãos Leonardo Dabus, Niazi Dabus, e aos “irmãos postiços” Bianca Odria, Thiago Odria e Fernanda Odria, por todo o carinho e amizade, mesmo que de longe.

A minha família, que mesmo distante são a minha base e referência.

Aos meus companheiros inseparáveis, Luck e Dino, por me darem força em muitos momentos de solidão, sem entenderem o quão importante era a presença de vocês. Obrigada por me amarem incondicionalmente e me ensinarem tanto. Vocês são fundamentais em minha vida. Amo vocês!

Aos meus anjos de quatro patas, Tchuca gorda, Tchuco, Tchuquinha, Zéca e Fredinho “*in memorian*”, por me alegrarem e serem tão especiais em minha vida.

Ao Professor Raimundo Souza Lopes pela orientação, ajuda e amizade para a realização do mestrado.

A Professora Regina Kiomi Takahira pela ajuda, amizade e companheirismo.

Ao professor Antônio Claudio Tedesco, e seu orientado Fernando Primo, por toda a ajuda e colaboração.

Ao Professor Adivaldo Henrique da Fonseca, por aceitar me co-orientar, pelo auxiliou durante toda esta trajetória, pela amizade e carinho.

Aos amigos do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ, Matheus Cordeiro, Buna Baêta e Marcio Cepeda, por toda ajuda e amizade para que este projeto pudesse ser concluído.

Aos meus amigos Brayan López, Nathália Rodriguez, Paulo Argollo, Giovanna Gelsi, Maurício Wilmsen, e Loreanna Bertolucci, muito obrigada por toda ajuda e carinho de vocês, por tornarem o trabalho tão divertido, sem vocês tudo teria sido mais difícil!

A minha amiga Leizinara Lopes por partilhar de tantos momentos inesquecíveis comigo, por me orientar e me ensinar, pela amizade que levarei comigo para toda a vida. Aos seus pais Jodascil e Aparecida Gonçalves por toda ajuda.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório, Carolina Martins, Daniele Silvano, Bruno Ceolin, Adriana Figueira, Victor Yunes, Bruna Santos, Fernanda Rodrigues, Jussara Shimon, Cristiana Costa e Bruno Bergamini, por toda ajuda e companheirismo durante a realização do projeto.

Aos amigos e pais de coração Luciana e Renee Andreasi, por toda a amizade e carinho, por me apoiarem e torcerem por mim. Amo vocês.

Aos funcionários do Laboratório Clínico Veterinário, Marcio Figueira e Marcos Montanha, por toda ajuda e amizade, pela grande ajuda na realização das dosagens bioquímicas.

Aos professores do Departamento de Zoonoses e Saúde Pública, por cederem seus equipamentos e instalações para a realização deste projeto, Professora Jane Megid, Professor Marcio Ribeiro, Professor José Paes e Professor Hélio Langoni.

Aos funcionários do Departamento de Zoonoses e Saúde Pública, seu Roberto, Pardal e Benedito, por todo apoio, ajuda e amizade.

Ao Professor João Pessoa de Araújo Jr e suas orientadas Camila Malossi e Jheniffer Teles, pela ajuda na realização da qPCR, por toda a paciência e amizade.

Ao Professor José Roberto Sartori, Professor Adriano Sakamoto e Professor Alessandre Hataka, pelo auxílio e amizade durante a realização do experimento.

Aos residentes da Ornitopatologia Igor Vellano, Ana Carlina Moraes, Tarcísio Silva e Bruna Domeneghetti pelo auxílio e ajuda durante a realização do projeto.

A Professora Miriam Tsunemi pela ajuda com a estatística e amizade.

A minha grande amiga Thays de Campos Trentin por me incentivar para que pudesse hoje estar concluindo esta etapa em minha vida. Por toda a amizade desde os tempos da faculdade, e por tantos momentos que dividimos juntas! Amo você!

Aos meus amigos Amanda Leite, Bruno Bojikian, Natasra de Rezende, Rafael Leal, Paulo Grilo, Jane Bojikian, Sergio Pontes, Erica Jacinto e Maykon Martins, obrigada por todas as conversas de ajuda e por me apoiarem e acreditarem tanto em mim! Amo vocês!

A Soraya Sacco pelo apoio para que pudesse me qualificar profissionalmente, pela amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao Dr. Pedro Paulo Pires por aceitar o convite de membro desta banca e por toda amizade.

A Granja Moretto, em especial ao Davis Bonfim e equipe da Drogasil, em especial Fernando, por toda ajuda e atenção.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto (2014/03353-4) e pela bolsa de mestrado (2014/03303-7).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores de referência de Fosfatase alcalina, Aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol e triglicerídeos. International Species Information System, Conventional U.S.A Units e Campbell <i>in</i> Thrall et al., (2012).....	31
TABELA 2. Valores de referência de Volume Globular (VG) e Proteína Plasmática Total (PPT). Sistema Internacional de Informação das Espécies (Conventional U.S.A. Units – Outubro de 1999) e Campbell <i>in</i> Thrall et al., (2012).....	33
TABELA 3. Média e desvio padrão dos valores de peso corporal (Kg) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	72
TABELA 4. Média e desvio padrão dos valores de Fosfatase alcalina sérica (UI/l) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	73
TABELA 5. Média e desvio padrão dos valores de Aspartato aminotransferase (AST) (UI/l) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	74

TABELA 6. Média e desvio padrão dos valores de Alanina aminotransferase (ALT) (UI/l) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 75

TABELA 7. Média e desvio padrão dos valores de Colesterol sérico (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 76

TABELA 8. Média e desvio padrão dos valores de Triglicerídeos séricos (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 77

TABELA 9. Média e desvio padrão dos valores do volume globular (%) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 78

TABELA 10. Média e desvio padrão dos valores de proteína plasmática total (g/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 79

TABELA 11. Média e desvio padrão dos valores da Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) (espiroquetas/ml) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 80

TABELA 12. Média e desvio padrão dos valores de espiroquetemia ($\times 10^7$ /ml) e motilidade das espiroquetas das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 81

TABELA 13. Média e desvio padrão dos valores de espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado (espiroquetas/campo) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 82

TABELA 14. Média dos valores do Ensaio de Imunoabsorção Enzimático indireto (ELISA indireto) padronizado (CDO*100/CUT off) (g/dL) de galinhas poedeiras, nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 83

TABELA 15. Porcentagem de galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) positivas para o exame de Imunofluorescência indireta (RIFI) (%) de, nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 84

TABELA 16. Média e desvio padrão dos valores de Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) (espiroquetas/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015..... 85

TABELA 17. Média dos valores de aglomerados de espiroquetas (/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015..... 86

TABELA 18. Motilidade das espiroquetas das placas de cultivo celular, no momentos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015.....	87
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A. Fotomicrografia de <i>B. anserina</i> em microscópio de campo escuro utilizando câmara de Neubauer. Soro de galinha poedeira. 200x. B. Fotomicrografia de <i>B. anserina</i> . Esfregaço sanguíneo corado de galinha poedeira. Wright 400x. (Fonte: DABUS, 2015).....	6
FIGURA 2. Estrutura da produção de ovos. Granja Moretto. (Fonte: DABUS, 2015).....	17
FIGURA 3. Frangos doadores de soro parasitado. (Fonte: DABUS, 2015).....	17
FIGURA 4. A. Tela de proteção na porta do alojamento. B. Ambiente interno do alojamento dos animais. C. e D. Sistema automático de bebedouro. (FONTE: DABUS, 2015).....	20
FIGURA 5. A. Antissepsia utilizando álcool iodado. B. Coleta de sangue da veia ulnar. C. Coleta de sangue da veia metatársica. (Fonte: DABUS, 2015).....	21
FIGURA 6. A. Antissepsia utilizando álcool iodado. B. Punção da veia metatársica. C. Coleta do sangue utilizando tubos capilares. (FONTE: DABUS, 2015).....	22
FIGURA 7. A. Pesagem do frango doador. B. Inóculo de <i>B. anserina</i> (FONTE: DABUS, 2015).....	23
FIGURA 8. Coleta de sangue do frango doador utilizando sistema a vácuo (FONTE: DABUS, 2015).....	24
FIGURA 9. Placa de cultivo celular de 12 poços. Grupo tratado placa. (FONTE: DABUS, 2015).....	25
FIGURA 10. Processo de terapia fotodinâmica (FONTE: DABUS, 2015).....	25
FIGURA 11. Inoculação de 0,25 ml de cepa parasitada tratada com terapia fotodinâmica. Ave do grupo tratado. (FONTE: DABUS, 2015)....	28
FIGURA 12. Inoculação de 0,25 ml de soro parasitado tratado em meio de cultivo BSK-H. Placa do grupo tratado. (FONTE: DABUS, 2015).	29

FIGURA 13. A. Animais experimentais em estado de alerta. B. Produção de ovos dos animais experimentais. C. Crista do animal apresentando coloração normal (avermelhada). D. Aferição de temperatura utilizando termômetro de mercúrio. (FONTE: DABUS, 2015).....	30
FIGURA 14. Aparelho de dosagem bioquímica automático Cobas Mira Plus®. (FONTE: DABUS, 2015).	31
FIGURA 15. Técnica de microhematócrito.(FONTE: DABUS, 2015).....	32
FIGURA 16. Refratômetro utilizado para a realização da determinação da proteína plasmática total. Método de refratometria. (FONTE: DABUS, 2015).	32
FIGURA 17. A. Lâmina de RIFI contendo antígeno específico para <i>B. anserina</i> . B. Lavagem da lâmina de RIFI utilizando PBS. C. Lâmina de RIFI ao abrigo da luz para incubação em estufa a 37°C. (FONTE: DABUS, 2015).....	34
FIGURA 18. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para <i>Borrelia anserina</i> nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers <i>Borrelia anserina</i> rRNA (DABUS, 2015).....	36
FIGURA 19. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para <i>Borrelia anserina</i> nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers <i>Borrelia anserina</i> rRNA gene (DABUS, 2015).....	36
FIGURA 20. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para <i>Borrelia anserina</i> nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers <i>Borrelia anserina</i> fla gene (DABUS, 2015).....	38
FIGURA 21. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para <i>Borrelia anserina</i> nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers <i>Borrelia anserina</i> fla gene. (DABUS, 2015).....	38

FIGURA 22. A. Equipamento 7500 Fast RealTime PCR (Applied Biosystems) B. Primers utilizados para as amplicações. (FONTE: DABUS, 2015).....	39
FIGURA 23. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers Beta-actina (DABUS, 2015).....	40
FIGURA 24. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers Beta-actina. (DABUS, 2015).....	40
FIGURA 25. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers GAPDH. (DABUS, 2015).....	42
FIGURA 26. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers GAPDH. (DABUS,2015).....	42
FIGURA 27. A. Câmara de Neubauer. B. Microscópio E200 Nikon®. C. Fotomicrografia da câmara de Neubauer. 200x. (FONTE: DABUS, 2015).....	43
FIGURA 28. Realização do esfregaço sanguíneo. (FONTE: DABUS, 2015).....	44
FIGURA 29. Animais dos grupo tratado e luz antes de serem inoculadas. Animais clinicamente saudáveis e alertas. (FONTE: DABUS, 2015).....	52
FIGURA 30. A. Sonolência. B. Diarreia esverdeada. C. Crista pálida. D. Penas arrepiadas e apatia. E. Morte. (FONTE: DABUS, 2015).....	52
FIGURA 31. Valores médios de peso corporal (Kg) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	53
FIGURA 32. Valores médios de fosfatase alcalina (UI/L) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	54

FIGURA 33. Valores médios de aspartato aminotransferase (UI/L) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 55

FIGURA 34. Valores médios de alanina aminotransferase (UI/L) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 56

FIGURA 35. Valores médios de colesterol sérico (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 58

FIGURA 36. Valores médios de triglicerídeos sérico (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 59

FIGURA 37. Valores médios de volume globular (%) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 60

FIGURA 38. Valores médios de proteína plasmática total (g/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 61

FIGURA 39. Valores médios de qPCR (espiroquetas/ml) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015..... 63

FIGURA 40. Fotomicrografia de contagem de espiroquetas em campo escuro utilizando câmara de Neubauer. 200x. Seta. Aglomerado de espiroquetas. Cabeça de seta. Espiroquetas livres (FONTE: DABUS, 2015).....	64
FIGURA 41. Valores médios de espiroquetemia em campo escuro ($\times 10^7$ espiroquetas/ml) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	65
FIGURA 42. Valores médios de espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado (espiroquetas/campo) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	66
FIGURA 43. Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo corado mostrando intensa quantidade de <i>Borrelia anserina</i> . 400x. (FONTE: DABUS, 2015).....	66
FIGURA 44. Valores médios de do Ensaio de Imunoadsorção Enzimático indireto (ELISA indireto) padronizado (CDO*100/CUT off) (g/dL) das galinhas (<i>Gallus gallus domesticus</i>), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	67
FIGURA 45. A. Animal negativo, grupo saúde. B Animal positivo, grupo tratado. (DABUS, 2015).....	68
FIGURA 39. Fotomicrografia de coágulo em cavidade abdominal. Presença de <i>B. anserina</i> . (FONTE: DABUS, 2015).....	69
FIGURA 47. Valores médios de qPCR (espiroquetas/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde), grupo 9 (grupo doença), grupo 10 (grupo imunossupressão), grupo 11 (grupo luz), grupo 12 (grupo riboflavina) e grupo 13 (grupo veículo) e grupo 14 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.....	70

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Calendário sanitário empregado no manejo de criação das aves (provenientes) da Granja Moretto. Fonte Granja Moretto, 2015.....	18
QUADRO 2. Momentos do experimento.....	26

LISTA DE ABREVIações

%	Porcentagem
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BHI	Brain Heart Infusion
BSK-H	Barbour-Stoenner-Kelly
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimático indireto
FA	Fosfatase alcalina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IgY	Imunoglobulina Y
PPT	Proteína plasmática total
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RIFI	Imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
UV	Ultravioleta
VG	Volume globular

SUMÁRIO

RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Borrelioses.....	5
2.2 Borreliose aviária.....	6
2.3 Terapia Fotodinâmica.....	10
2.3.1 Associação da luz ultravioleta associada à riboflavina.....	11
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 Local de realização.....	16
4.2 Animais experimentais.....	16
4.3 Grupos experimentais.....	19
4.3.1 Etapa <i>In vivo</i>.....	19
4.3.2 Etapa <i>In vitro</i>.....	19
4.4 Manejo dos animais.....	20
4.5 Inóculo de <i>Borrelia anserina</i>.....	22
4.6 Redução do Patógeno (riboflavina associada à luz ultravioleta).....	24
4.7 Delineamento experimental.....	26
4.7.1 Etapa <i>In vivo</i>.....	26
4.7.2 Etapa <i>In vitro</i>.....	27

4.8 Avaliação das amostras e exames.....	29
4.8.1 Etapa <i>In vivo</i>.....	29
4.8.1.1 Exame clínico.....	29
4.8.1.2 Bioquímica sérica.....	30
4.8.1.3 Volume Globular e Proteína Total.....	31
4.8.1.4 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	33
4.8.1.5 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (PCR).....	34
4.8.1.6 Espiroquetemia em campo escuro.....	43
4.8.1.7 Espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado.....	43
4.8.1.8 Ensaio de imunoadsorção Enzimático (ELISA indireto).....	44
4.8.2 Etapa <i>In vitro</i>.....	45
4.8.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR).....	45
4.8.2.2. Espiroquetemia em campo escuro.....	48
4.9 Análise dos Resultados.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Etapa <i>In vivo</i>.....	50
5.1.1 Exame clínico.....	50
5.1.2 Bioquímica sérica.....	53
5.1.3 Volume globular e proteína plasmática total.....	59
5.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR).....	62
5.1.5 Espiroquetemia em campo escuro.....	63
5.1.6 Espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado.....	65

5.1.7 Ensaio de imunoadsorção Enzimático (ELISA indireto).....	67
5.1.8 Imunofluorescência indireta (RIFI).....	68
5.1.9 Mortalidade dos animais.....	68
5.2 Etapa <i>In vitro</i>.....	69
5.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR).....	69
5.2.2 Espiroquetemia em campo escuro.....	70
5.3 Considerações finais.....	71
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS	90
TRABALHO CIENTÍFICO.....	96
ANEXOS.....	126

DABUS, D. M. M. **Inativação da *Borrelia anserina* pela ação da luz ultravioleta associada à riboflavina em soro sanguíneo de *Gallus gallus domesticus***. Botucatu, 2015. 178p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A borreliose aviária é uma doença septicêmica aguda, causada pela espiroqueta *Borrelia anserina*, atualmente apresenta baixa incidência, porém devido ao crescimento das criações orgânicas e rústicas, maior preocupação com o bem estar animal e a diminuição do uso de antibióticos em rações, existe a preocupação com o surgimento de surtos da doença, que poderão causar prejuízos econômicos. Desta maneira, torna-se de fundamental importância a busca por terapias alternativas, entre elas, a terapia fotodinâmica, como a associação da luz ultravioleta (UV) e riboflavina, com o objetivo de controlar a enfermidade. Este estudo objetivou verificar a eficácia do tratamento com luz UV e riboflavina para inativar ou eliminar a *B. anserina* no soro de galinhas poedeiras, por meio de exames diagnósticos e laboratoriais, e verificar a resposta imunológica do hospedeiro. O experimento foi conduzido em duas etapas, a etapa *in vivo* foi formada por 42 galinhas, divididas em sete grupos, composto por seis aves: Grupo 1 (saúde); Grupo 2 (doença) inoculadas com soro parasitado por *B. anserina*; Grupo 3 (imunossupressor) que receberam metilprednisolona; Grupo 4 (luz UV) que receberam soro parasitado tratado com luz UV; Grupo 5 (riboflavina) que receberam soro parasitado tratado com riboflavina; Grupo 6 (grupo veículo) que receberam soro parasitado tratado com cloreto de sódio 0,9%; Grupo 7 (tratado) que receberam soro positivo para *B. anserina* tratado com luz ultravioleta associada à riboflavina. A etapa *in vitro*, foi realizada com placas de cultivo celular, divididas igualmente à etapa *in vivo*. Foi possível observar que o tratamento não apresentou resultado esperado na inativação ou completa eliminação do agente. No entanto, uma ave do grupo tratado sobreviveu e apresentou recuperação clínica e laboratorial, apresentando espiroquetemia no Momento 11 e qPCR positivo no momento 10.

Palavras-chave: Borreliose aviária, galinhas, terapia fotodinâmica.

DANIELA, D. M. M. **Inactivation of *Borrelia anserina* by the action of ultraviolet light associated with riboflavin in blood serum of *Gallus gallus domesticus***. Botucatu, 2015. 178p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Avian borreliosis is an acute septicemic disease caused by the spirochete *Borrelia anserina*, has a low incidence, however due to the growth of organic and rustic creations, greater concern for animal welfare and reducing the use of antibiotics in feed, there is concern about the emergence of disease outbreaks, which may cause economic losses. Thus, it becomes fundamental to search for alternative therapies, including, photodynamic therapy, such as the combination of ultraviolet (UV) light and riboflavin with the aim of controlling the disease. This study aimed to investigate the efficacy of treatment with riboflavin and UV light to inactivate or eliminate *B. anserina* from serum laying hens by diagnostic and laboratory tests and to check to the host immune response. The experiment was conducted in two stages. The first one was the *in vivo* step composed of 42 chickens, divided into seven groups of six birds: Group 1 (health); Group 2 (disease) inoculated with the serum parasitized by *Borrelia anserina*; Group 3 (immunosuppressant) receiving methylprednisolone; Group 4 (UV light) which received parasitized saline treated with UV light; Group 5 (riboflavin) which received parasitized serum treated with riboflavin; Group 6 (solvent group) parasitized receiving saline treated with 0.9% sodium chloride; Group 7 (treated) which received positive serum for *B. anserina* treated with ultraviolet light associated with riboflavin. The second one was the *in vitro* stage performed with cell culture plates, equally divided *in vivo* step. It was observed that the treatment did not show expected results in the inactivation or complete elimination of the agent. However, one bird from the treated group survived and showed clinical and laboratory recovery, presenting spirochetemia at the time 11 and qPCR positive at the time 10.

Keywords: Avian borreliosis, chickens, photodynamic therapy.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A *Borrelia anserina* (*B. anserina*) é o agente etiológico da borreliose aviária, uma doença septicêmica aguda, (Sakhraroff, 1891), que pode acometer diversas espécies de aves (WALKER, et al., 1989). Foi descrita pela primeira vez por Sakhraroff no Cáucaso, em 1891. No Brasil por Marchoux e Salimbeni, em 1903.

Os sinais clínicos da doença são severos, como diarreia e perda de peso, podendo evoluir para a morte (LISBOA et al., 2008), estes sinais podem levar a prejuízos econômicos para criadores. O tratamento baseia-se no uso de antibióticos (SOARES, et al., 2000).

A avicultura industrial está em mudança, devido à preocupação com o bem estar animal e a qualidade dos produtos gerados por eles, levando a um grande aumento em criações rústicas e orgânicas e a criação de animais ao ar livre, principalmente para produção de ovos. Desta forma, a possibilidade de ocorrer novos surtos de borreliose aviária é alta, devido à maior susceptibilidade as infestações por argasídeos nestes sistemas de criação (ATALIBA et al., 2008).

Devido ao questionamento do uso de antibióticos em animais de produção, bem como a possibilidade de resistência microbiana, terapias alternativas têm sido alvo para pesquisas, dentre elas destaca-se a terapia fotodinâmica. A associação da luz ultravioleta (UV) com riboflavina é eficiente na inativação de diversos agentes patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários, sem causar danos ao organismo, pois não produz subprodutos tóxicos que causariam lesões aos componentes sanguíneos e não induz a efeitos colaterais. Desta forma, preservam a atividade e a funcionalidade do sangue (CORBIN, 2002).

O estudo da borreliose aviária apresenta evolução lenta, tendo em vista o impacto econômico que surtos da doença podem representar. A medicina de aves está evoluindo, juntamente com o avanço na avicultura industrial para produção de carne e ovos. Além da maior preocupação com bem estar animal e o aumento de criações de animais orgânicos e de forma rústica. Esse desenvolvimento tem levado a necessidade de um maior conhecimento sobre a doença, a fim de evitar um impacto econômico grave. Por isso o objetivo do

estudo foi propor uma nova terapia, a terapia fotodinâmica, para ser utilizada no controle e tratamento da doença, objetivando avaliar se o sangue parasitado com *Borrelia anserina* após tratamento com luz ultravioleta associada à riboflavina, quando inoculado em aves, foi capaz de provocar a enfermidade e, quando inoculado em meio BSK-H foi capaz de crescer, além de verificar a resposta imunológica e concentração de IgY das galinhas parasitadas e não parasitadas por *Borrelia anserina* após terapia fotodinâmica.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Borrelioses

As borrelioses são doenças causadas por espiroquetas do gênero *Borrelia*, e são classificadas como enfermidades infecciosas (SOARES, et al., 2000). Acometem os animais vertebrados e são transmitidas por artrópodes hematófagos, como piolhos e carrapatos (HUMAIR, 2002). Esta bactéria pertence ao Reino Procaryote, Classe Spirochaetes, Ordem Spirochaetales, Família Spirochaetaceae, Gênero *Borrelia* e Espécie *Borrelia anserina* (BARBOUR e HAYES, 1986).

A descrição do gênero *Borrelia* Swellengrebel, 1907, foi assim denominado em homenagem a Amédée Borrel. Os patógenos deste grupo possuem formato helicoidal com 3 a 10 espiras, medindo de 0,2 a 0,5 mm por 3 a 30 mm. Estes agentes possuem um protoplasma cilíndrico, envolvido pela membrana celular, de onde partem os flagelos, e outra membrana com diversas proteínas de superfícies. São classificadas como bactérias gram negativas (KRIEG e HOLT, 1984; BARBOUR E HAYES, 1986).

Atualmente cinco enfermidades são causadas por espiroquetas do gênero *Borrelia* Swellengrebel, 1907, como: - a febre recorrente, causada pela *Borrelia recurrentis* e transmitida ao homem por carrapatos do gênero *Ornithodoros* e piolhos do gênero *Pediculus*; - a borreliose bovina que acomete bovinos e ovinos, transmitida por carrapatos ixodídeos, principalmente o *Rhipicephalus Boophilus microplus*, cujo agente etiológico é a *B. theileri*; - o aborto epizootico bovino, causado pela *B. coriácea* e transmitida pelo *Ornithodoros coriaceus*; - a borreliose aviária, que acomete aves, causada pela espiroqueta *B. anserina*, transmitida por carrapatos do gênero *Argas* (SOARES et al., 2002; SANTOS et al., 2010); - a borreliose de Lyme ou doença de Lyme, causada por diferentes espécies do complexo *B. burgdorferi* Sensu lato, transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* e *Amblyomma* (SOARES et al., 2002; JUNIOR, et al, 2007; SANTOS et al., 2010).

De acordo com Humair (2002), as aves são importantes contribuintes para a disseminação de outras espécies de *Borrelia*, pois podem servir como

hospedeiro como, por exemplo, a *B. burgdorferi*. As aves migratórias podem contribuir ainda com a propagação de carrapatos infectados.

2.2 Borreliose aviária

A borreliose aviária foi descrita pela primeira vez por Sakhraroff, em 1891, enquanto estudava doença septicêmica aguda em gansos, no Cáucaso. É causada pela espiroqueta *Borrelia anserina* (*B. anserina*) (Figura 1) (Sakhraroff, 1891), (HUTYRA et. al., 1947; DIAB e SOLIMAN, 1977). No Brasil, Marchoux e Salimbeni em 1903, demonstraram que carrapatos do gênero *Argas* transmitiam o patógeno de galinhas enfermas para galinhas saudáveis, quando estudaram uma espiroqueta em criações rústicas de galinhas no Rio de Janeiro (HUTYRA et. al., 1947; DIAB e SOLIMAN, 1977).

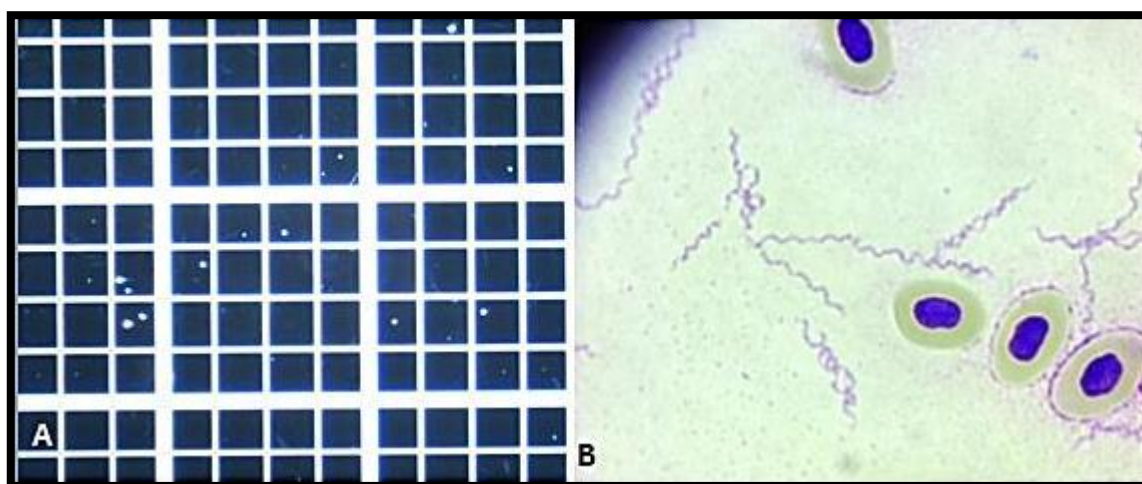


FIGURA 1. A. Fotomicrografia de *B. anserina* em microscópio de campo escuro utilizando câmara de Neubauer. Soro de galinha poedeira. 200x. **B.** Fotomicrografia de *B. anserina*. Esfregaço sanguíneo corado de galinha poedeira. Wright 400x. (Fonte: DABUS, 2015).

Os carrapatos do gênero *Argas* servem como hospedeiros naturais, onde a espiroqueta sobrevive por um longo tempo (DaMASSA e ADLER, 1979). Em grande parte dos países da Europa, a transmissão ocorre pelo carrapato *Argas persicus* e *A. reflexus*; na Austrália e África por *A. persicus* e nas Américas por *A. miniatus* (HUTYRA et. al., 1947).

Acomete diversas ordens de aves como os galiformes, anatídeos, passeriformes, columbiformes e algumas aves silvestres (QUINN et al., 1994).

Os hospedeiros naturais são galinhas, gansos, patos, perus, faisões e canários. A doença foi transmitida experimentalmente em corvos, pombos, perdizes, galinhas d'angola, cotovias, pardais e foi constatado que pombos e galinhas d'angola são resistentes à infecção (McNEIL et al., 1949).

O período de incubação dura de três a oito dias quando o agente é adquirido por meio da inoculação realizada pelo carrapato (HUTYRA et al., 1947; McNEIL et al., 1949). Quando a infecção ocorre experimentalmente por inoculação de sangue (contendo citrato de sódio) parasitado por *B. anserina* por via intramuscular ou intravenosa (SHOMMEIN e KHOGALI, 1974) ou por meio da inoculação de soro infectado criopreservado com DMSO a 10% o período pré-patente é de dois dias (LABRUNA et al., 1999).

O ciclo da *B. anserina* se realiza quando os carrapatos sugam aves infectadas com borreliose aviária, e então, as espiroquetas atravessam a parede do intestino e chegam ao celoma, podendo ser encontradas após três dias no líquido coxal. Em virtude da multiplicação dessas espiroquetas, após 14 dias podem ser encontradas em todo o organismo do carrapato, em especial nas glândulas salivares e nos tubos de Malpighi. Portanto, nesta fase, esses argasídeos são transmissores e inoculam as espiroquetas nas aves por meio do líquido coxal e saliva. Em aproximadamente 14 dias, essas aves que foram sugadas manifestam a doença (BIER, 1985).

Nas aves as espiroquetas multiplicam-se primeiramente no fígado, baço e medula óssea. Após quatro a seis dias encontram-se na circulação sanguínea, onde multiplicam-se de maneira intensa, assim produzem substâncias tóxicas, que podem causar febre e perivasculite nos órgãos do hospedeiro (HUTYRA, 1947).

A doença manifesta-se por polidipsia inicial, sonolência, diarreia verde escura, evoluindo para cianose com hipotermia, podendo evoluir para transtornos paralíticos e morte (LISBÔA et al., 2008). É caracterizada por esplenomegalia, hepatomegalia (RIVETZ et al., 1977; LISBÔA et al., 2008), renomegalia (RIVETZ et al., 1977), e fígado com aspecto reticulado intercalando estrias brancas e vermelho-escuras (fígado de noz-moscada) (GAVA, et al., 2001; LISBÔA et al., 2008).

LISBÔA et al., (2008), em estudo sobre alteração nos parâmetros hematológicos de galinhas infectadas experimentalmente com *Borrelia*

anserina, verificaram a presença de espiroquetas no esfregaço sanguíneo, e após oito dias, que foi o pico da parasitemia, apresentaram declínio dos valores hematológicos e apresentaram hiperproteinemia.

Shommein e Kogali (1974) em estudo com infecção experimental de *B. anserina* em galinhas observaram redução de hemoglobina e de eritrócitos, e aparecimento de espiroquetas na circulação após 24 horas da inoculação.

Hutyra (1947) sugere que a redução nos valores de hematologia é devido à multiplicação das espiroquetas na circulação sanguínea, acompanhada de leucocitose. Inicialmente ocorre heterofilia, junto com o aparecimento de espiroquetas na circulação, este quadro se mantém até o pico de espiroquetemia, onde a heterofilia é substituída por monocitose. Quando as aves estão em fase de cura clínica ocorre predomínio de linfócitos na circulação.

Rivetz, et al., (1977), em estudo realizado com galinhas inoculadas com sangue parasitado com *Borrelia anserina*, observaram que a glicose se manteve normal, houve aumento de proteína total, globulina, ácido úrico e Aspartato transaminase (AST) e diminuição de albumina, lipídeos totais, colesterol e fosfatase alcalina.

Cepeda (2015), em estudo realizado em galinhas inoculadas experimentalmente com *B. anserina*, observaram aumento de Alanina aminotransferase (ALT) após 12 dias de infecção, valores que se normalizaram após 24 dias de infecção, enquanto Vashist (2011) observou aumento de ALT após a terceira semana de infecção. Cepeda (2015) observou também elevação nos níveis séricos de colesterol nos animais infectados com soro parasitado com *B. anserina*.

Desde o seu primeiro relato, a doença foi descrita em diversas partes do mundo como na América do Norte, África do Sul, Índia, Síria, Palestina, Turquia, países dos Balcãs, a maior parte da Europa Continental, Rússia, Austrália, Java, Brasil e Argentina, sendo uma das principais causas de mortalidade em aves (McNEIL, 1949).

O diagnóstico pode ser realizado por meio de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa e visualização por microscopia de campo escuro (HUTYRA, et al., 1947). Podem ser feitos esfregaços a partir de fragmentos de tecidos do carrapato como intestino, glândula salivar e hemolinfa. A

imunofluorescência indireta em tecidos de carrapatos é utilizada para observar as espiroquetas, porém apresenta alto índice de reação cruzada e inespecífica. A técnica de imunofluorescência indireta no soro é utilizada por ser mais sensível e específica. A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, com bons resultados (SOARES et al., 2000). A imunoglobulina Y (referente a “yolk”) das aves correspondente a IgG dos mamíferos. É encontrada no soro em grande quantidade, representando 75% do total das imunoglobulinas (TIZARD, 2010), sendo assim, a dosagem imunoglobulina Y é um importante fator para avaliação da resposta imunológica em galinhas (SANTOS e SILVA, 2000).

O tratamento da borreliose é realizado com antibióticos. As tetraciclinas são eficazes, porém são restritas para animais adultos, além de ampicilina e amoxiciclina, porém a mais recomendada é a doxiciclina, devido à sua característica lipoproteica conferindo maior penetração ao tecido (SOARES et al., 2000). Em 1989, Walker et al., testaram a penicilina para tratamento da borreliose em perus e obtiveram bons resultados.

Aragão, em 1911, afirmou que a borreliose aviária é uma doença grave, que poderia ameaçar a criação de frangos, principalmente em locais onde as condições de higiene eram precárias. Após os surtos da década de 1980, passou-se a utilizar antibióticos nas rações, para melhorar o desempenho desses animais e diminuir a mortalidade. Entretanto, mais recentemente, no século XXI, o uso de antibióticos em animais de produção está sendo questionado, devido à resistência microbiana, por se tratarem de medicamentos utilizados na medicina humana (LISBÔA, 2006). Além desse questionamento, o aumento de criações rústicas e orgânicas, sistema ao ar livre, principalmente para produção de ovos, maior preocupação com o bem estar animal, existe a possibilidade de novo surtos da doença, podendo causar um impacto na avicultura, devido a maior susceptibilidade a infestações por argasídeos (ATALIBA, et al., 2006).

Devido ao aumento nas produções orgânicas, estudos sobre a borreliose e formas de inativação do patógeno tornam-se necessárias para que se possa tornar este tipo de sistema viável. A busca atual por novas terapias contra infecções bacterianas é essencial, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, que deram origem a espécies de bactérias resistentes. Então como uma

terapia alternativa ao uso de antibióticos, sugere-se a terapia fotodinâmica (PERUSSI, 2007).

2.3 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica consiste na administração de um agente fotossensibilizante, pelas vias sistêmica, tópica ou por injeção intratumoral, seguida de um período de 1-72 horas dependendo da farmacocinética do agente, para que ocorra seu acúmulo nas células alvo. As lesões são expostas à luz no comprimento de onda de absorção máxima do agente fotossensibilizador (ARAÚJO, 2010).

A aplicabilidade dessa técnica foi demonstrada em bactérias, vírus e protozoários bem antes da Segunda Guerra Mundial, mas foi abandonada devido à popularização das sulfonamidas e da penicilina (PERUSSI, 2007). Há relatos de que a fototerapia iniciou-se com os egípcios há mais de 4.000 anos, por meio da ingestão de plantas e exposição à luz solar, para tratar doenças de pele como o vitiligo (SIMPLÍCIO, 2002).

Os primeiros relatos ocorreram com os experimentos de Raab em 1900, onde foi descrito uma ação letal do corante acridina junto com a luz de relâmpagos sobre paramécios, onde ele afirmou que era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, fato semelhante ao que ocorre no processo de fotossíntese. A utilização da luz juntamente com o corante foi altamente citotóxica (YAMADA-JÚNIOR, 2007).

Após esse relato, em 1903 Tappeiner e Jesionek empregaram eosina como fotossensibilizador para tratamento de tumores, e obtiveram resultados positivos, porém a técnica não sofreu continuidade. Em 1924, Policard observou que porfirinas podiam ser encontradas em altas concentrações em tumores malignos, e que na presença da luz e oxigênio elas tornam-se altamente tóxicas a esse tecido. No final dos anos 60, Lipson reportou um tratamento bem sucedido ao tratar câncer de mama empregando derivados de hematoporfirina e irradiação seletiva do tumor com luz visível. Ao final dos anos 70, a partir de trabalhos de Dougherty e colaboradores, a terapia fotodinâmica passou a ser reconhecida como terapia alternativa para tratamento de câncer, foi empregada com sucesso em tratamento de tumores (MACHADO, 2000).

O retorno da aplicação antimicrobiana de fotossensibilizadores na última década foi resultado de dois fatores: a disseminação da AIDS devido ao HIV e o crescimento das infecções hospitalares devido às bactérias resistentes aos fármacos. A evolução microbiana é muito mais rápida do que a do homem, e o que tem ocorrido recentemente nos hospitais é decorrente do princípio de sobrevivência dos mais adaptados. As bactérias patogênicas, que em pequena porcentagem são naturalmente resistentes a fármacos (tais como penicilinas), logo se tornam a população dominante. Os fotossensibilizadores (FSs) agem via produção de oxigênio singlete, que é o oxigênio citotóxico, e leva à morte celular ou do parasita. Deste modo, não existe resistência microbiana natural, assim, não importa se a cepa é resistente a uma ou várias classes de agentes antibacterianos, como por exemplo, o *Staphylococcus aureus* que é resistente à meticilina, dado que o FS é capturado pelo agente (PERUSSI, 2007).

2.3.1 Associação da luz ultravioleta associada à riboflavina

A riboflavina ou vitamina B2 foi isolada pela primeira vez pelo químico inglês Alexander Wynter Blyth, em 1879. É de fundamental importância no organismo dos animais aeróbios. É necessária para o metabolismo dos lipídeos e na degradação de drogas e outros compostos químicos. Contribui para a inibição do estresse oxidativo, por meio de sua dupla habilidade em produzir superóxido e, ao mesmo tempo, pode estar envolvida na redução de hidroperóxidos (SOUZA, et al., 2005); além disso apresenta baixa toxicidade e por ser uma molécula altamente solúvel penetra rapidamente na célula (WENDEL, 2002), realizando a intercalação e a oxidação do DNA e RNA na presença de radiação ultravioleta (UV) (CORBIN, 2002; CALLAHAN et al., 2008).

A utilização da riboflavina em associação com a luz UV tem se mostrado eficaz na inativação de uma grande variedade de patógenos como: bactérias Gram positivas (*Staphylococcus epidermitis*), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*), o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus Pseudorábico, vírus do Nilo ocidental, Parvovírus, e contra alguns protozoários, sem alterar os componentes do sangue por meio de subprodutos tóxicos, ou que induzam efeitos colaterais adversos, preservando a atividade e a função

dos componentes sanguíneos (CORBIN, 2002; KLEIN, 2005; CARDO et al., 2006; CARDO et al., 2007; CALLAHAN et al., 2008). Sendo assim, trata-se de um agente fotossensibilizador útil para a inativação de patógenos encontrados no sangue (CORBIN, 2002).

Em estudo realizado com *Anaplasma marginale* foi possível observar que o tratamento com riboflavina associada à radiação ultravioleta provocou imediata redução da carga parasitária, com testes de diagnósticos sorológicos negativos, sugerindo a inativação do patógeno após inoculação em animais susceptíveis e não desenvolvimento da enfermidade (LOPES, 2011).

De acordo com Sacco (2013), em experimento utilizando hamsters inoculados com *Leishmania infantum chagasi*, observou-se que o tratamento utilizando associação de riboflavina e luz ultravioleta produziu diminuição da carga parasitária e o não aparecimento de sinais clínicos da doença.

Objetivos

3. OBJETIVOS

- Avaliar se o tratamento do sangue parasitado com *Borrelia anserina* após terapia fotodinâmica, utilizando luz ultravioleta associada à riboflavina, quando inoculado em aves, foi capaz de provocar a enfermidade.
- Avaliar se tratamento do sangue parasitado com *Borrelia anserina* após terapia fotodinâmica utilizando luz ultravioleta associada à riboflavina, quando inoculado em meio BSK-H foi capaz de crescer.
- Avaliar a resposta imunológica e concentração de IgY das galinhas parasitadas e não parasitadas por *Borrelia anserina* após terapia fotodinâmica.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Clínico Veterinário “Profª Drª Aguemi Kohayagawa” da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho” - FMVZ/UNESP, *Campus* Botucatu - SP.

A terapia fotodinâmica foi realizada em parceria com o “Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, e Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina” da Universidade de São Paulo - FFCLRP, *Campus* da USP de Ribeirão Preto – SP.

A etapa experimental utilizando cultivo *in vitro* e a etapa utilizando animais foram realizadas em conjunto entre a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Instituto de Veterinária, Rio de Janeiro – RJ e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho” - FMVZ/UNESP, *Campus* Botucatu - SP.

4.2 Animais experimentais

Foram selecionadas 42 galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Novagen, provenientes de uma Granja industrial de produção de ovos (Granja Moretto) (Figura 2), vacinadas de acordo com o calendário sanitário da empresa (Quadro 1), com aproximadamente 900 dias de idade. Os animais foram divididos em sete grupos experimentais, cada grupo formado por seis galinhas.

As galinhas passaram por período de adaptação de sete dias e após esse período foram realizados exames laboratoriais e de diagnóstico

Foram selecionados sete frangos (*Gallus gallus domesticus*) com aproximadamente 40 dias de idade, que serviram como doadores de soro parasitado, para posterior inoculação dos grupos experimentais (Figura 3).



FIGURA 2. Estrutura da produção de ovos. Granja Moretto. (Fonte: DABUS, 2015).



FIGURA 3. Frangos doadores de soro parasitado. (Fonte: DABUS, 2015).

QUADRO 1. Calendário sanitário empregado no manejo de criação das aves (provenientes) da Granja Moretto. Fonte Granja Moretto, 2015.

Idade (dias)	Vacinas, medicamentos e via de administração
0	Bouba suave + Cryomarex (marek rispens) + Vaxxitek (hvt+gumboro) + Vacina de pneumovirose (via spray)
1	Recebimento do lote
7	new-b1 + Debicagem+massi (vacina ocular)
10	Sulfato de cobre 500g/1.000kg por 05 dias
21	Polvac e.coli (viaspray)
27	New-ls+massi (via água) + Polvac bursa f (via água)
28	Vacina de pneumovirose (via spray)
35	Muda para recria
42	S. gallinarum 9r + Mg-bac + Coriza gel (i.peito)
49	Sulf. De cobre 500 grs p/ton 5 dias
50	Vacina de pneumovirose (via spray)
65	Enro + verm.mebendazol + Poxine-ae (via m. Asa) + New-ls+massi (via spray)
70	Redebicagem + unimix anti stress na ração 1kg p/ton
77	Sulf. De cobre 500 grs p/ton 5 dias
84	Polvac e.coli (viaspray)
90	Vermif. Mebendazol 500gr p/ton 5 dias
105	S.gallinarum 9r + Polvac mix-6 oleo
112	Mudança para produção
180	Nc - ls + massi (via spray)
270	Nc - ls + massi (via spray)
360	Nc - ls + massi (via spray)
450	Nc - ls + massi (via spray)
504	Nc + ibd oleósa (i.m.peito)
540	Nc - ls+ massi (via spray)
630	Nc - ls+ massi (via spray)
720	Nc - ls+ massi (via spray)
770	Venda do lote

4.3 Grupos experimentais

Foram formados catorze grupos experimentais, sendo sete grupos experimentais utilizando animais denominada de etapa *In vivo* e, sete grupos experimentais utilizando placas de cultivo celular, denominado de etapa *In vitro*.

4.3.1 Etapa *In vivo*

Os animais foram divididos em: Grupo 1 (grupo saúde), formado por aves que não foram expostas a nenhum tratamento ou inoculação; Grupo 2 (grupo doença) formado por galinhas positivas para borreliose aviária; Grupo 3 (grupo imunossupressor) formado por aves que receberam somente o Depo medrol®; Grupo 4 (grupo luz), aves que receberam soro parasitado tratado por luz ultravioleta; Grupo 5 (grupo riboflavina), aves que receberam soro parasitado tratado com riboflavina; Grupo 6 (grupo veículo), aves que receberam soro parasitado tratado com cloreto de sódio a 0,9%; Grupo 7 (grupo tratado), que receberam cepa de *B. anserina* tratada por luz ultravioleta associada à riboflavina.

4.3.2 Etapa *In vitro*

Para a inoculação em placas de cultivo celular, sete grupos foram formados: o Grupo 8 (grupo saúde placa) recebeu soro proveniente de animais saudáveis, sem doença. O Grupo 9 (grupo doença placa) recebeu sangue proveniente de animais infectados com *B. anserina*. O grupo 10 (grupo imunossupressão placa) recebeu soro de animais saudáveis imunossuprimidos com Depo Medrol®; O Grupo 11 (grupo luz placa) recebeu soro infectado tratado com luz ultravioleta. O Grupo 12 (grupo riboflavina placa) recebeu soro infectado tratado com riboflavina diluída em cloreto de sódio 0,9%. O Grupo 13 (grupo veículo placa) recebeu soro proveniente infectado tratado com cloreto de sódio a 0,9%. O Grupo 14 (grupo tratamento placa) recebeu soro infectado tratado com a associação de luz ultravioleta e riboflavina.

4.4 Manejo dos animais

Os animais foram alojados em gaiolas, em ambiente telado e ventilado (Figura 4), receberam água *ad libitum* e ração elaborada pelo Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp – Botucatu, com suplemento mineral-vitamínico isento de coccidiostático e sem promotor de crescimento.



FIGURA 4. A. Tela de proteção na porta do alojamento. B. Ambiente interno do alojamento dos animais. C. e D. Sistema automático de bebedouro. (FONTE: DABUS, 2015).

No momento zero (M0) as aves passaram por um período de sete dias para adaptação.

Imediatamente após o período de adaptação de sete dias, no momento um (M1), foram realizados exame clínico segundo Feitosa (2008), cálculo de espiroquetemia de acordo com Shommein e Khogali (1974), avaliação por meio

de microscopia de campo escuro segundo Dhawedkar e Dhanesar (1983), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação em Cadeia da Polimerase (PCR), dosagem de imunoglobulina Y, análise bioquímica sérica de colesterol, triglicerídeos, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteína plasmática total e volume globular segundo Thrall (2007), das 42 galinhas poedeiras. As amostras foram colhidas por venopunção (veia ulnar e metatársica), com a adequada contenção física dos animais, de forma tranquila, sem manter os animais com a cabeça para baixo e imobilizando a região do tarso (pernas) e asas (Feitosa, 2008), e com antissepsia local, utilizando álcool iodado (Figura 5). Foi colhido 1,0 mL de sangue por meio de venopunção da veia ulnar, em tudo criogênico contendo EDTA 3%, para a realização do esfregaço sanguíneo, volume globular e proteína plasmática total. Para a realização da espiroquetemia em campo escuro foi colhido sangue por meio de punção da veia metatársica em seis tubos capilares (Figura 6). Para os exames sorológicos e de bioquímica sérica foi colhido 4,0 mL de sangue por meio de punção da veia ulnar em tubos contendo gel e ativador de coágulo, que foram centrifugados a 5000 rpm durante oito minutos. O soro foi separado e acondicionado em tubos criogênicos a -20°C.



FIGURA 5. A. Antissepsia utilizando álcool iodado. B. Coleta de sangue da veia ulnar. C. Coleta de sangue da veia metatársica. (Fonte: DABUS, 2015).



FIGURA 6. A. Antissepsia utilizando álcool iodado. B. Punção da veia metatársica. C. Coleta do sangue utilizando tubos capilares. (FONTE: DABUS, 2015)

4.5 Inóculo de *Borrelia anserina*

O inóculo de *Borrelia anserina* foi obtido a partir da cepa de *B. anserina* PL proveniente do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Rio de Janeiro – RJ, cedida gentilmente pelo Professor Doutor Adivaldo Henrique da Fonseca.

Foi inoculado 0,5 ml da cepa de *B. anserina* em um frango (*Gallus gallus domesticus*) de aproximadamente 40 dias de vida, pesando aproximadamente 2,5 kg (Figura 7), para a replicação da cepa. Este animal foi acompanhado até atingir o pico de espiroquetemia, o que ocorreu no quinto dia após a inoculação, quando foi realizada a coleta de sangue, para obtenção do inóculo para as aves doadoras de soro parasitado. Foi coletado sangue por meio de venopunção da ulnar e metatársica, o qual foi acondicionado em tubos contendo gel ativador de coágulo. O animal foi adequadamente contido, por meio de contenção física. Foi realizada antissepsia local com iodo degermante, solução de digliconato de clorexidina degermante a 2% e álcool iodado. As penas do animal foram cobertas com um pano e a coleta foi realizada com um sistema a vácuo, utilizando escalpe vacutainer (Figura 8). A coleta foi realizada de maneira aséptica, a fim de evitar contaminação por outros patógenos. Para a obtenção do soro, o sangue foi centrifugado a 5000 rpm durante oito minutos e foi aliquoteado em capela de fluxo laminar com material estéril.

Antes de inocular o soro obtido, foi realizado pelo serviço de Ornitopatologia da FMVZ – Unesp – Botucatu, o cultivo em meio Brain heart infusion (BHI).

Após o cultivo resultar em negativo, foi inoculado 0,5 ml em seis frangos doadores de aproximadamente 3 kg e 40 dias, os animais foram acompanhados até o pico de espiroquetemia. Neste dia foi realizada coleta de sangue, procedendo da mesma maneira que no frango replicador da cepa. O soro proveniente desses animais resultou em um “pool” das amostras, que foi aliquotado em capela de fluxo laminar com material estéril e separados para cada grupo experimental.

A cepa da *B. anserina* inoculada nos grupos experimentais obteve concentração de 440.000 espiroquetas/ml. A contagem foi realizada em camara de Neubauer, utilizando microscópio de campo escuro (Nikon E200®), de acordo com Dhawedkar e Dhanesar (1983).



FIGURA 7. A. Pesagem do frango doador. **B.** Inóculo de *B. anserina* (FONTE: DABUS, 2015)

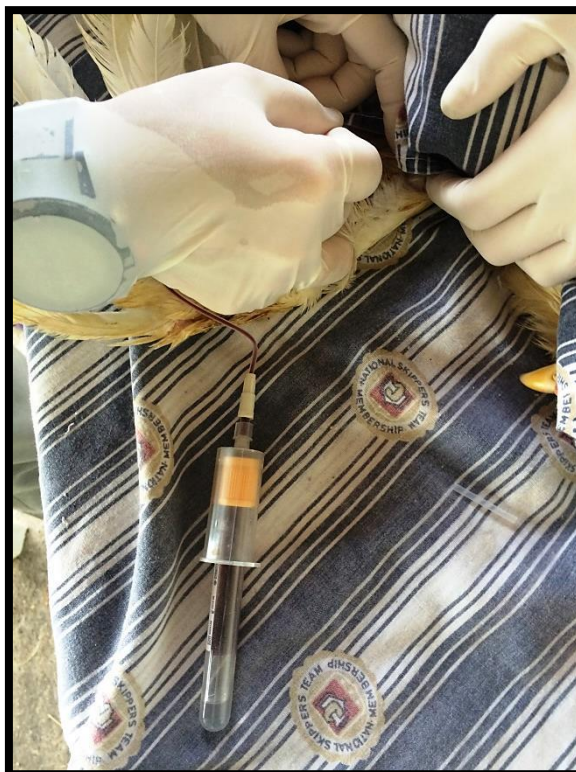


FIGURA 8. Coleta de sangue do frango doador utilizando sistema a vácuo (FONTE: DABUS, 2015).

4.6 Redução do Patógeno (riboflavina associada à luz ultravioleta)

A técnica de terapia fotodinâmica utilizada para tratamento do soro parasitado por *B. anserina* foi semelhante ao modelo preconizado por Rentas et al. (2007), Cardo et al. (2007), Lopes (2011) e Sacco (2013) modificado. O sistema usado para a irradiação atuou no comprimento de onda na faixa 365 nm. O dispositivo usado neste estudo foi o equipamento DNA Wokstation (Loccus Biotechnology®), com sistema de luz contínua, em placas de cultivo celular de 12 poços (Figura 9), foram armazenados 3,6 mL da suspensão de *Borrelia anserina* a qual foi adicionada a um volume fixo da solução de riboflavina e cloreto de sódio a 0,9%. A irradiação foi aplicada de acordo com os grupos experimentais: os grupos 4 (grupo luz) e 11 (grupo luz placa) receberam somente a irradiação de luz UV; os grupos 7 (grupo tratado) e 14 (grupo tratado placa) receberam a irradiação com luz UV associada à riboflavina. Este material foi submetido a uma radiação unilateral de luz ultravioleta com dose de luz de 6.24 J/mL, agitado constantemente por 87 minutos (Figura 10). Todo o processo foi feito em fluxo laminar com material

estéril. Após os procedimentos de inativação as amostras foram inoculadas em aves imunossuprimidas e placas de cultivo celular contendo meio BSK-H para posterior avaliação conforme descrito na segunda etapa experimental.



FIGURA 9. Placa de cultivo celular de 12 poços. Grupo tratado placa. (FONTE: DABUS, 2015).



Figura 10. Processo de terapia fotodinâmica (FONTE: DABUS, 2015).

4.7 Delineamento experimental

O experimento foi dividido em momentos, os quais estão apresentados no Quadro 2.

QUADRO 2. Momentos do experimento

Momento 0	M0	Adaptação
Momento 1	M1	Exames de padrão normal das galinhas
Momento 2	M2	Imunossupressão dos animais
Momento 3	M3	Tratamento do soro (Terapia Fotodinâmica)
Momento 4	M4	Inoculação dos animais e placas experimentais
Momento 5	M5	Exames – dia 5 após inoculação
Momento 6	M6	Exames – dia 10 após inoculação
Momento 7	M7	Exames – dia 15 após inoculação
Momento 8	M8	Exames – dia 20 após inoculação
Momento 9	M9	Exames – dia 25 após inoculação
Momento 10	M10	Exames – dia 30 após inoculação
Momento 11	M11	Exames – dia 35 após inoculação
Momento 12	M12	Exames – dia 40 após inoculação
Momento 13	M13	Exames – dia 45 após inoculação

4.7.1 Etapa *In vivo*

No momento dois (M2), as aves do grupos experimentais 2 (grupo doença), 3 (grupo imunossupressor), 4 (grupo luz), 5 (grupo riboflavina), 6 (grupo veículo), e 7 (grupo tratado), foram submetidas à imunossupressão, utilizando 30 mg/kg de acetato de metilprednisolona (Depomedrol®), por via intramuscular, em dose única. No dia seguinte, momento três (M3), foi realizado o tratamento do sangue infectado por *B. anserina* utilizando luz ultravioleta associada à riboflavina.

Imediatamente após o tratamento (M3), no momento quatro (M4) foi realizada a inoculação das aves, por via intramuscular. O Grupo 1 (grupo

saúde) não foi submetido a nenhuma inoculação; O Grupo 2 (grupo doença) recebeu 0,25 mL de soro infectado por *B. anserina* não tratado; Grupo 3 (grupo imunossupressor) formado por animais que receberam somente o imunossupressor, na dose de 30 mg/kg (Depo medrol®); O Grupo 4 (grupo luz) recebeu 0,25 mL de soro infectado tratado com luz ultravioleta; O Grupo 5 (grupo riboflavina) que recebeu 0,25 mL de soro infectado tratado com riboflavina diluída em cloreto de sódio a 0,9%; O Grupo 6 (grupo veículo) recebeu 0,25 mL de soro infectado tratado com cloreto de sódio a 0,9%; O Grupo 7 (grupo tratamento) recebeu 0,25 mL de soro parasitado por *B. anserina*, tratado com luz ultravioleta associado à riboflavina (Figura 11).

As aves foram acompanhadas diariamente desde a inoculação, e durante 45 dias após inoculação, onde foi avaliado o estado clínico. A cada cinco dias foram coletadas amostras para a realização dos exames laboratoriais e de diagnóstico.

4.7.2 Etapa *In vitro*

Para a inoculação em meio de cultura, foi realizada avaliação da cepa de *B. anserina* por meio de microscopia de campo escuro para o diagnóstico de borreliose. Foi utilizado 0,25 mL da cepa parasitada por *B. anserina* em 1,25 mL de meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) com 6 % de soro de coelho, acondicionado em placas para cultivo celular de 12 poços. Todo o processo de inoculação foi feito em capela de fluxo laminar com material estéril.

O Grupo 8 (grupo saúde placa) recebeu soro proveniente de animais saudáveis, sem doença. O Grupo 9 (grupo doença placa) recebeu sangue proveniente de animais infectados com *B. anserina*. O grupo 10 (grupo imunossupressão placa) recebeu soro de animais saudáveis imunossuprimidos com Depo Medrol®; O Grupo 11 (grupo luz placa) recebeu soro infectado tratado com luz ultravioleta. O Grupo 12 (grupo riboflavina placa) recebeu soro infectado tratado com riboflavina diluída em cloreto de sódio 0,9%. O Grupo 13 (grupo veículo placa) recebeu soro proveniente infectado tratado com cloreto de sódio a 0,9%. O Grupo 14 (grupo tratamento placa) recebeu soro infectado tratado com a associação de luz ultravioleta e riboflavina (Figura 12).

Foi realizado acompanhamento, até o 45º dia após a inoculação, onde a cada cinco dias foram realizados exames diagnósticos (PCR e espiroquetemia em campo escuro) e 0,5 mL do meio de cultura foi repicado para um novo meio.



FIGURA 11. Inoculação de 0,25 ml de cepa parasitada tratada com terapia fotodinâmica. Ave do grupo tratado. (FONTE: DABUS, 2015)



FIGURA 12. Inoculação de 0,25 ml de soro parasitado tratado em meio de cultivo BSK-H. Placa do grupo tratado. (FONTE: DABUS, 2015)

4.8 Avaliações da amostras e exames

4.8.1 Etapa *In vivo*

4.8.1.1 Exame clínico

Os animais foram observados diariamente quanto ao estado geral dos animais e do ambiente, verificando a produção de ovos, ingestão de água, estado das fezes e penas. A cada cinco dias foi realizada pesagem das aves, utilizando balança eletrônica, aferição de temperatura utilizando termômetro de mercúrio, avaliação de mucosas, e inspeção dos animais, com adequada contenção física de forma tranquila, sem manter os animais com a cabeça para baixo e imobilizando a região do tarso (pernas) e asas (Feitosa, 2008) (Figura 13) .



FIGURA 13. **A.** Animais experimentais em estado de alerta. **B.** Produção de ovos dos animais experimentais. **C.** Crista do animal apresentando coloração normal (avermelhada). **D.** Aferição de temperatura utilizando termômetro de mercúrio. (FONTE: DABUS, 2015).

4.8.1.2 Bioquímica sérica

Após centrifugação do sangue total em laboratório, foi utilizado soro para realização dos exames de bioquímica sérica, onde foram dosadas Fosfatase alcalina (FA), Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina amonotransferase (ALT), Colesterol e Triglicerídeos. Os exames foram realizados em aparelho automático Cobas Mira Plus®, utilizando kits bioquímicos da Bioclin® (Figura 14).

Foram utilizados como intervalo de referência fisiológicos os dados do Sistema Internacional de Informação das Espécies (Conventional U.S.S Units – Outubro de 1999) para *Gallus gallus*, calculado para ambos os sexos e todas as idades combinadas, são valores de referência de amostras apresentadas

por 11 instituições e Campbell *in* Thrall et al., (2012). Os valores de referência utilizados estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Valores de referência de Fosfatase alcalina, Aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol e triglicerídeos. International Species Information System, Conventional U.S.A Units e Campbell *in* Thrall et al., (2012).

Exame	Unidade	Valor mínimo	Valor máximo
Fosfatase alcalina	UI/L	107	5030
Aspartato aminotranferase	UI/L	125	299
Alanina amonotranferase	UI/L	19	50
Colesterol	mg/dL	76	296
Triglicerídeos	mg/dL	57	2207



FIGURA 14. Aparelho de dosagem bioquímica automático Cobas Mira Plus®. (FONTE: DABUS, 2015).

4.8.1.3 Volume Globular e Proteína Total

Foi coletado sangue por meio de punção venosa e armazenado em criotubos contendo EDTA 3%. Para a realização do Volume Globular (VG) foi utilizada a técnica descrita por Lassen e Weiser *in* Thrall (2007), por meio do

exame de microhematócrito (Figura 15). Para a determinação da concentração de proteína plasmática total foi utilizada a técnica de refratometria (Figura 16) descrita por Lassen e Weiser *in* Thrall (2007).

Como intervalos de referência fisiológicos, foram utilizados os dados do Sistema Internacional de Informação das Espécies (Conventional U.S.A. Units – Outubro de 1999) e Campbell *in* Thrall et al., (2012). Os valores estão descritos na Tabela 2.

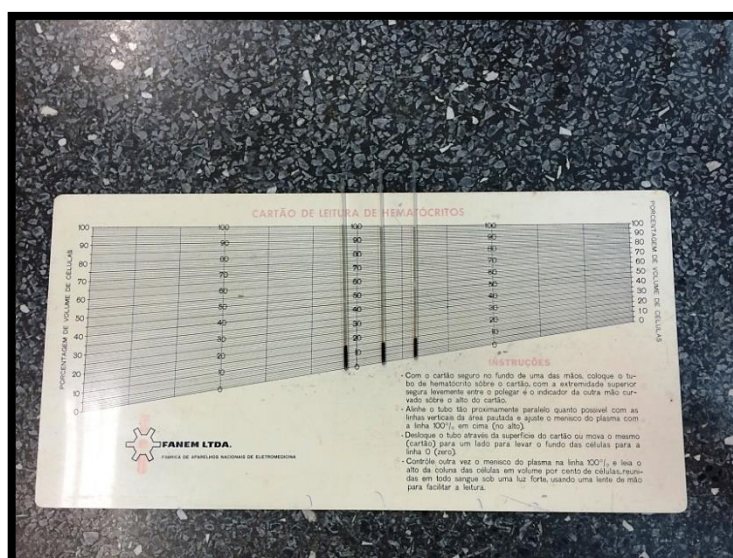


FIGURA 15. Técnica de microhematócrito.
(FONTE: DABUS, 2015).



FIGURA 16. Refratômetro utilizado para a realização da determinação da proteína plasmática total. Método de refratometria. (FONTE: DABUS, 2015).

TABELA 2. Valores de referência de Volume Globular (VG) e Proteína Plasmática Total (PPT). Sistema Internacional de Informação das Espécies (Conventional U.S.A. Units – Outubro de 1999) e Campbell *in* Thrall et al., (2012).

Exame	Unidade	Valor mínimo	Valor máximo
VG	%	25	48
PPT	g/dL	2,5	4,5

4.8.1.4 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Após centrifugação do sangue em laboratório, foi utilizado soro para realização da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). As amostras foram colhidas a cada cinco dias. O protocolo para a realização do exame foi semelhante à técnica descrita por Horta et al. (2004).

As lâminas com 12 poços contendo antígeno foram feitas a partir de amostras positivas para *B. anserina*, no Laboratório de Doenças Parasitárias – Cultivo de Células e de Hemoparasitos, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Estas lâminas estavam sob refrigeração a -20°C.

Após descongelamento das lâminas, em cada lâmina de RIFI foram realizados 12 testes, sendo um controle positivo (soro de animal positivo para *B. anserina*) e um controle negativo (soro de animal negativo para *B. anserina*).

Para cada teste, as amostras de soro foram diluídas em PBS (solução fosfato tamponada), na diluição de 1:32, e a seguir depositadas na lâmina contendo antígeno. Após incubação em estufa a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas em PBS e secas em temperatura ambiente. Foi adicionado conjugado anti-IgY com diluição de 1:40 em PBS, em cada lâmina. Durante 30 minutos foram incubadas em estufas a 37°C e ao abrigo de qualquer fonte de luz. As lâminas foram lavadas em PBS e secas em temperatura ambiente ao abrigo de luz (Figura 17).

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência. Foram considerados positivos os soros com títulos 1:32.

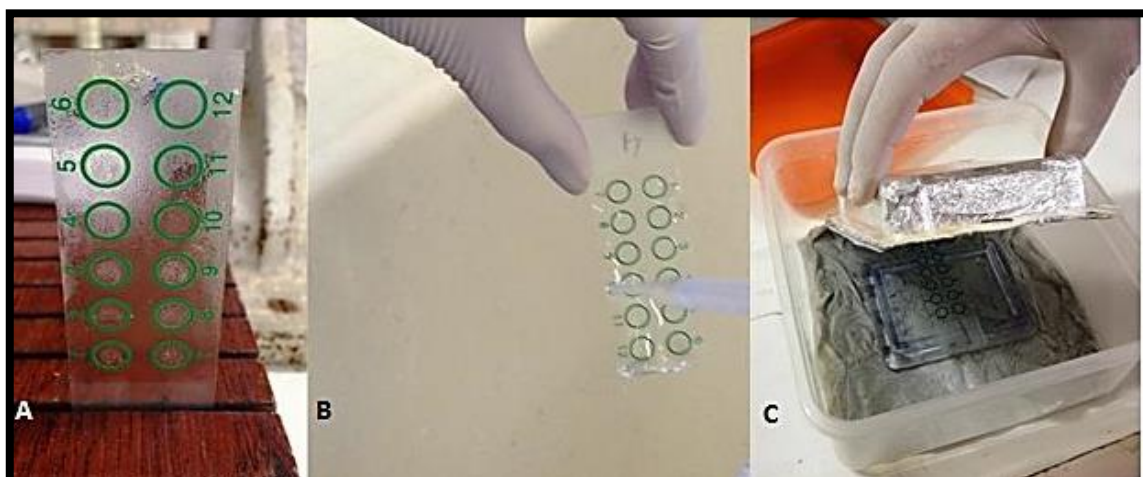


FIGURA 17. **A.** Lâmina de RIFl contendo antígeno específico para *B. anserina*. **B.** Lavagem da lâmina de RIFl utilizando PBS. **C.** Lâmina de RIFl ao abrigo da luz para incubação em estufa a 37°C. (FONTE: DABUS, 2015).

4.8.1.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foi utilizado sangue total para realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As amostras foram colhidas a cada cinco dias.

O DNA das amostras de sangue das galinhas foi extraído de 10 µL do sangue coletado, utilizando-se o Illustra Blood Mini Spin Kit. O DNA extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C, até o momento da realização das provas. Controles negativos (água nuclease free) foram adicionados a cada bateria de extração.

Como no momento da definição do protocolo a ser utilizado na qPCR não haviam trabalhos científicos utilizando essa técnica para serem utilizados os mesmos primers, foi necessário escolher novos primers utilizando o programa PrimerBLAST disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para tanto foram desenhados dois pares de primers. O primeiro par foi designado BorAns-rRNA F 5' TTCTCGGGCCTTGTACACAC 3' e BorAns-rRNA R 5' CTCCTCCCTTGCGGGTTAG 3'.

No resultado da análise "in silico" foi identificado que o mesmo amplificava fragmento de 84 bp de várias espécies de *Borrelia* (Anexo 2). O Tm ficou próximo dos 60°C.

Os primers não alinharam com outra bactéria e também não alinharam com a espécie de estudo *Gallus gallus domesticus*.

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 μ L, contendo 10 μ L de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 μ L DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 22). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting (Figura 18), utilizando o fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado o controle negativo (água nuclease free) em cada placa.

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10, foram observados os resultados demonstrados na Figura 19, que apesar da excelente eficiência de 98,61% e r^2 de 0,998, foi observado na amostra negativa uma amplificação inespecífica, com pico de melting coincidente com as da amostra padrão. Uma vez que essa amplificação poderia interferir na quantificação da bactéria nas amostras teste, esse conjunto de primers não mais foi utilizado.

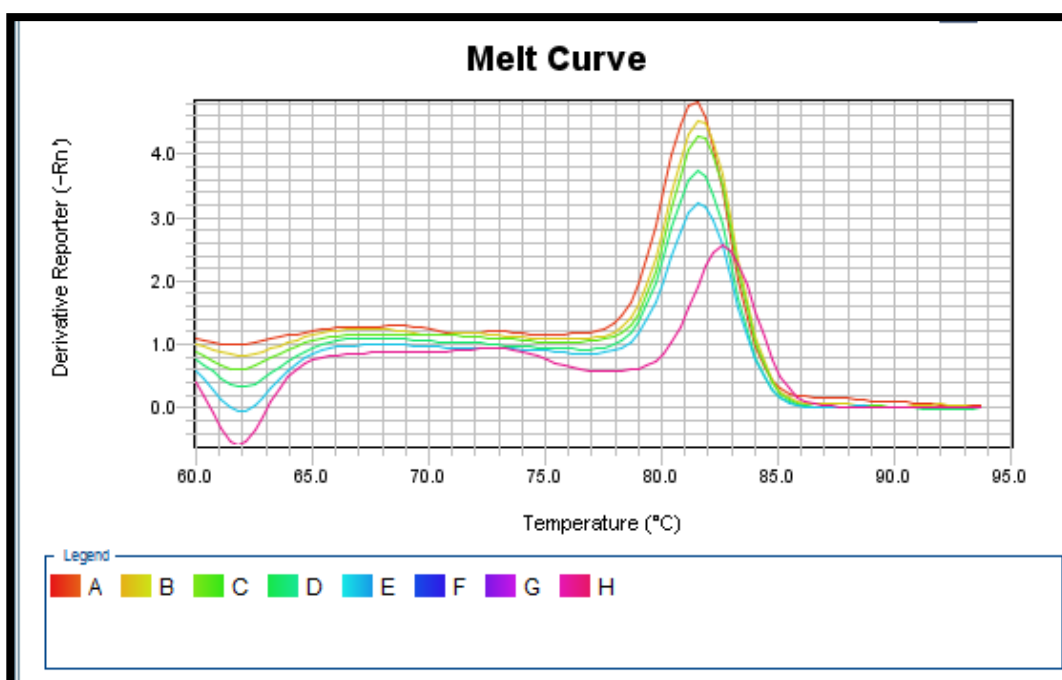


FIGURA 18. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para *Borrelia anserina* nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers *Borrelia anserina* rRNA.

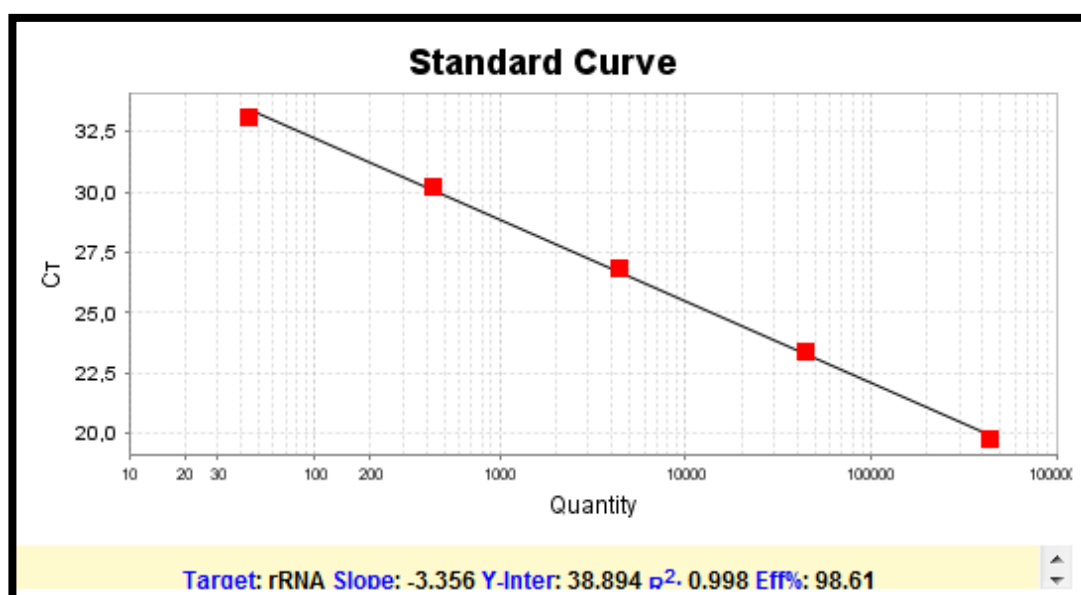


FIGURA 19. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para *Borrelia anserina* nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers *Borrelia anserina* rRNA gene.

Assim, dando prosseguimento à padronização da qPCR, o segundo par de primers testados foi BorAns-fla F 5' CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 3' e BorAns-fla R 5' ACACCCATACCAGCAGCATC 3'. As condições de reação

foram as mesmas do anterior. Foi testado, assim como o anterior, na análise *in silico* no PRIMER BLAST, e foi observado que esse conjunto reconhece apenas membros do gênero *Borrelia*.

No resultado da análise "in silico" foi identificado que o mesmo amplificava fragmento de 124 bp de várias espécies de *Borrelia* (Anexo 3). O Tm ficou próximo dos 60°C.

Os primers não alinharam com outra bactéria e também não alinharam com a espécie de estudo *Gallus gallus domesticus*.

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 µL, contendo 10µL de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 µL DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 22). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting com fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado em cada placa o controle negativo (água nuclease free).

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10 foram observados os resultados demonstrados na Figura 20 e Figura 21. Na análise dos resultados dessas reações utilizando esse conjunto de primers, foi observado uma eficiência um pouco menor, de 86,21% e r² de 1, entretanto, na análise da curva de melting (Figura 20) não foi observado amplificação da amostra negativa, sendo este conjunto de primers escolhido para a realização do exame.

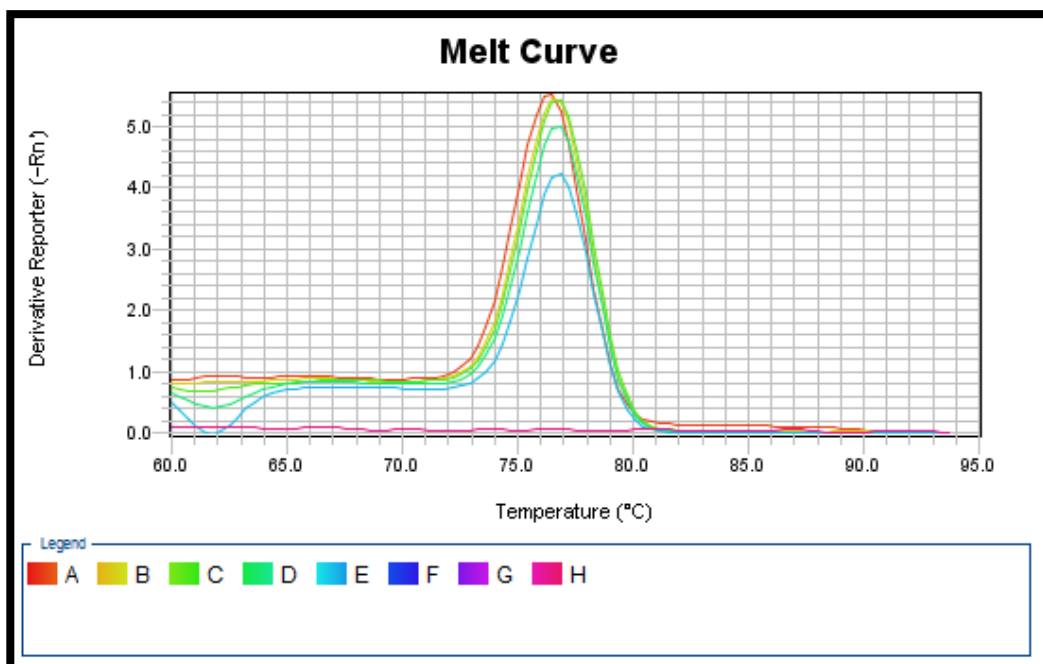


FIGURA 20. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para *Borrelia anserina* nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers *Borrelia anserina* fla gene.

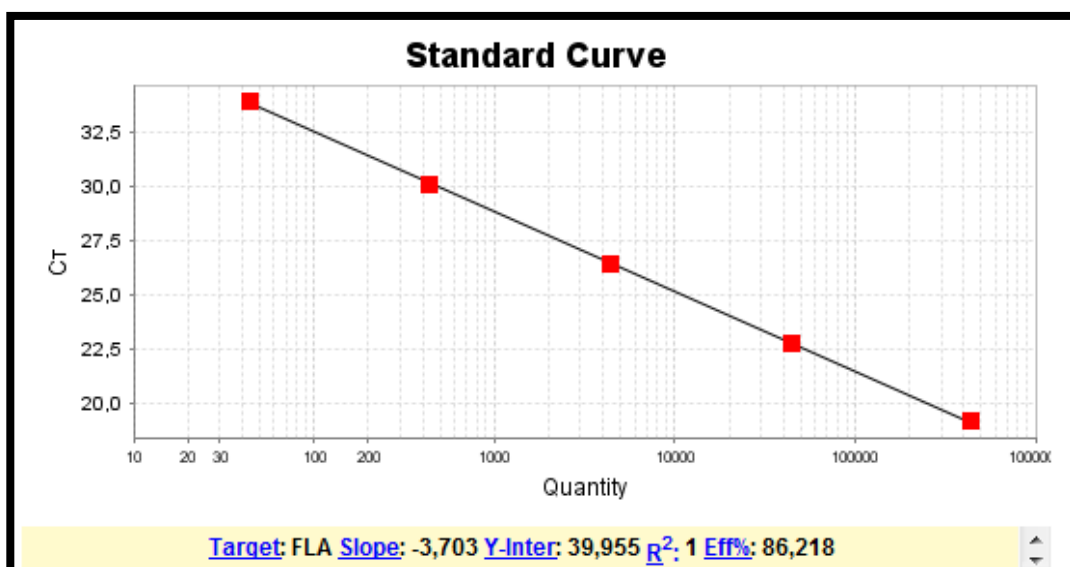


FIGURA 21. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para *Borrelia anserina* nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers *Borrelia anserina* fla gene.

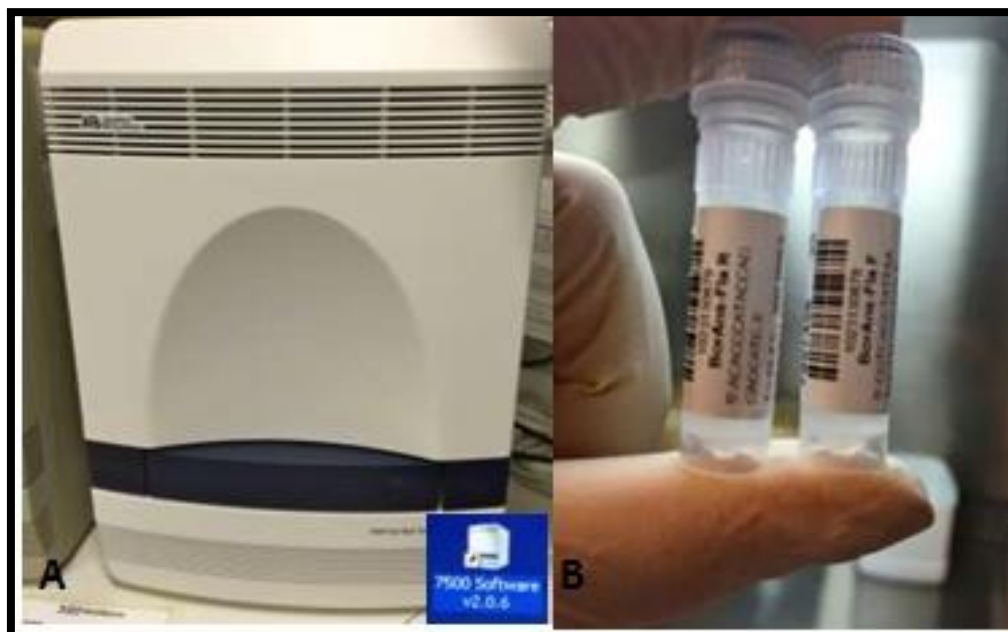


FIGURA 22. A. Equipamento 7500 Fast RealTime PCR (Applied Biosystems) **B.** Primers utilizados para as amplicações. (FONTE: DABUS, 2015).

Para controle interno das reações, foram testados dois pares de primers normalizadores, o primeiro foi o beta-actina F 5' ATGAAGCCCAGAGCAAAAGA 3' e beta-actina R 5' CTCCTCAGGGGCTACTCTCA 3' (Ninov, 2010).

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 μ L, contendo 10 μ L de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 μ L DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 22). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting (Figura 23), utilizando o fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado em cada placa o controle negativo (água nuclease free).

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10, foram observados os resultados demonstrados na Figura 23 e Figura 24, porém, apesar da excelente eficiência de 93, 08% e r^2 de 0,955, em uma

das amostras houve uma amplificação inespecífica, com pico de melting coincidente com as da amostra negativa, sendo assim esse conjunto de primers não foi utilizado para a normalização das amostras.

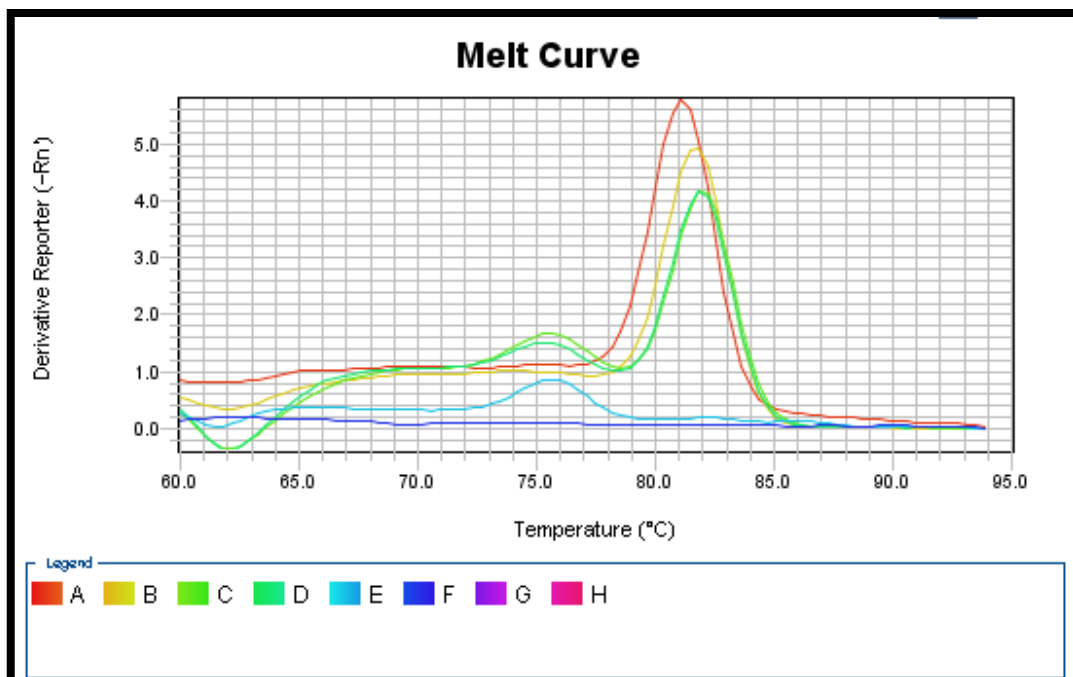


FIGURA 23. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers Beta-actina.

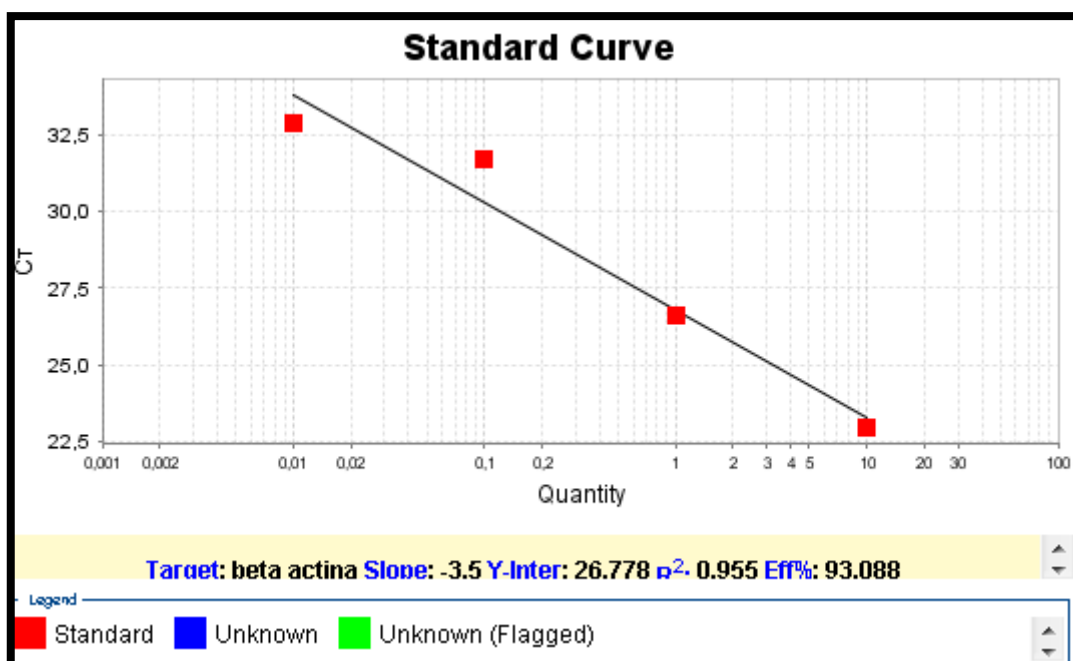


FIGURA 24. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers Beta-actina.

O segundo par de primers testado foi o GAPDH F 5' TGGAGAGATGGCAGAGGTG 3' e GAPDH 5' AACAGAGACATTGGGGGTTG 3' (Ninov, 2010).

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 µL, contendo 10µL de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 µL DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 22). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting (Figura 25) com o fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado em cada placa o controle negativo (água nuclease free).

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10, foram observados os resultados demonstrados na Figura 25 e Figura 26. Na análise dos resultados dessas reações utilizando esse conjunto de primers, foi observada uma eficiência de 91,28% e r^2 de 0,975 e, na análise da curva de melting (Figura 25) e todas as amostras testadas amplificaram, com exceção do controle negativo sendo este conjunto de primers escolhido para a normalização das reações.

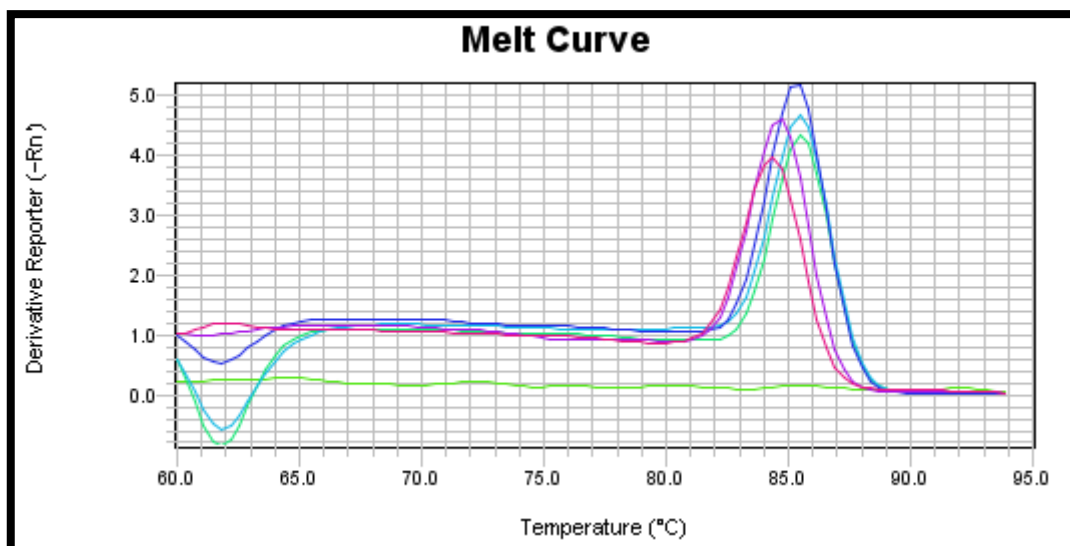


FIGURA 25. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers GAPDH.

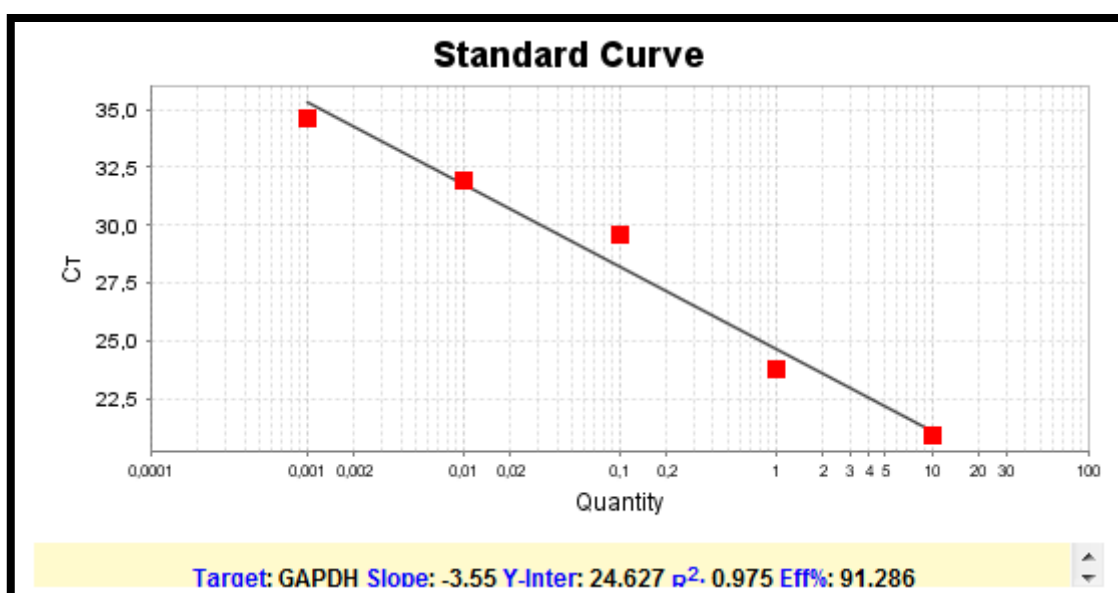


FIGURA 26. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers GAPDH.

Após a escolha dos primers, foi realizada a quantificação das amostras e então foi realizado um cálculo para correção dos valores de qPCR. O cálculo foi realizado a partir do maior valor obtido das quantificações utilizando o primer GAPDH, onde este valor foi dividido pelo valor de cada quantificação e este foi multiplicado pelo valor da quantificação obtida quando utilizado os primers *Borrelia anserina* fla gene.

4.8.1.6 Espiroquetemia em campo escuro

As amostras foram colhidas a cada cinco dias, por meio de punção da veia metatársica, em seis tubos capilares e posteriormente centrifugados em alta velocidade para separação do soro.

A motilidade e quantificação foram avaliadas de acordo com Dwawedkar e Dhanesar (1983) em microscópio de campo escuro (Nikon E200®), utilizando a objetiva de 20x. A contagem foi realizada na câmara de Neubauer e quando necessário foi utilizada diluição do soro em solução de HBSS (Hank's Balanced Salt Soln), na concentração de 1:10 (Figura 27).

A motilidade foi avaliada em cruzes, sendo zero para ausência de motilidade, uma cruz para motilidade baixa, duas cruzes para motilidade ativa, três cruzes para motilidade vigorosa e quatro cruzes para motilidade intensa.

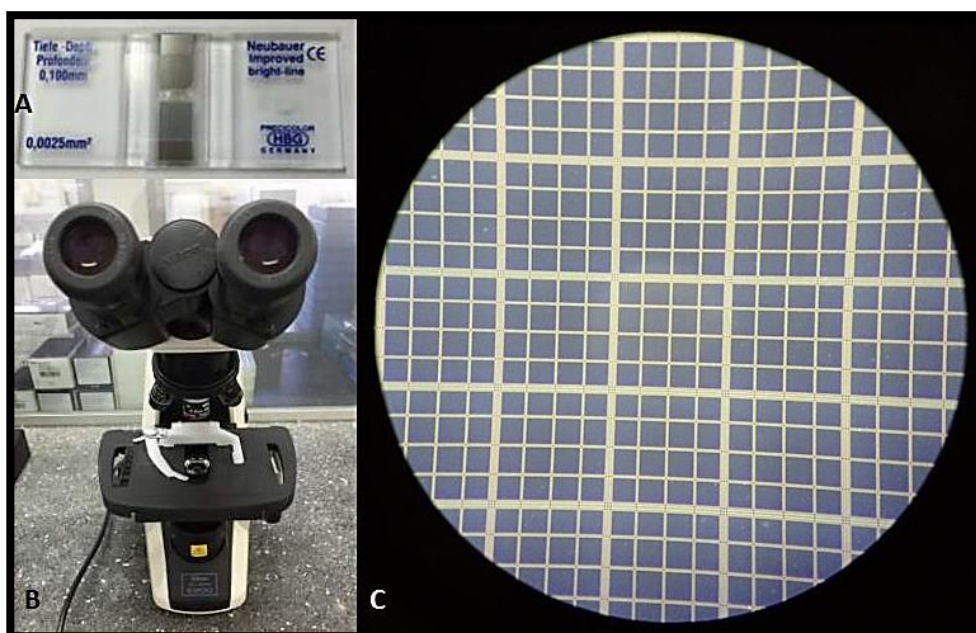


FIGURA 27. A. Câmara de Neubauer. **B.** Microscópio E200 Nikon®. **C.** Fotomicrografia da câmara de Neubauer. 200x. (FONTE: DABUS, 2015).

4.8.1.7 Espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado

O cálculo de espiroquetemia foi realizado semelhante ao descrito por Shommein e Kogali (1974) por meio de esfregaço sanguíneo corado com o corante comercial Panótico rápido Laborclin® e Wright, onde foi realizada a

contagem de 50 campos aleatórios e realizada a média das espiroquetas por campo (Figura 28).

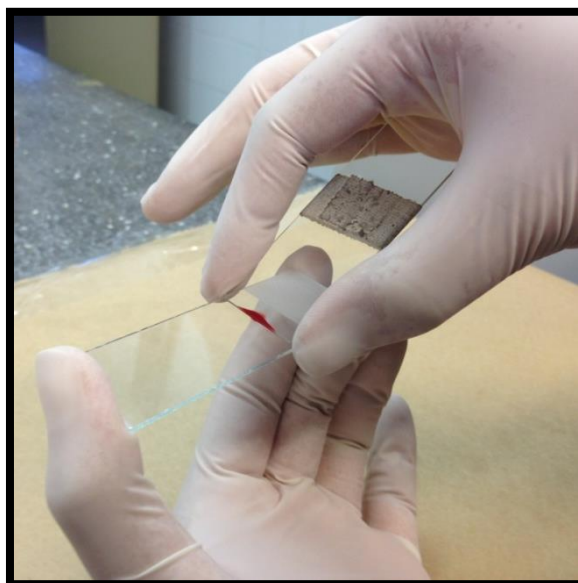


FIGURA 28. Realização do esfregaço sanguíneo.
(FONTE: DABUS, 2015)

4.8.1.8 Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) indireto

Após centrifugação do sangue total em laboratório, foi utilizado soro para realização do exame.

Os soros obtidos foram submetidos à pesquisa de anticorpos da classe de Imunoglobulina Y (IgY) contra antígeno bruto de *B. anserina* utilizando o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) indireto padronizado por Cordeiro et al. (2012).

Neste ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 orifícios (NUNC Surface ®) sensibilizadas com 100 µL do antígeno de *B. anserina*, cepa oriunda de Pedro Leopoldo - MG, diluído a 5 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas durante 12 horas em câmara úmida à 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com Tampão salino fosfato (PBS Tween 20 0,05% pH 7,4), posteriormente bloqueadas com 200 µL de Leite em pó 6% diluído em PBST e incubadas em câmara úmida por 90 minutos, em estufa bacteriológica a 37° Celsius. Em seguida realizaram-se novamente três lavagens das placas com PBST.

Foram utilizadas 10 amostras negativas de animais previamente testados e um controle positivo em duplicata de um animal inoculado com antígeno inativado de *B. anserina*. Os 10 controles negativos, o controle positivo e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:800 em PBST e dispostos 100 µL nas placas, que foram incubadas à 37° Celsius por 90 minutos e, posteriormente lavadas como na etapa anterior. Então, foi disposto 100 µL do conjugado IgG de coelho (KPL®) na diluição de 1:4000 em PBST com mais 90 minutos de incubação nas condições citadas anteriormente, seguindo novamente as lavagens das placas. Após esta última incubação foram empregados 100 µL do substrato revelador Paranitrofenilfosfato de Sódio (PNPP - SIGMA Chemical) diluído em Tampão de Dietanolamina pH 9,8 na concentração de 1 mg/mL. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços, durante 15 minutos (Termo Scientific® UniscienceMultiskan FC), sob comprimento de onda de 405 nm.

A linha de corte (*cut off*) foi obtida e estimada pelo valor da média das densidades ópticas dos controles negativos multiplicado por 2,5. A atividade imunológica dos soros testes foi calculada para determinação das amostras positivas em cada diluição, considerando o soro controle positivo e os negativos, como a equação a seguir (MACHADO et al., 1997):

$$\text{Valor real} = \frac{(\text{Densidade óptica amostra} - \text{média de negativos})}{(\text{Média de positivos} - \text{média de negativos})}$$

4.8.2 Etapa *In vitro*

4.8.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase

As amostras de meio de cultura celular foram retiradas do meio de cultivo BSK-H, a cada cinco dias, realizadas junto com o repique da placa celular, realizado em capela de fluxo laminar com material estéril.

O DNA foi extraído de 10 µL do meio, onde este foi centrifugado a 9197 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi retirado, o material restante foi ressuspenso em 100 µL de H₂O nuclease free e 100 µL de resina Chelex 110® (BioRad), foi retirado o sobrenadante e acondicionado em um microtubo de

1,5 ml. O DNA extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C , até o momento da realização das provas. Controles negativos (água nuclease free) foram adicionados a cada bateria de extração.

Como no momento da definição do protocolo a ser utilizado na qPCR não haviam trabalhos científicos utilizando essa técnica para utilização dos primers, portanto, foi necessário escolher novos primers utilizando o programa PrimerBLAST disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para tanto foram desenhados dois pares de primers. O primeiro par foi designado BorAns-rRNA F 5' TTCTCGGGCCTTGACACAC 3' e BorAns-rRNA R 5' CTCCTCCCTTGCGGGTTAG 3'.

No resultado da análise "in silico" foi identificado que o mesmo amplificava fragmento de 84 bp de várias espécies de *Borrelia* (Anexo 2). O T_m ficou próximo dos 60°C .

Os primers não alinharam com outra bactéria e também não alinharam com a espécie de estudo *Gallus gallus domesticus*.

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 μL , contendo 10 μL de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 μL DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 22). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95° , seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95° , 1 minuto a 60° , 15 segundos a 95° . Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting (Figura 18), utilizando o fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado o controle negativo (água nuclease free), em cada placa.

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10, foram observados os resultados demonstrados na Figura 19, onde foi possível observar que apesar da excelente eficiência de 98,61% e r^2 de 0,998, foi observado na amostra negativa uma amplificação inespecífica, com pico de melting coincidente com as da amostra padrão. Uma vez que essa amplificação poderia interferir na quantificação da bactéria nas amostras teste, esse conjunto de primers não mais foi utilizado.

Assim, dando prosseguimento à padronização da qPCR, o segundo par de primers testados foi BorAns-fla R 5' CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 3' e BorAns-fla R 5' ACACCCATACCAGCAGCATC 3'. As condições de reação foram as mesmas do anterior. Foi testado, assim como o anterior, na análise *in silico* no PRIMER BLAST, e foi observado que esse conjunto reconhece apenas membros do gênero *Borrelia*.

No resultado da análise "in silico" foi identificado que o mesmo amplificava fragmento de 124 bp de várias espécies de *Borrelia* (Anexo 3). O Tm ficou próximo dos 60°C.

Os primers não alinharam com outra bactéria e também não alinharam com a espécie de estudo *Gallus gallus domesticus*.

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 µL, contendo 10µL de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 µL DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 22). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting com fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado em cada placa o controle negativo (água nuclease free).

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10, foram observados os resultados demonstrados na Figura 20 e Figura 21. Na análise dos resultados dessas reações utilizando esse conjunto de primers foi observado uma eficiência um pouco menor, de 86,21% e r² de 1, entretanto, na análise da curva de melting (Figura 20) não foi observado amplificação da amostra negativa, sendo este conjunto de primers escolhido para a realização do exame.

4.8.2.2 Espiroquetemia em campo escuro

As amostras de meio de cultura celular foram retiradas do meio de cultivo BSK-H, a cada cinco dias, realizadas junto com o repique da placa celular, realizado em capela de fluxo laminar com material estéril.

A motilidade foi avaliada em cruces, sendo zero para ausência de motilidade, uma cruz para motilidade baixa, duas cruces para motilidade ativa, três cruces para motilidade vigorosa e quatro cruces para motilidade intensa.

A contagem das placas foi avaliada em cruces de acordo com a quantidade de aglomerados de espiroquetas, sendo uma cruz para até um aglomerado, duas cruces até dois aglomerados e três cruces até 3 aglomerados.

4.9 Análise dos Resultados

A comparação das médias entre os grupos foi realizada por meio do Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, pois as medidas não apresentaram distribuição normal. Quando houve diferença significativa de um grupo em relação aos demais ($p < 0,05$) realizou-se o Teste de Dunn ou Student-Newman-Keuls para identificar os grupos que apresentaram medianas distintas. As comparações foram realizadas em cada momento de observação. As análises foram obtidas com o programa SPSS. Statistics 17.0.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa *In vivo*

5.1.1 Exame clínico

A análise estatística do peso das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 3 e Figura 31.

Os animais apresentavam no M1, ovipostura, ingestão de água e ração dentro da normalidade, mostravam-se saudáveis em estado de alerta e cristas avermelhadas (Figura 29).

No primeiro dia após a imunossupressão e inoculação, os animais dos grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram diarreia e aumento na ingestão de água. No segundo dia, após a inoculação, esses animais apresentaram diarreia esverdeada, apatia, suspensão da produção de ovos, sonolência, anorexia, polidipsia, penas arrepiadas e cristas pálidas (Figura 30).

Em relação à perda de peso, quando comparado o M5 com o M1, foi possível observar que o G1 manteve-se estável, e houve emagrecimento no M5, dos grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7, porém sem diferença estatística significativa. Um animal do G4 e dois animais do G6 vieram a óbito no M5.

No M6, o G1 apresentou discreto aumento de peso em relação ao M1, cinco animais do G2 vieram a óbito, permanecendo uma ave, que apresentou emagrecimento. O G3 apresentou redução de peso. Todos os animais do G4, G5 e G6 vieram a óbito no M6. Cinco galinhas do G7 vieram a óbito, restando um animal, que apresentou emagrecimento.

Os animais do G1 mantiveram-se com produção de ovos dentro da normalidade, ingestão de água e ração normais, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis com estado de alerta e cristas vermelhas.

O animal do G2 que sobreviveu, apresentou melhora a partir do M11, onde houve aumento no peso corporal, fezes normais, normodipsia e normorexia, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis e alertas, e manteve-se estável até o M13, porém o animal não voltou a ovipostura.

Os animais do G3 começaram a ganhar peso corporal a partir do M8, e mantiveram-se assim até o M13, com produção de ovos dentro da normalidade, normodipsia e normorexia, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis e alertas e cristas vermelhas, um animal veio a óbito no M8 e outro animal no M10.

O animal do G7 começou a apresentar melhora no M10, com aumento de peso corporal, fezes normais, normodipsia e normorexia, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis e alertas e cristas róseas. No M11 o animal apresentava cristas avermelhadas e manteve-se estável até o fim do experimento, onde voltou a ovipostura neste momento.

Lisboa (2006) relatou em infecção experimental de *B. anserina* por carrapatos, perda de apetite, penas arrepiadas, sonolência e crista pálida, sinais relatados também por Marchoux e Salimbeni (1903) em infecções naturais, Cepeda (2015) relatou os mesmos sinais clínicos em animais inoculados com soro infectado por *B. anserina*, sinais clínicos observados também presente estudo.

Não ocorreu diferença significativa para os valores de peso corporal, porém o emagrecimento observado nas aves dos grupos 2 e 7 também foram relatados por Lisboa (2006) e Cepeda (2015).



FIGURA 29. Animais dos grupo tratado e luz antes de serem inoculadas. Animais clinicamente saudáveis e alertas. (FONTE: DABUS, 2015).



FIGURA 30. A. Sonolência. B. Diarreia esverdeada. C. Crista pálida. D. Penas arrepiadas e apatia. E. Morte. (FONTE: DABUS, 2015).

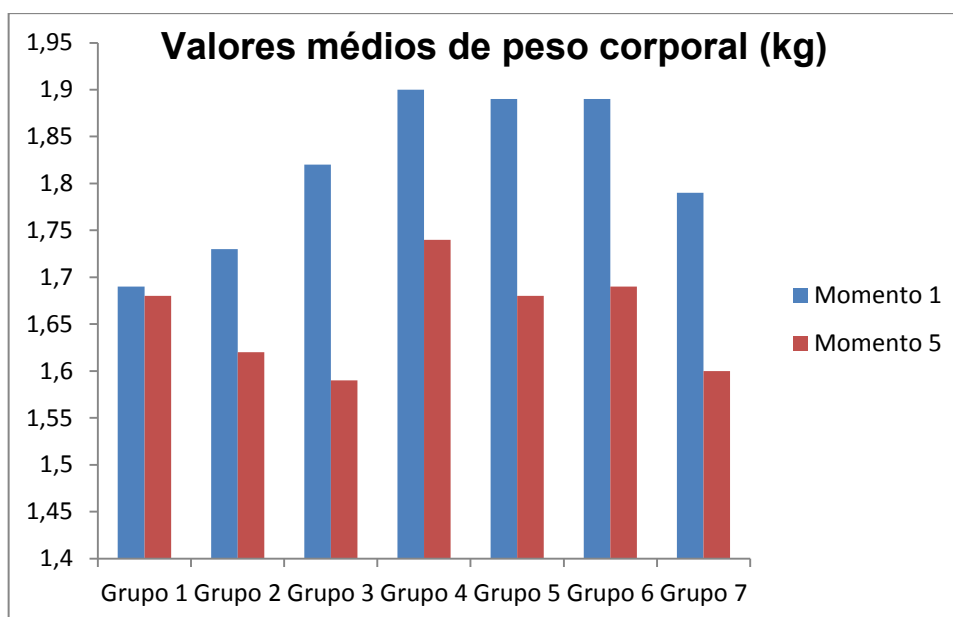


FIGURA 31. Valores médios de peso corporal (Kg) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

5.1.2 Bioquímica sérica

A análise estatística de bioquímica sérica das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7.

Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 4 e Figura 32.

Os animais de todos os grupos, em todos os momentos, apresentaram valores de fosfatase alcalina dentro do intervalo de referência. No momento 1 não houve diferença significativa entre os grupos. No momento 5 houve diferença significativa no grupo 1 comparado aos grupos 4, 5, 6 e 7 e quando comparado o grupo 3 em relação aos grupos 4, 5, 6 e 7, porém ambos os grupos apresentaram valores dentro do intervalo de referência.

Em aves a elevação da fosfatase alcalina é rara. O que é mais comumente observado é a redução em casos de lesões hepáticas (RIVETZ et al., 1977; CAMPBELL in THRALL et al., 2012 e SCHIMIDT in CUBAS et al., 2014), o mesmo foi observado no presente estudo, porém com valores dentro dos valores de normalidade para a espécie.

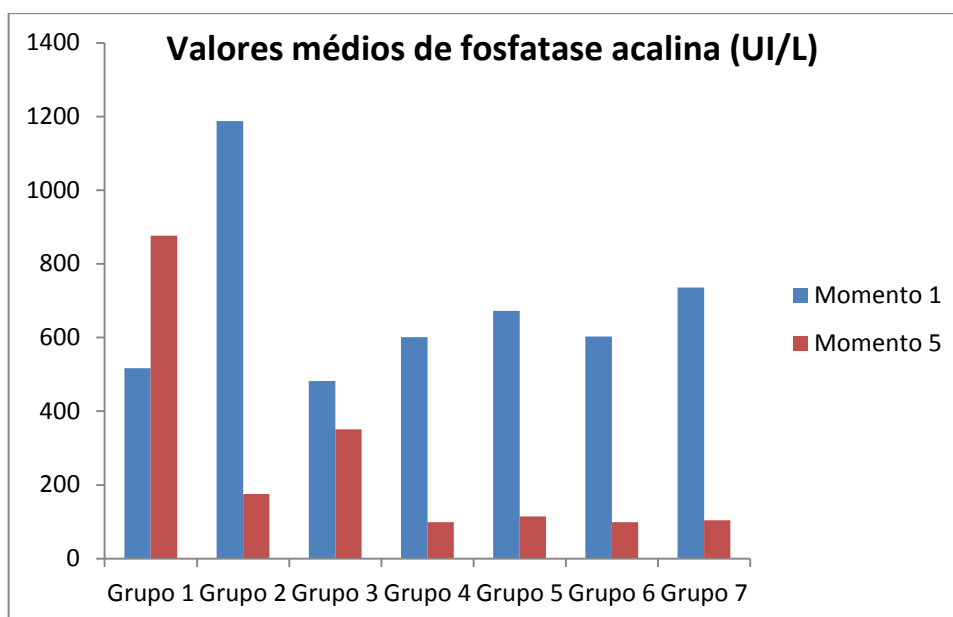


FIGURA 32. Valores médios de fosfatase alcalina (UI/L) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Os valores médios e desvios padrão dos valores de Aspartato aminotransferase (UI/L) estão apresentados na Tabela 5 e Figura 33.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores de aspartato aminotranferase dentro do intervalo de referência para a espécie. E não houve diferença estatística significativa.

No momento 5 houve diferença estatística significativa quando o grupo 1 foi comparado com todos os outros grupos.

Os animais dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram valores elevados de AST no momento 5.

O animal do grupo 2 apresentou elevação nos valores de AST em todos os momentos, com exceção do momento 7.

Os animais do grupo 3 apresentaram elevação nos valores de AST em todos os momentos.

O animal do grupo 7 apresentou valores de AST elevados até o momento 11, nos momentos 12 e 13 apresentou valores dentro do intervalo de referência.

A elevação da enzima AST foi relatada por Cepeda (2015) em infecções experimentais por carrapatos infectados e por soro infectado, o que também foi

observado por Rivetz, et. al., (1977), concordando com o encontrado no presente estudo.

O aumento desta enzima pode sugerir lesão hepática grave e difusa, ou distúrbios musculares (Schmidt *in* Cubas et al., 2014; KANEKO, et al., 2008). A AST localiza-se parcialmente no citoplasma dos hepatócitos, portanto, ser considerada um marcador sensível, porém não específico de distúrbios hepatocelulares (Schmidt *in* Cubas et al., 2014).

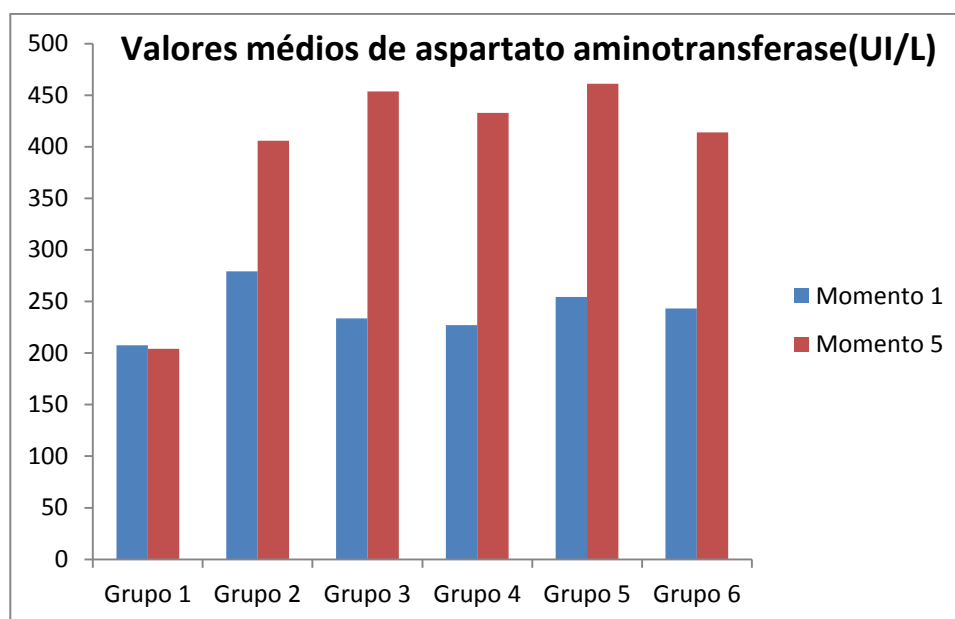


FIGURA 33. Valores médios de aspartato aminotransferase (UI/L) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Os valores médios e desvio padrão dos valores de Alanina aminotransferase (UI/L) estão apresentados na Tabela 6 e Figura 34.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores de ALT dentro do intervalo de referência com exceção do grupo 3, que apresentou discreta elevação (96 UI/L). Não houve diferença estatística significativa neste momento.

No momento 5 houve redução nos valores de ALT dos grupos 2, 3, 4, 5 e 7. O grupo 1 e 6 apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2, e quando comparado o grupo 3 com o G2 e G7.

O animal do grupo 2 apresentou elevação desta enzima a partir do momento 7 (15 dias após infecção), o qual se normalizou no momento 12.

O animal do grupo 7 apresentou elevação da ALT nos momentos 7, 8 e 9, e após este momento até o fim do experimento houve redução desta enzima.

Cepeda (2015) observou elevação da ALT, em grupo experimental infectado com soro parasitado, a partir de 12 dias após a infecção, que normalizou após 24 dias após inoculação. Vashist (2011) observou elevação da ALT a partir da primeira semana após infecção.

Cepeda (2015) relatou que o aumento da enzima pode ser devido ao estresse da contenção para coleta e/ou diferenças ambientais, que podem alterar a fisiologia e o metabolismo dos animais.

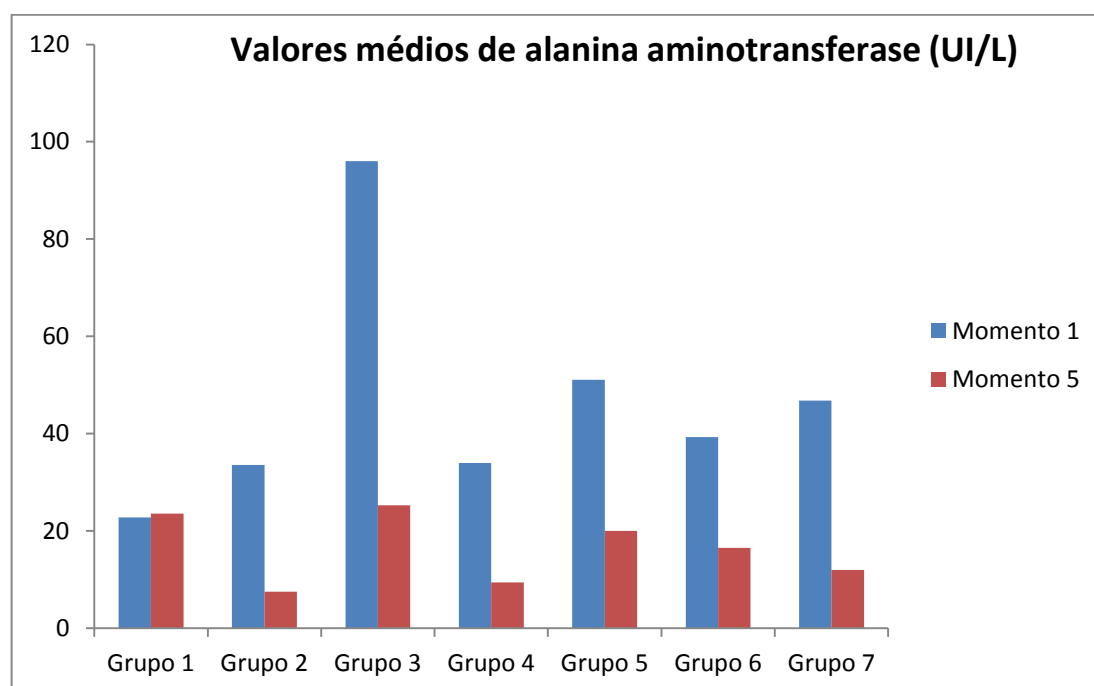


FIGURA 34. Valores médios de alanina aminotranferase (UI/L) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Os valores médios e desvio padrão dos valores de Colesterol sérico (mg/dL) estão apresentados na Tabelas 7 e Figura 35.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores médios de Colesterol sérico dentro do intervalo de referência. Não houve diferença significativa entre eles.

No momento 5 todos os grupos, com exceção do G3 que apresentou elevação de colesterol, permaneceram com valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa quando comparado o grupo 1 em relação aos grupos 3, 4, 5, e 7; e quando comparado o grupo 3 houve diferença significativa em relação aos grupos 2, 4, 5 e 6.

Os animais do grupo 1 apresentaram em todos os momentos valores de colesterol dentro de intervalo de referência.

O animal do G2 apresentou aumento de colesterol a partir do momento 7 e valores dentro do intervalo de referência nos momentos 11 e 13.

O animal do G7 apresentou elevação nos momento 6 até o momento 11, e se normalizou a partir do momento 12.

O grupo 3 apresentou elevação entre os momentos 5 e 10, e a partir do momento 11 voltou a apresentar valores dentro do intervalo de referência.

Cepeda (2015) observou elevação nos níveis de colesterol do 8º ao 24º dia após a infecção, no grupo infectado com soro parasitado.

O colesterol endógeno é produzido principalmente no fígado. Nas aves o aumento do colesterol pode acontecer por insuficiência hepática, obstrução biliar extra hepática, fibrose ou hiperplasia de ductos biliares (AMAND, 1986; KANEKO, et al., 2008). Observa-se aumento da concentração de colesterol durante a vitelogênese e a formação de ovo, e também em aves com hipotireoidismo, distúrbios hepáticos, jejum prolongado e dietas ricas em gordura. A hipercolerestemia pode ser causada pela dieta ou por insuficiência hepática. Quando associada a elevações nos teores de AST, ácidos biliares e LDH indica lipidose hepática (Schmidt *in* Cubas et al., 2014).

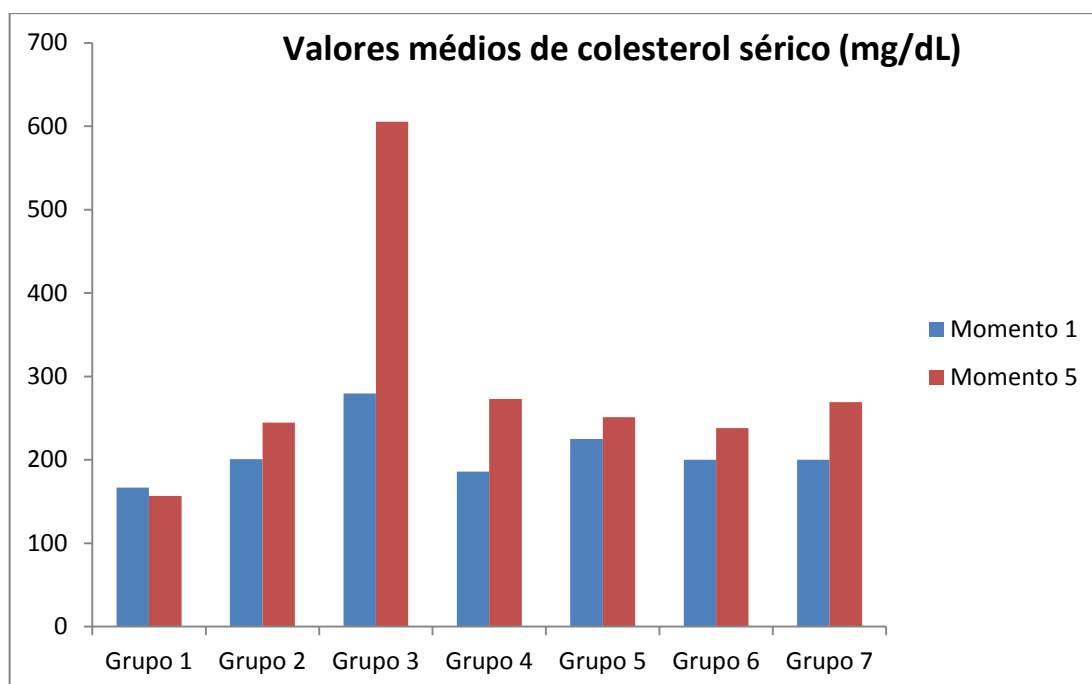


FIGURA 35. Valores médios de colesterol sérico (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Os valores médios e desvio padrão dos valores de Triglicerídeos séricos (mg/dL) estão apresentados na Tabela 8 e Figura 36.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores de triglicerídeos séricos dentro do intervalo de referência, com exceção do grupo 3 (2279 mg/dl). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

No momento 5 todos os grupos apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa do grupo 1 em relação aos grupos 2, 4, 5, 6, e 7. E em relação ao grupo 3 quando comparado com os grupos 2, 4, 5 e 6 também houve diferença significativa.

O grupo 1 apresentou em todos os momentos valores de triglicerídeos dentro do intervalo de referência.

O grupo 2 e 7 apresentaram elevação no momento 8, nos demais momentos mantiveram-se dentro do intervalo de referência.

No grupo 3 foi observado aumento de triglicerídeos apenas nos momentos 8 e 9.

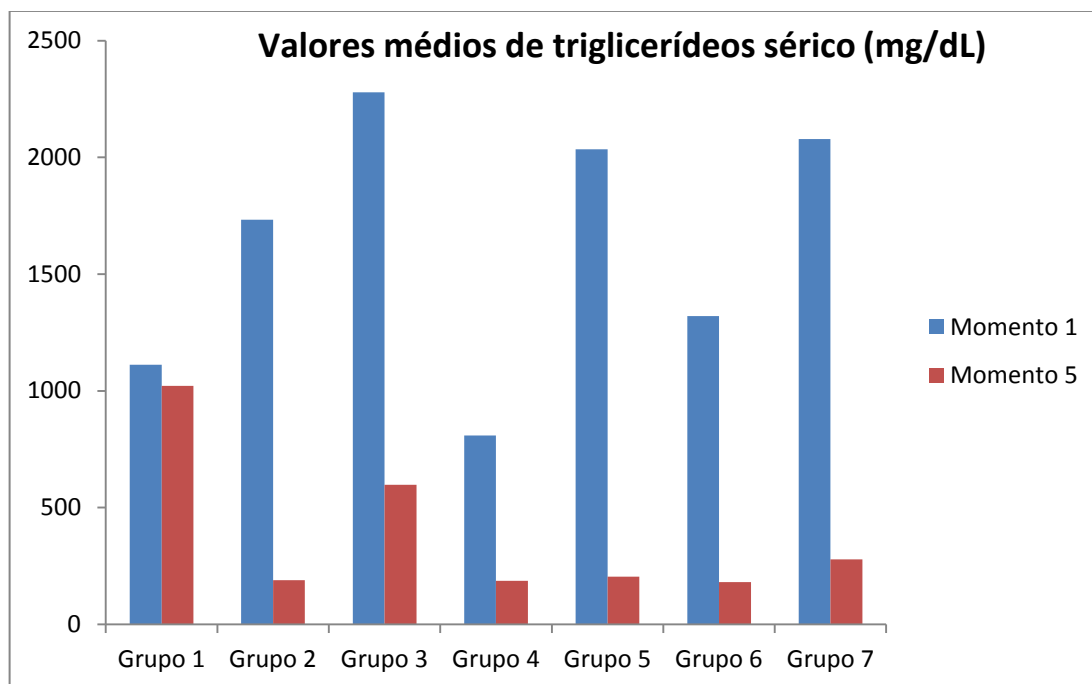


FIGURA 36. Valores médios de triglicerídeos sérico (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

5.1.3 Volume globular e proteína plasmática total

A análise estatística do volume globular e proteína plasmática total das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7.

Os valores médios e desvio padrão dos valores de volume globular (%) estão apresentados na Tabela 9 e Figura 37.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa quando comparado o grupo 4 com os grupos 1, 2 e 3.

No momento 5 houve diferença significativa quando comparado o grupo 1 com os grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7. E quando comparado o grupo 3 em relação aos grupos 1, 4, 5, 6 e 7. Os grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram declínio nos valores de VG, indicando anemia.

O grupo 1 manteve-se dentro do intervalo de referência em todos os momentos, com exceção do momento 6, onde apresentou discreta redução (24%).

Os animais do G2 e G7 apresentaram redução nos valores de volume globular entre os momentos 5 e 9. A partir do momento 10 os valores apresentaram-se dentro dos valores de referência.

Lisboa et al., (2008) relatou discreta anemia em aves infectadas experimentalmente por *B. anserina* com carrapatos, os resultados obtidos no presente estudo mostram anemia severa, principalmente nos grupos 2, 4, 5, 6 e 7. A anemia causada pela borreliose, pode ser causada pela destruição ou diminuição na produção das hemácias, essa diminuição é decorrência da multiplicação *B. anserina* e liberação de substâncias tóxicas no baço, fígado e medula óssea (HUTYRA et al., 1947).

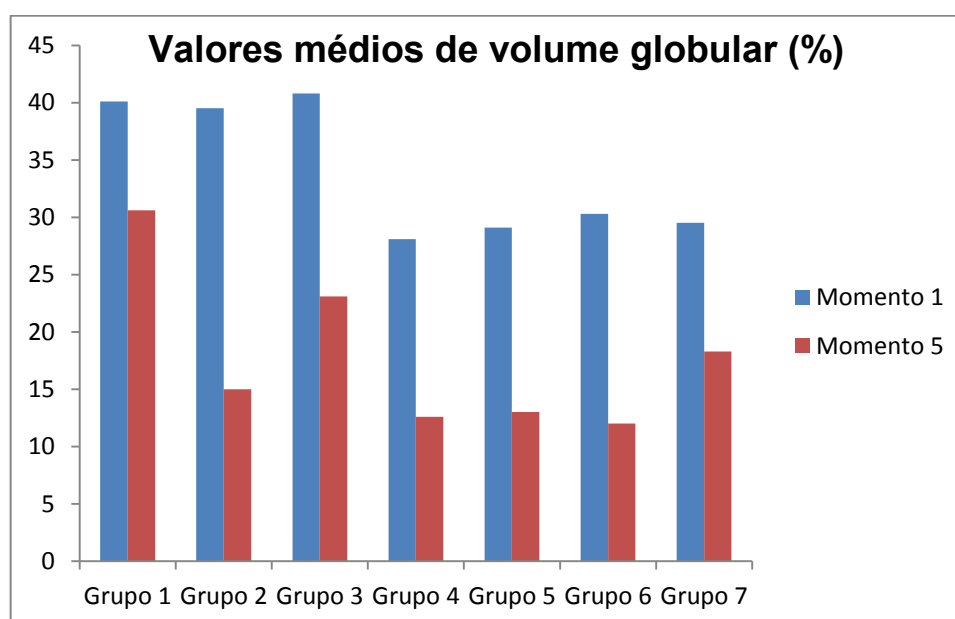


FIGURA 37. Valores médios de volume globular (%) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Os valores médios e desvio padrão dos valores de proteína plasmática total (g/dL) estão apresentados na Tabela 10 e Figura 38.

No momento 1 todos grupos apresentaram hiperproteinemia.

No momento 5 os animais do G4, G5 e G6 apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Os animais dos grupos 1, 2, 3 e 7 apresentaram valores elevados de PPT.

Os grupos 1, 2 e 3 apresentaram em todos os momentos hiperproteinemia.

O grupo 2 apenas no momento 2 apresentou valores de PPT dentro do intervalo de referência, nos demais apresentou elevação da mesma em relação ao intervalo de referência.

Lisboa (2006) observou hiperproteinemia no oitavo dia após inoculação. Ocorre hiperproteinemia quando há a produção de imunoglobulinas, desidratação, estresse e condições imunossupressoras (RIVETZ et al., 1977; CAMPBELL in THRALL et al., 2012), o que foi compatível com as condições do estudo.

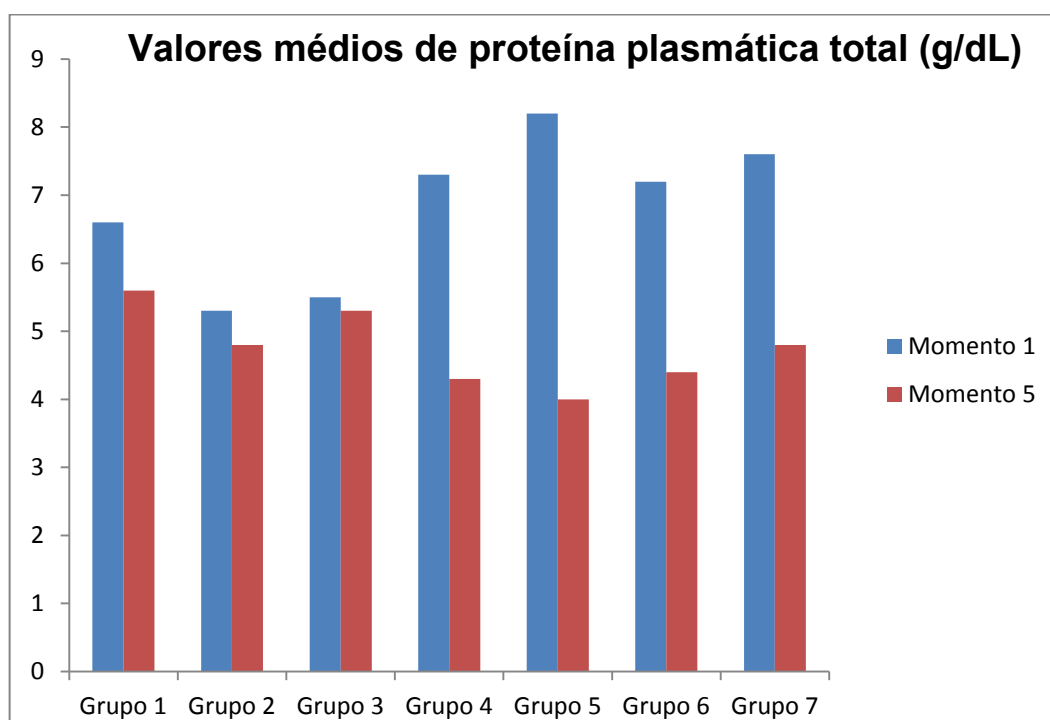


FIGURA 38. Valores médios de proteína plasmática total (g/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

5.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR)

A análise estatística dos valores de qPCR (espiroquetas/ml) das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7.

Os valores médios e desvios padrão estão apresentados na Tabela 11 e Figura 39.

Os animais do G1 e G3 mantiveram-se negativos em todos os momentos.

Os grupos 2, 4, 5 e 6 apresentaram resultados positivos no momento 5, e voltaram a apresentar resultados negativos nos próximos momentos.

Não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 3. Houve diferença estatística entre o grupo 1 com os grupos 2, 5, 6 e 7 e entre o grupo 3 com os grupos 2, 5, 6 e 7.

Não houve diferença significativa entre os grupos 2, 4, 5, 6 e 7.

O animal do G7 apresentou resultados negativos a partir do momento 6, até o momento 10, onde apresentou resultado positivo (286.560 espiroquetas/ml), neste momento o animal apresentava-se clinicamente e laboratorialmente saudável.

No M11 até o M13 o animal apresentou valor negativo.

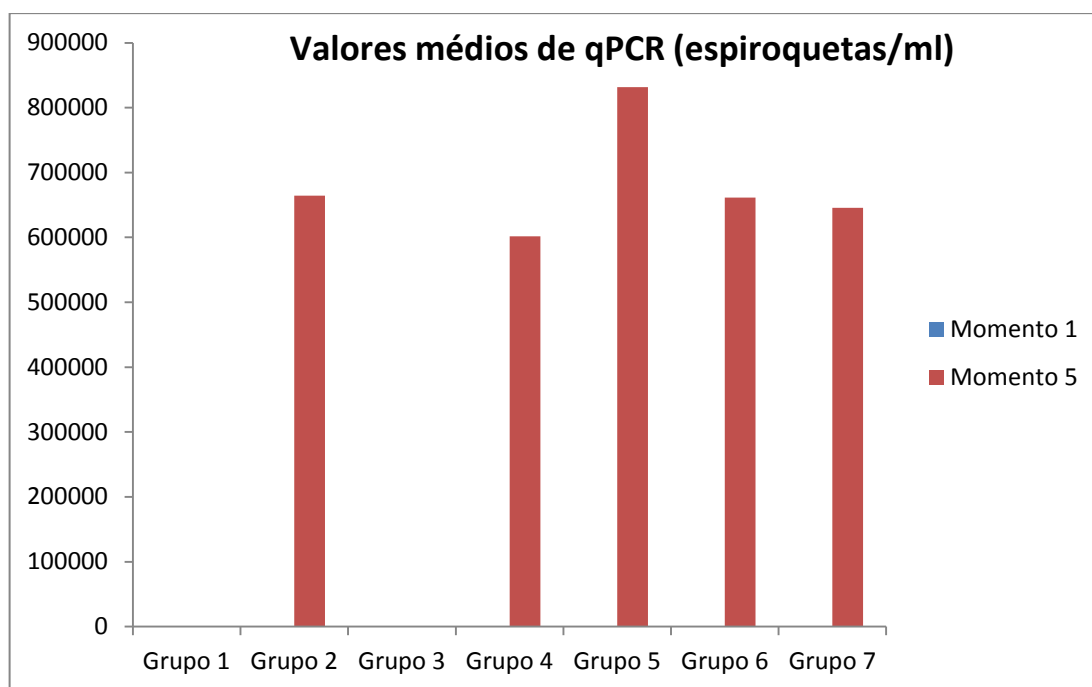


FIGURA 39. Valores médios de qPCR (espiroquetas/ml) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

5.1.5 Espiroquetemia em campo escuro

A análise estatística dos valores de espiroquetemia em campo escuro (espiroquetas/ml) das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores médios e desvios padrão obtidos estão dispostos na Tabela 12 e Figura 41.

Como esperado, os grupos 1 e 3 foram negativos em todos os momentos.

No momento 1 todos os grupos apresentaram resultados negativos, enquanto no momento 5 os animais dos grupos 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram espiroquetemia positiva (Figura 40).

O animal do grupo 2 apresentou resultados negativos a partir do M6 e permanecendo até o M13.

O animal do grupo 7 apresentou resultados negativos nos momentos 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13. No momento 11 o animal voltou a apresentar espiroquetas na circulação, porém o animal estava clinicamente saudável, e os exames

laboratoriais como VG e bioquímica sérica, apresentavam-se com seus valores dentro do intervalo de referência.

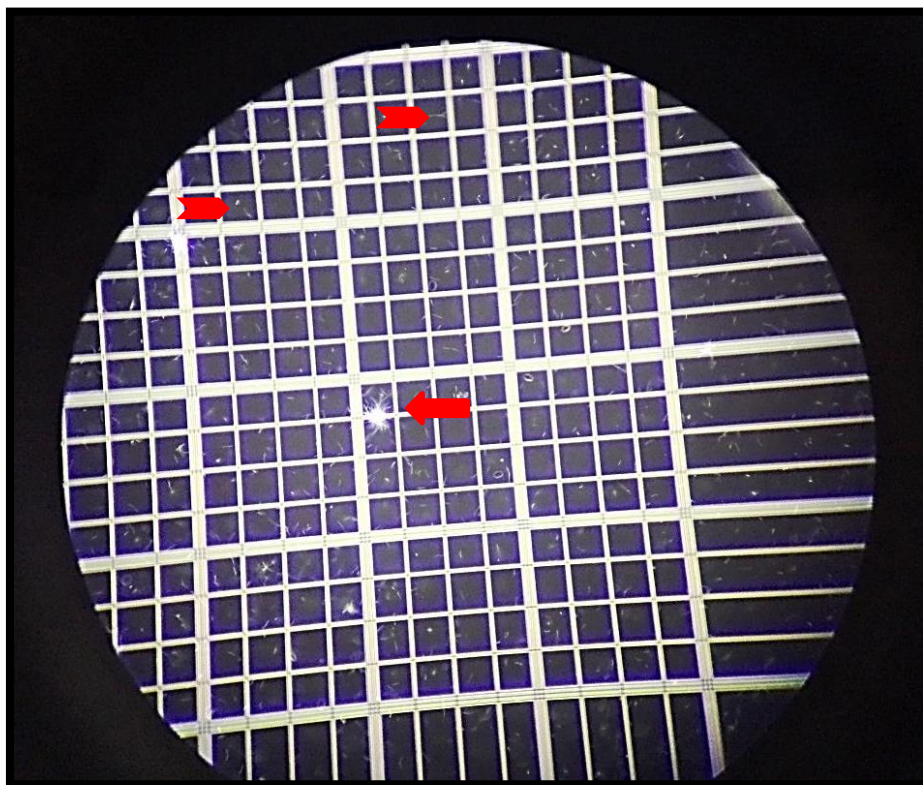


FIGURA 40. Fotomicrografia de contagem de espiroquetas em campo escuro utilizando câmara de Neubauer. 200x. **Seta.** Aglomerado de espiroquetas. **Cabeça de seta.** Espiroquetas livres (FONTE: DABUS, 2015).

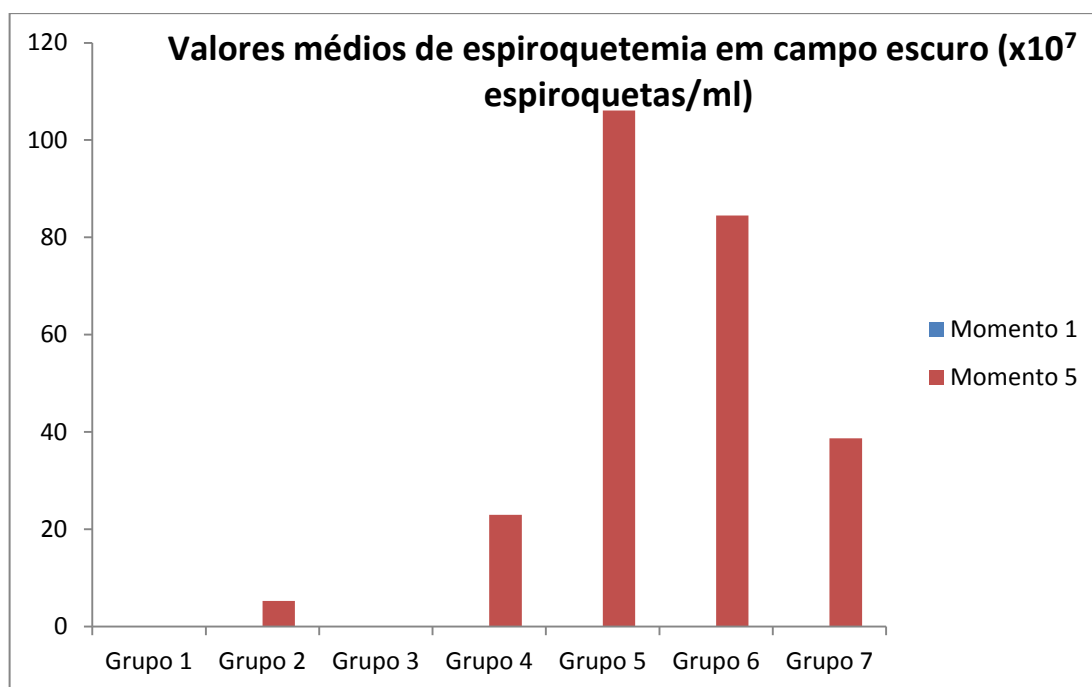


FIGURA 41. Valores médios de espiroquetemia em campo escuro ($\times 10^7$ espiroquetas/ml) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

5.1.6 Espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado

A análise estatística dos valores de espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado (espiroquetas/campo) das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 13 e Figura 42.

Como esperado, os grupos 1 e 3 estavam negativos em todos os momentos.

No momento 1 todos os grupos apresentaram resultados negativos.

No momento 5, os grupos 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram espiroquetas no esfregaço sanguíneo corado (Figura 43), neste momento houve diferença estatística significativa entre os grupos 1 em relação aos grupos 2, 4, 5, 6 e 7 e em relação ao grupo 3 comparado aos grupos 2, 4, 5, 6 e 7.

Nos momentos, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 todos os grupos foram negativos.

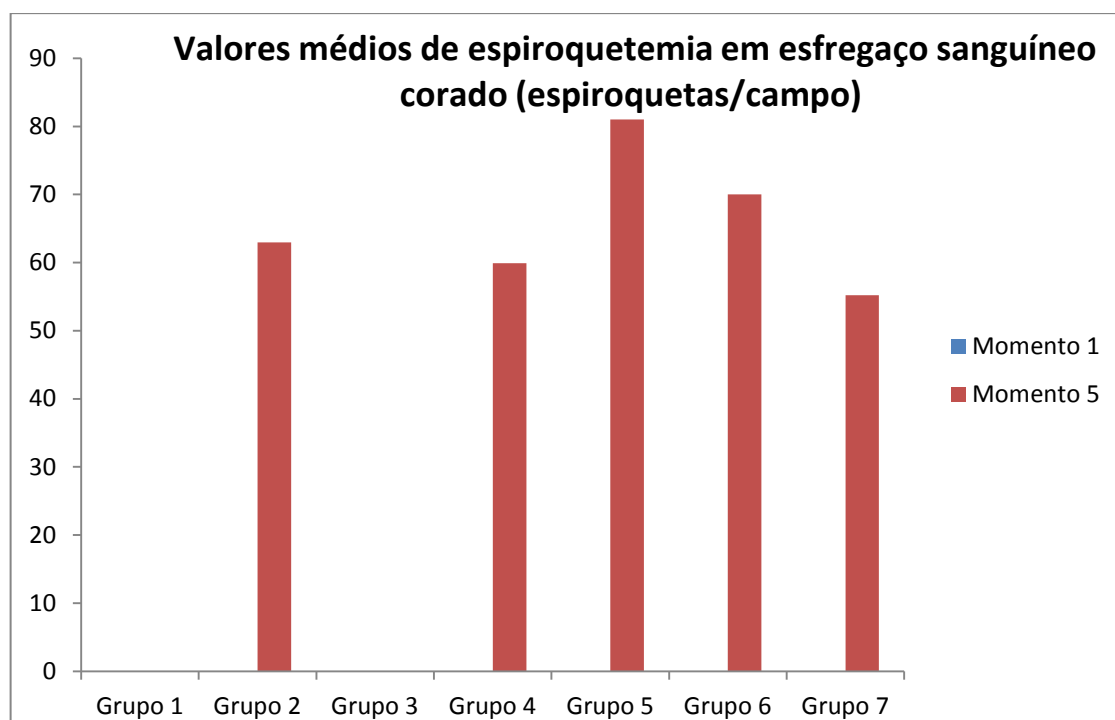


FIGURA 42. Valores médios de espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado (espiroquetas/campo) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

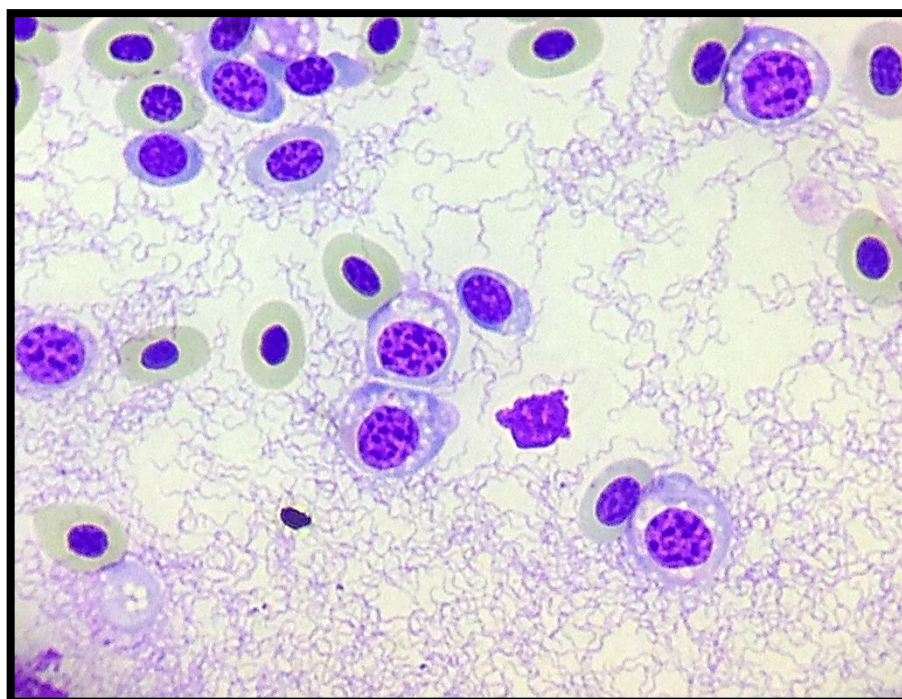


FIGURA 43. Fotomicrografia de esfregaço sanguíneo corado mostrando intensa quantidade de *Borrelia anserina* 400x. (FONTE: DABUS, 2015).

5.1.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática indireto (ELISA indireto)

A análise estatística dos valores de ELISA indireto das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 14 e Figura 44.

Os grupos 1 e 3 apresentaram resultados negativos em todos os momentos do experimento.

Os grupos 4, 5 e 6 apresentaram resultados negativos nos momentos 1 e 5.

O animal do grupo 2 começou a apresentar resultados positivos a partir do momento 7 até o fim do experimento.

O animal do grupo 7 começou a apresentar resultados positivos a partir do momento 6 até o fim do experimento.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos momentos 1 e 5.

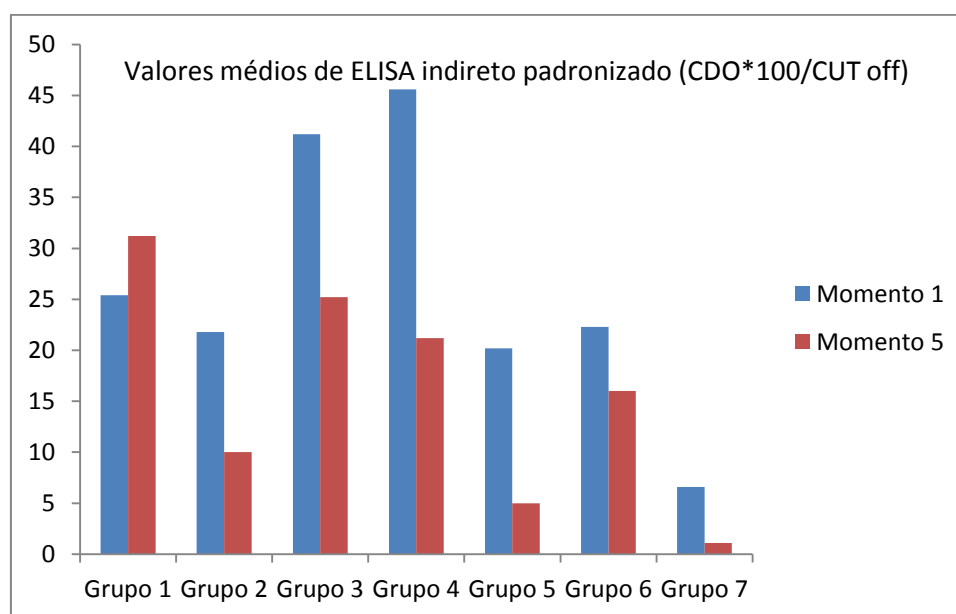


FIGURA 44. Valores médios de do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática indireto (ELISA indireto) padronizado ($CDO \times 100 / CUT \text{ off}$) (g/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1 e 5. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

5.1.8 Imunofluorescência indireta (RIFI)

A análise estatística dos valores de ELISA indireto das aves foi realizada nos momentos 1 e 5, nos demais momentos não foi possível devido ao óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e dos grupo 2 e 7 sobreviveu um animal de cada grupo, não sendo possível a análise. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 15.

Os animais do grupo 1 e 3 foram negativos em todos momentos.

No momento 5, os animais dos grupos 2, 4 e 5 ,40% foram positivos; do grupo 7, 50% foram positivos (Figura 45).

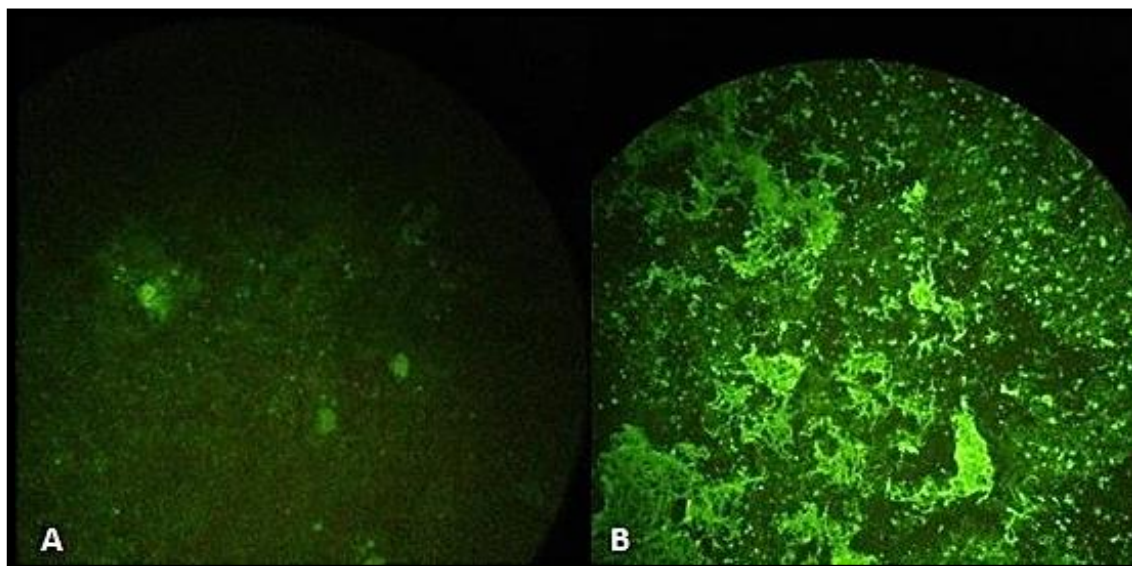


FIGURA 45. A. Animal negativo, grupo saúde. **B** Animal positivo, grupo tratado.

5.1.9 Mortalidade dos animais

Observou-se uma sensibilidade da linhagem Novagen, pois a literatura sobre borreliose aviária não demonstra o alto índice de mortalidade encontrado no presente estudo. Shommein e Kogali 1974 infectaram experimentalmente três raças de galinhas, a raça de galinha poedeira branca, como relatado no trabalho, alcançou 100% de mortalidade após 120 horas após inoculação.

Nos animais do grupo saúde a mortalidade foi 0%, nos grupos luz, riboflavina e veículo foi de 100%, nos grupos doença e tratado foi de 83,3%.

Foi realizada necropsia dos animais que vieram à óbito, foi realizada imprinting de um coágulo encontrado em cavidade abdominal (Figura 46).

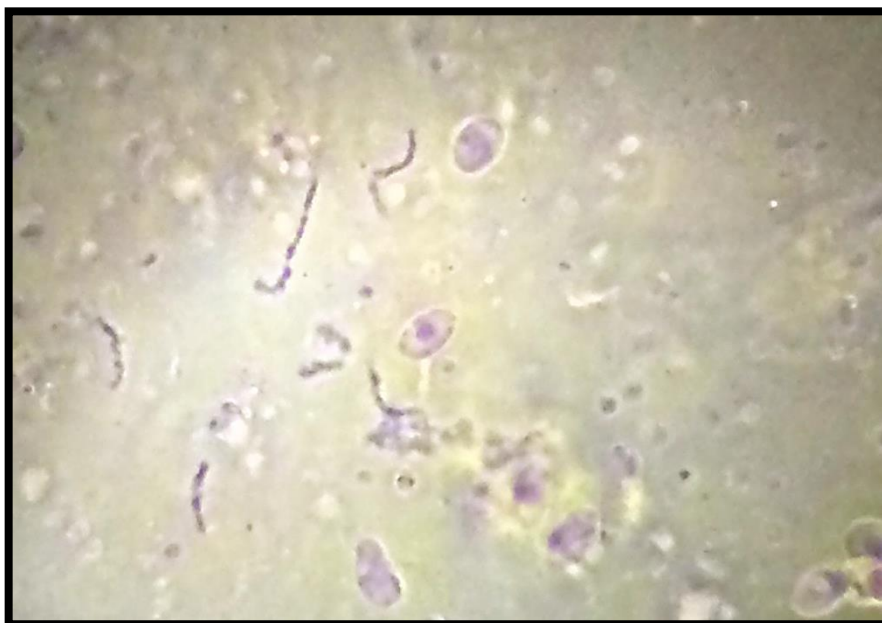


FIGURA 46. Fotomicrografia de coágulo em cavidade abdominal. Presença de *B. anserina*.

5.2 Etapa *In vitro*

5.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR)

A análise estatística das placas de cultivo celular foi realizada em todos os momentos do experimento. Os valores médios e desvios padrão estão apresentados na Tabela 16 e Figura 47.

As placas do G8 e G10 apresentaram resultados negativos em todos os momentos.

O grupo 9 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 9 e 11, e nos momentos 10, 12 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 11 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 9 e 12, nos momentos 10, 11 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 12 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 9 e 12, nos momentos 10, 11 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 13 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 11 e 12, nos momentos 9, 10 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 14 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 9 e 11, nos momentos 8, 10, 12 e 13 apresentou resultados negativos.

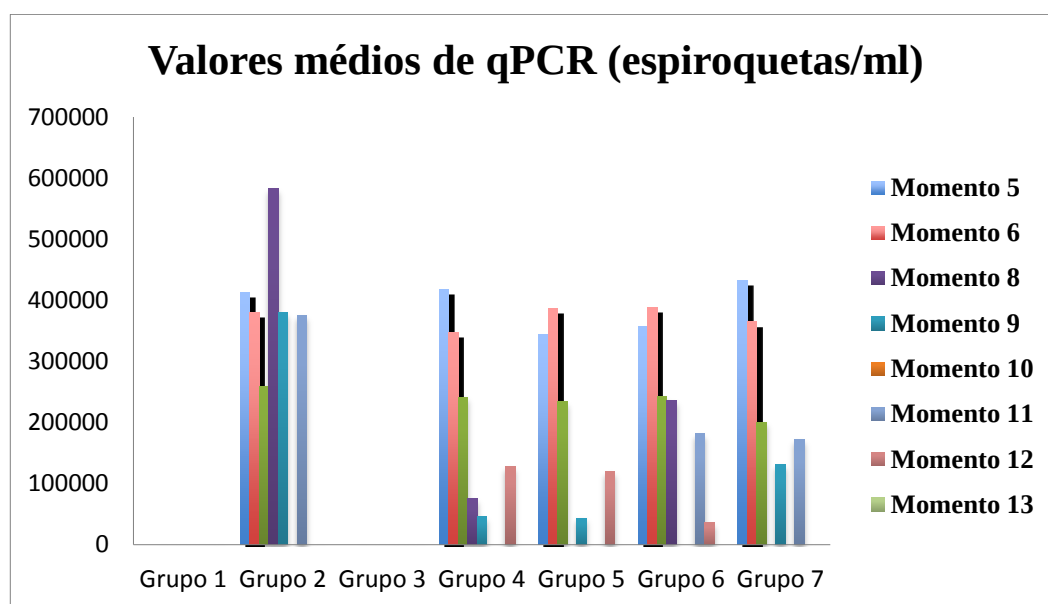


FIGURA 47. Valores médios de qPCR (espiroquetas/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde), grupo 9 (grupo doença), grupo 10 (grupo imunossupressão), grupo 11 (grupo luz), grupo 12 (grupo riboflavina) e grupo 13 (grupo veículo) e grupo 14 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

5.2.2 Espiroquetemia em campo escuro

A análise estatística das placas de cultivo celular foi realizada em todos os momentos do experimento. Os valores médios e desvios padrão estão apresentados na Tabela 17.

Os resultados foram determinados em cruces, pois não haviam espiroquetas livres na amostra, possivelmente porque o agente patogênico não estava em um ambiente propício para sua correta multiplicação.

A avaliação de motilidade foi avaliada em cruces, e os resultados estão dispostos na tabela 18.

Os grupos 8 e 10 mantiveram-se negativos durante todos os momentos.

Os grupos 9, 11, 12, 13 e 14 apresentaram espiroquetemia positiva em todos momentos analisados.

5.3 Considerações finais

Uma galinha do grupo tratado apresentou sintomatologia de borreliose aviária, entretanto sobreviveu a infecção e apresentou recuperação clínica e laboratorial, elevação da concentração de IgY, voltou a se alimentar e retomou a ovipostura. Esta ave apresentou resultados de qPCR positivo no momento 10 e espiroquetemia positiva no momento 11, porém estava clinicamente e laboratorialmente saudável, podendo indicar uma perspectiva promissora para futuros estudos utilizando a terapia fotodinâmica, utilizando novos protocolos e novas associações.

TABELA 3. Média e desvio padrão dos valores de peso corporal (Kg) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	1,69±	6*	1,73 ±	6*	1,82 ±	6*	1,90±	6*	1,89±	6*	1,89±	6*	1,79 ±	6*
	0,29a		0,15a		0,14a		0,18a		0,15a		0,16a		0,16a	
5	1,68±	6*	1,62±	4*	1,59 ±	6*	1,74±	5*	1,68±	6*	1,69±	4*	1,6 ±	6*
	0,29a		0,10a		0,24a		0,21a		0,15a		0,12a		0,17a	
6	1,76	6*	1,5	1*	1,49	6*	----	0	----	0	----	0	1,34	1*
7	1,74	6*	1,49	1*	1,89	6*	----	0	----	0	----	0	1,32	1*
8	1,76	6*	1,38	1*	1,34	5*	----	0	----	0	----	0	1,31	1*
9	1,74	6*	1,31	1*	1,21	5*	----	0	----	0	----	0	1,23	1*
10	1,73	6*	1,4	1*	1,22	4*	----	0	----	0	----	0	1,16	1*
11	1,74	6*	1,46	1*	1,43	4*	----	0	----	0	----	0	1,25	1*
12	1,73	6*	1,48	1*	1,47	4*	----	0	----	0	----	0	1,33	1*
13	1,70	6*	1,5	1*	1,45	4*	----	0	----	0	----	0	1,52	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 4. Média e desvio padrão dos valores de Fosfatase alcalina sérica (UI/l) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	516,8± 270,5a	6*	1187,8± 584,9a	6*	482,0± 297,4a	6*	601,3± 367,6a	6*	672,3± 302,6a	6*	602,8± 370,4a	6*	736,6± 771,06a	6*
5	876,33± 695,2a	6*	175± 76,4a	4*	351,5± 211,2a	6*	98,6± 34,0A	5*	14,8± 81,5A	6*	99± 52,9a	4*	104,6± 40,20A	6*
6	682,67	6*	565,0	1*	156,5	6*	----	0	----	0	----	0	65,0	1*
7	541,83	6*	294,0	1*	279,6	6*	----	0	----	0	----	0	69,0	1*
8	463,17	6*	494,0	1*	214,2	5*	----	0	----	0	----	0	127,0	1*
9	535,50	6*	644,0	1*	376,6	5*	----	0	----	0	----	0	146,0	1*
10	613,0	6*	843,0	1*	929,5	4*	----	0	----	0	----	0	419,0	1*
11	488,17	6*	705,0	1*	772,5	4*	----	0	----	0	----	0	1351,0	1*
12	528,8	6*	714,0	1*	388,7	4*	----	0	----	0	----	0	1164,0	1*
13	385,0	6*	416,0	1*	685,7	4*	----	0	----	0	----	0	545,0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 5. Média e desvio padrão dos valores de Aspartato aminotransferase (AST) (UI/l) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	207,6± 87,1a	6*	279,3± 146,2a	6*	233,6± 61,65a	6*	227± 31,91a	6*	254,5± 54,39a	6*	243,3± 39,10a	6*	241,6± 39,08a	6*
5	204± 92,6a	6*	405,7± 87,26A	4*	453,5± 69,36a	6*	432,8± 37,61a	5*	461,0± 107,49a	6*	414,0± 91,26a	4*	420,0± 90,5A	6*
6	236,1	6*	500,0	1*	425,6	6*	----	0	----	0	----	0	598,0	1*
7	241,8	6*	260,0	1*	455,6	6*	----	0	----	0	----	0	519,0	1*
8	216,8	6*	350,0	1*	498,6	5*	----	0	----	0	----	0	540,0	1*
9	224,6	6*	238,0	1*	534,4	5*	----	0	----	0	----	0	551,0	1*
10	237,6	6*	539,0	1*	435,7	4*	----	0	----	0	----	0	357,0	1*
11	227,1	6*	575,0	1*	150,5	4*	----	0	----	0	----	0	329,0	1*
12	241,6	6*	590,0	1*	316,2	4*	----	0	----	0	----	0	269,0	1*
13	246,3	6*	443,0	1*	324,25	4*	----	0	----	0	----	0	211,0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 6. Média e desvio padrão dos valores de Alanina aminotransferase (ALT) (UI/l) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	22,8±	6*	33,6±	6*	96±	6*	34±	6*	51,1±	6*	39,3±	6*	46,8±	6*
	16,4a		13,7a		147,6a		19,14a		24,31a		29,32a		37,4a	
5	23,6±	6*	7,5±	4*	25,3±	6*	9,4±	5*	20,0±	6*	16,5±	4*	12,0±	6*
	17,2a		1,29A		15,8a		2,30a		15,86a		6,14a		5,2a	
6	19,2	6*	13	1*	27,5	6*	----	0	----	0	----	0	13	1*
7	29,17	6*	132	1*	113,6	6*	----	0	----	0	----	0	126	1*
8	32,1	6*	270	1*	124,4	5*	----	0	----	0	----	0	285	1*
9	33,1	6*	187	1*	114,4	5*	----	0	----	0	----	0	65	1*
10	28,6	6*	76	1*	76,7	4*	----	0	----	0	----	0	4	1*
11	45,3	6*	66	1*	18,2	4*	----	0	----	0	----	0	2	1*
12	22,5	6*	40	1*	8,5	4*	----	0	----	0	----	0	8	1*
13	14,5	6*	26	1*	6,5	4*	----	0	----	0	----	0	12	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 7. Média e desvio padrão dos valores de Colesterol sérico (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	166,6±	6*	201,0±	6*	279,5±	6*	186±	6*	225,1±	6*	200,8±	6*	200,2±	6*
	41,8a		47,45a		210,37a		57,06a		53,56a		76,01a		71,66a	
5	156,7±	6*	244,5±	4*	605,3±	6*	273,6±	5*	251,6±	6*	238,2±	4*	269,2±	5*
	35,3a		18,19a		198,91a		109,03A		77,78A		74,25A		74,95A	
6	135,8	6*	287	1*	345,3	6*	----	0	----	0	----	0	352	1*
7	161,8	6*	740	1*	492,3	6*	----	0	----	0	----	0	497	1*
8	143,1	6*	780	1*	722,2	5*	----	0	----	0	----	0	728	1*
9	137,8	6*	711	1*	597,6	5*	----	0	----	0	----	0	954	1*
10	180,8	6*	472	1*	343,7	4*	----	0	----	0	----	0	488	1*
11	139,1	6*	190	1*	145	4*	----	0	----	0	----	0	344	1*
12	214,8	6*	437	1*	127,7	4*	----	0	----	0	----	0	255	1*
13	192,6	6*	212	1*	118,7	4*	----	0	----	0	----	0	257	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 8. Média e desvio padrão dos valores de Triglicerídeos séricos (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	1112,6±	6*	1732,8±	6*	2279,0±	6*	808,5±	6*	2035±	6*	1321,1±	6*	2078,3±	6*
	577,7a		462,25a		2140,51a		600,42a		652,89a		1166,72a		1151,02a	
5	1021,0±	6*	189±1	4*	598,6±	6*	186,8±	5*	204,8±	6*	181±	4*	278,2±	5*
	391,0a		11,93A		380,38a		144,33A		149,64a		36,45A		173,66A	
6	1328,8	6*	193,0	1*	192,3	6*	----	0	----	0	----	0	141	1*
7	1502,5	6*	1200,0	1*	827,1	6*	----	0	----	0	----	0	1200	1*
8	1839,0	6*	4900,0	1*	2622,8	5*	----	0	----	0	----	0	8080	1*
9	1525,8	6*	1200,0	1*	2304,4	5*	----	0	----	0	----	0	1290	1*
10	1230,0	6*	1180,0	1*	267	4*	----	0	----	0	----	0	96	1*
11	1287,8	6*	763,0	1*	1957,5	4*	----	0	----	0	----	0	171	1*
12	1180,5	6*	1200,0	1*	520,2	4*	----	0	----	0	----	0	173	1*
13	1082,8	6*	1310,0	1*	547,2	4*	----	0	----	0	----	0	1200,0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 9. Média e desvio padrão dos valores do volume globular (%) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	40,1±3,7a	6*	39,5±6,95a	6*	40,8±4,75a	6*	28,1±2,14A	6*	29,1±2,93a	6*	30,3±3,33a	6*	29,5±2,59a	6*
5	30,6±3,7a	6*	15±4,08A	4*	23,1±5,56a	6*	12,6±4,83A	5*	13±2,9A	6*	12±2,94 ^a	4*	18,3±2,56A	5*
6	24	6*	24	1*	18,8	6*	----	0	----	0	----	0	15	1*
7	27,1	6*	15	1*	16	6*	----	0	----	0	----	0	17	1*
8	26,5	6*	20	1*	16,2	5*	----	0	----	0	----	0	15	1*
9	27,1	6*	20	1*	15,7	5*	----	0	----	0	----	0	23	1*
10	36	6*	33	1*	33,5	4*	----	0	----	0	----	0	25	1*
11	30	6*	31	1*	31,2	4*	----	0	----	0	----	0	29	1*
12	27,3	6*	28	1*	28	4*	----	0	----	0	----	0	34	1*
13	38,3	6*	25	1*	30,5	4*	----	0	----	0	----	0	30	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 10. Média e desvio padrão dos valores de proteína plasmática total (g/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	6,6±1,32a	6*	5,3±0,51a	6*	5,5±0,45a	6*	7,3±0,33a	6*	8,2±1,19A	6*	7,2±1,26a	6*	7,6±1,76a	6*
5	5,6±0,98a	6*	4,8±0,63a	4*	5,3±0,98a	6*	4,3±0,67a	5*	4,0±1,20a	6*	4,4±0,99a	4*	4,8±0,87a	5*
6	5,8	6*	4,2	1*	4,7	6*	----	0	----	0	----	0	5,0	1*
7	6,2	6*	5,6	1*	8,6	6*	----	0	----	0	----	0	6,4	1*
8	6,2	6*	9	1*	8,6	5*	----	0	----	0	----	0	5,0	1*
9	6,2	6*	10,6	1*	7,3	5*	----	0	----	0	----	0	8,0	1*
10	6,6	6*	9,6	1*	4,9	4*	----	0	----	0	----	0	5,8	1*
11	6,0	6*	7,4	1*	6,4	4*	----	0	----	0	----	0	4,6	1*
12	6,3	6*	6,6	1*	4,1	4*	----	0	----	0	----	0	4,6	1*
13	6,0	6*	8,0	1*	4,9	4*	----	0	----	0	----	0	6,6	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 11. Média e desvio padrão dos valores da Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) (espiroquetas/ml) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0a	6*	664.524± 92737,0A	4*	0a	6*	601.868± 121808,0A	5*	831.606± 387584,0a	6*	661.360± 51519,0A	4*	645.852± 71713,0A	5*
6	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
7	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
8	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
9	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
10	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	286.560	1*
11	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
12	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
13	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 12. Média e desvio padrão dos valores de espiroquetemia ($\times 10^7/\text{ml}$) e motilidade das espiroquetas das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0a	6*	5,28±	4*	0a	6*	23±	5*	106,17±	6*	84,5±	4*	38,75±	5*
			6,30 (++)a				37,68 (++)A		115,0 (+++)A		100,67 (++)A		71,11 (++)A	
6	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
7	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
8	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
9	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
10	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	286.560	1*
11	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
12	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
13	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 13. Média e desvio padrão dos valores de espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado (espiroquetas/campo) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0a	6*	62,95± 24,4A	4*	0a	6*	59,06± 23,3A	5*	81,88± 26,62A	6*	70,40± 23,49A	4*	55,22± 3,64A	5*
6	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
7	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
8	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
9	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
10	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
11	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
12	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
13	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 14. Média dos valores do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática indireto (ELISA indireto) padronizado (CDO*100/CUT off) (g/dL) de galinhas poedeiras, nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	25,44±34,7a	6*	21,8±27,73a	6*	41,2±39,4a	6*	45,6±71,13a	6*	20,2±13,6a	6*	22,3±12,95a	6*	6,6±12,02a	6*
5	31,1±21,3a	6*	10,0±12,10a	4*	25,2±36,21a	6*	21,2±42,76a	5*	5,0±7,13a	6*	16,0±12,11a	4*	1,1±7,76a	5*
6	18,0	6*	98,3	1*	40,5	6*	----	0	----	0	----	0	104,8	1*
7	18,6	6*	167,0	1*	12,8	6*	----	0	----	0	----	0	251,4	1*
8	23,8	6*	151,5	1*	18,6	5*	----	0	----	0	----	0	216,5	1*
9	17,5	6*	151,5	1*	13,7	5*	----	0	----	0	----	0	284,3	1*
10	46,7	6*	238,1	1*	54,9	4*	----	0	----	0	----	0	287,0	1*
11	23,4	6*	276,1	1*	31	4*	----	0	----	0	----	0	290,0	1*
12	44,7	6*	333,1	1*	36,3	4*	----	0	----	0	----	0	342,9	1*
13	41,7	6*	310,9	1*	45,5	4*	----	0	----	0	----	0	334,3	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 15. Porcentagem de galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) positivas para o exame de Imunofluorescência indireta (RIFI) (%) de, nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0	6*	40	4*	0	6*	40	5*	40	6*	50	4*	50	5*
6	0	6*	100	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	100	1*
7	0	6*	100	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	100	1*
8	0	6*	100	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	100	1*
9	0	6*	100	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	100	1*
10	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*
11	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*
12	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*
13	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 16. Média e desvio padrão dos valores de Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) (espiroquetas/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	Grupo doença	Grupo Imunossupressão	Grupo Luz	Grupo Riboflavina	Grupo Veículo	Grupo tratado
5	0a	412.167 ± 8495,10A	0a	418.500± 40362,11A	345.000± 43981,81A	357.667± 31551,02A	432.667 ± 33850,65A
6	0a	381.000 ± 2942,37A	0a	348.000± 10449.88A	386.167± 27021,60A	388.667± 56740,34A	364.883 ± 32999,49A
7	0a	259.500 ± 48471,64A	0a	241.667± 121115,92A	234.000± 192080,19A	242.833± 131031,93A	200.667 ± 161881,03A
8	0a	583.333 ± 142886,9A	0a	75.333± 116748,73A	104.33± 170538,75A	235.666±132276,48A	0a
9	0a	380.000 ± 93080,61A	0a	45.667± 111860,03A	43.833± 107369,30A	0a	131.833 ± 146048,51A
10	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a
11	0a	375.000 ± 91855,87A	0a	0a	0a	182.000± 141703,92A	172.333 ± 134593,71A
12	0a	0a	0a	127.833± 134593,71A	119.500± 131200,23A	37.000± 90631,12A	0a
13	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 17. Média dos valores de aglomerados de espiroquetas (/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015.

Grupo	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	++
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	++	++	+++	+++	+++	+	++
12	+	++	++	++	++	++	++	+
13	+	++	+++	+++	+	+	++	++
14	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Até 1 aglomerado
 ++ Até 2 aglomerados
 +++ Até 3 aglomerados
 ++++ Até 4 aglomerados

TABELA 18. Motilidade das espiroquetas das placas de cultivo celular, no momentos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015.

Grupo	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	++	-	-	-	-	-	-
12	++	++	-	-	-	-	-	-
13	++	++	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-	-	-

- Motilidade ausente
+ Motilidade pouco ativa
++ Motilidade ativa

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O tratamento utilizando a associação de luz ultravioleta e riboflavina não apresentou os resultados esperados nas condições em que o experimento foi realizado: - pois foi capaz desenvolver a doença em aves susceptíveis, uma vez que o índice de mortalidade do grupo tratado foi de 83,3%; - Não impediu o crescimento de *Borrelia anserina* no meio de cultivo BSK-H.

A imunossupressão levou a debilidade dos animais e depressão do sistema imunológico.

Referências

AMAND, W.B. Avian Clinical Hematology and Blood Chemistry. In: FOWLER, M.E. *Zoo and Wild Animal Medicine*, 2nd edition. Philadelphia, W.B. Saunders, p. 264-276, 1986.

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

ARAÚJO, L. M. P. C. Dendrímeros como carreadores da protoporfirina IX para a terapia fotodinâmica tópica do câncer de pele. *Dissertação de doutorado da Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo*, SP, 2010.

ATALIBA, A. C. Estudo de *Borrelia* spp. no Brasil. *Dissertação de mestrado da Universidade de São Paulo*, SP, 2006.

ATALIBA, A. C.; RESENDE, J. S.; YOSHINARI, N.; LABRUN, M. B. Isolation and molecular characterization of a Brazilian strain of *Borrelia anserina*, the agente fowl spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*.v. 83. p.145-149, 2007.

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

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

CALLAHAN, S. M.; WONGANAN, P.; OBENAUER-KUTNER, L.J.; SUTJIPTO, S.; DEKKER, J.D; CROYLE, M.A. Controlled inactivation of recombinant viruses with vitamin B2. *Journal of Virological Methods*. v.148, p.132–145, 2008.

CAMPBELL, T.W. Bioquímica Clínica de Aves. In: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2 Ed. São Paulo: Roca, 2012.

CARDO, L.J.; RENTAS, F.J.; KETCHUM, L.; SALATA, J.; HARMAN, R.; MELVIN, W.; WEINA, P.J.; MENDES, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Leishmania donovani infantum* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Vox Sanguinis*. v.90, p.85-91, 2006.

CARDO, L.J.; SALATA, J.; MENDEZ, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion and Apheresis Science*. v.37, p. 131–137, 2007.

CEPEDA, M. B. Transmissão experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758): Parâmetros Clínicos, Bioquímicos e Anátomo-Histopatológico. 2015. 68p. *Dissertação de Mestrado (em Ciências Veterinárias)apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, RJ, 2015.

CORBIN F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. *International Journal of Hematology*. v.76 (Suppl 2), p. 253-7, 2002.

CORDEIRO, M. D; MEIRELES, G. S.; SILVA, J. B.; SOUZA, M. M. S.; FONSECA, A. H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. Em cães no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. v.34, n. 3, p.251-256, 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*, v. 40, n. 1, p. 154-157, 1979.

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

DIAB, F. M; SOLIMAN, Z. R. An experimental study of *Borrelia anserina* in four species of *Argas* ticks. I. Spirochete localization and densities. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, v. 53, n. 2, p. 201-201, 1977.

FEITOSA, F.L.F. *Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico*. 2ª ed. Roca, São Paulo. p.754, 2008.

GAVA, A; BARROS, C. S. L; PILATI, C; BARROS, S. S; MORI, A. M. Intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilioidea) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v.21, n.2, p.49-59, 2001.

HORTA, M.C; LABRUNA, M. B; SANGIONI, L. A; VIANNA, M. C. B; GENNARI, S. M; et. al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.71, n.1, p.93-97, 2004.

HUMAIR, P. F. Birds and *Borrelia*. *International Journal of Medical Microbiology*. Suppl. 33. p.70-74, 2002.

HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNINGER, R. *Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos*. Vol. 1. Editorial Labor, S.A, p. 934-941, 1947.

JÚNIOR, I. M.; ZAHDI, M. R.; FILHO, A. B.; CRUZ, C. R. Doença de Lyme: diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.3, n.10. Rio de Janeiro, RJ. 2007.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. Elsevier: Academic Press, Amsterdam, 2008.

KLEIN, H.G. Pathogen inactivation technology: cleansing the blood supply. *Journal of Internal Medicine*, v. 257, p.224–237, 2005.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. v.2 p.963. Baltimore, 1984.

LABRUNA, M. B; RESENDE, J. S; MARTINS, N. R. S; JORGE, M. A. Criopreservação de uma amostra de espiroqueta em nitrogênio líquido. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 6, p. 551-553, 1999.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia Laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Editora Roca, São Paulo, SP, 2007.

LISBÔA, R. S. Estudo da transmissão experimental de *Borrelia anserina* (SAKHAROFF, 1981) POR *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 e avaliação comparativa de parâmetros clínicos e hematológicos em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758. *Dissertação de mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, RJ, 2006.

LISBÔA, R. S.; GUEDES JÚNIOR, 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.

LOPES, L. G. Avaliação da ação da riboflavina associada à radiação ultravioleta na inativação do *Anaplasma marginale* em sangue bovino conservado para transfusão e estudo das alterações hematológicas e bioquímicas durante o período de estocagem. *Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"*, Botucatu, SP, 2011.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*. v.23, n.2, p.237-243, 2000.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A., LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO, I. F. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection on antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

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

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

NINOV, K. Expressão de genes envolvidos no controle muscular do desenvolvimento da musculatura esquelética em galinhas. *Tese de doutorado*

apresentada à Universidade de São Paulo “Escola superior de agricultura Luis de Queiroz”. Piracicaba, SP. 2010.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova*, v.30, n.4, p.988-994, 2007.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. *Clinical Veterinary Microbiology*. 1ª ed. Wolfe Publishing, London, p. 292-303, 1994.

RENTAS, F; HARMAN, R; GOMEZ, C; SALATA. J; CHILDS, J; et al. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. v.47, 2007.

RIVETZ, B.; BOGIN, E.; WEISMAN, Y.; AVIDAR, J.; HADANI, A. Changes in the biochemical composition of blood in chickens infected with *Borrelia anserina*. *Avian Pathology*, v.6, n.4, p.343-351, 1977.

SACCO, S. R. Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado em bolsas para transfusão. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2013.

SANTOS, C. H. C.; SILVA, E. N. *Doenças das aves*. Editora Facta. Campinas, 2000.

SANTOS, M.; JUNIOR, V. H.; RODRIGUES, R. R.; TALHARI, S. Borreliose de Lyme. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. n.6. v.85. p.930-938, 2010.

SCHMIDT, E. M. S. Patologia Clínica em Aves. IN: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.: Editora Roca. São Paulo, SP, 2014.

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

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*. v.25, n. 5, p.801-807, 2002.

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

SOUZA, A. C. S; FERREIRA, C. V; JUCÁ, M. B; AOYAMA, H. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova*. v.28, n.5, p.887-891, 2005.

THRALL, M. A; Hematologia e Bioquímica Veterinária. Editora Rocca. 2007.

TIZARD, I. R. *Imunologia Veterinária*. Editora Elsevier. Nova York, 2010.

VASHIST, USHA. *Avaliação biológica, bioquímica e histopatológica das infecções experimentais causadas por Plasmodium (Bennettinia) Juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 e Borrelia anserina (Sakharoff, 1891) em Gallus gallus L. 1758*. 2011. 114p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.

WALKER, R. L.; GREENE, R. T.; NICHOLSON, W. L.; LEVINE, J. F. Shared flagellar epitopes of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia anserina*. *Veterinary Microbiology*. v.9, p.361-371, 1989.

WENDEL, S. A quimioprofilaxia de doenças transmissíveis por transfusão em componentes lábeis hemoterápicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.35, n.4, p.275-281, 2002.

YAMADA-JÚNIOR, A. M. Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica em periodontite induzida em ratos. *Dissertação de doutorado do Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares - autarquia associada à Universidade de São Paulo*. SP, 2007.

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira

Ação da luz ultravioleta associada à riboflavina na inativação da *Borrelia anserina* em soro sanguíneo de galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*)¹

Daniela Marques Maciel Dabus^{2*}, Leizinara Gonçalves Lopes², Brayan Sayed Lopez Castañeda², Adivaldo Henrique da Fonseca³, Matheus Dias Cordeiro³, Bruna de Azevedo Baeta³, Márcio Barizon Cepeda³, Antônio Cláudio Tedesco⁴, Miriam Tsunemi⁵, João Pessoa Araújo Jr⁶, Camila Malossi⁶, Adriano Sakai Okamoto², Raimundo Souza Lopes²

ABSTRACT- Dabus D.M.M., Gonçalves L.G., Castañeda B.S.L., Fonseca A.H., Cordeiro M.D., Baeta B.A., Cepeda M.B., Tedesco A.C., Araújo-Júnior J.P., Tsunemi M., Malossi C., Okamoto A.S., Lopes, R.S. 2015. [Action of ultraviolet light and riboflavin in the inactivation of *Borrelia anserina* in blood serum of chickens (*Gallus gallus domesticus*)] Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação de *Borrelia anserina* em soro sanguíneo de galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brazil. E-mail: danidabus@hotmail.com

Avian borreliosis is an acute septicemic disease caused by the spirochete *Borrelia anserina*, has a low incidence, however due to the growth of organic and rustic creations, greater concern for animal welfare and reducing the use of antibiotics in feed, there is concern about the emergence of disease outbreaks, which may cause economic losses. Thus, it becomes fundamental to search for alternative therapies, including, photodynamic therapy, such as the combination of ultraviolet (UV) light and riboflavin with the aim of controlling the disease. This study aimed to investigate the efficacy of treatment with riboflavin and UV light to inactivate or eliminate *B. anserina* from serum laying hens by diagnostic and laboratory tests and to check to the host immune response. The experiment was conducted in two stages. The first one was the *in vivo* step composed of 42 chickens, divided into seven groups of six birds: Group 1 (health); Group 2 (disease) inoculated with the serum parasitized by *Borrelia anserina*; Group 3 (immunosuppressant) receiving methylprednisolone; Group 4 (UV light) which received parasitized saline treated with UV light; Group 5 (riboflavin) which received parasitized serum treated with riboflavin; Group 6 (solvent group) parasitized receiving saline treated with 0.9% sodium chloride; Group 7 (treated) which received positive serum for *B. anserina* treated with ultraviolet light associated with riboflavin. The second one was the *in vitro* stage performed with cell culture plates, equally divided *in vivo* step. It was observed that the treatment did not show expected results in the inactivation or complete elimination of the agent. However, one bird from the treated group survived and showed clinical and laboratory recovery, presenting spirochetemia at the time 11 and qPCR positive at the time 10.

INDEX TERMS: Avian borreliosis, chickens, photodynamic therapy.,

¹Recebido em.....

Aceito para publicação em

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e saúde Pública, Seropédica, Cx. Postal 74548, Seropédica, RJ 23890-970, Brasil.

⁴Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade estadual de São Paulo (USP), Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual, e Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brasil.

⁵Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

⁶Instituto de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Distrito de Rubião Júnior, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

*Autor para correspondência: danidabus@hotmail.com

RESUMO.- A borreliose aviária é uma doença septicêmica aguda, causada pela espiroqueta *Borrelia anserina*, atualmente apresenta baixa incidência, porém devido ao crescimento das criações orgânicas e rústicas, maior preocupação com o bem estar animal e a diminuição do uso de antibióticos em rações, existe a preocupação com o surgimento de surtos da doença, que poderão causar prejuízos econômicos. Desta maneira, torna-se de fundamental importância a busca por terapias alternativas, entre elas, a terapia fotodinâmica, como a associação da luz ultravioleta (UV) e riboflavina, com o objetivo de controlar a enfermidade. Este estudo objetivou verificar a eficácia do tratamento com luz UV e riboflavina para inativar ou eliminar a *B. anserina* no soro de galinhas poedeiras, por meio de exames diagnósticos e laboratoriais, e verificar a resposta imunológica do hospedeiro. O experimento foi conduzido em duas etapas, a etapa *in vivo* foi formada por 42 galinhas, divididas em sete grupos, composto por seis aves: Grupo 1 (saúde); Grupo 2 (doença) inoculadas com soro parasitado por *B. anserina*; Grupo 3 (imunossupressor) que receberam metilprednisolona; Grupo 4 (luz UV) que receberam soro parasitado tratado com luz UV; Grupo 5 (riboflavina) que receberam soro parasitado tratado com riboflavina; Grupo 6 (grupo veículo) que receberam soro parasitado tratado com cloreto de sódio 0,9%; Grupo 7 (tratado) que receberam soro positivo para *B. anserina* tratado com luz ultravioleta associada à riboflavina. A etapa *in vitro*, foi realizada com placas de cultivo celular, divididas igualmente à etapa *in vivo*. Foi possível observar que o tratamento não apresentou resultado esperado na inativação ou completa eliminação do agente. No entanto, uma ave do grupo tratado sobreviveu e apresentou recuperação clínica e laboratorial, apresentando espiroquetemia no Momento 11 e qPCR positivo no momento 10.

INTRODUÇÃO

A *Borrelia anserina* (*B. anserina*) é o agente etiológico da borreliose aviária, uma doença septicêmica aguda, (Sakhraroff, 1891), que pode acometer diversas espécies de aves (WALKER, et al., 1989). Foi descrita pela primeira vez por Sakhraroff no Cáucaso, em 1891. No Brasil por Marchoux e Salimbeni, em 1903.

Os sinais clínicos da doença são severos, como diarreia e perda de peso, podendo evoluir para a morte (LISBOA et al., 2008), estes sinais podem levar a prejuízos econômicos para criadores. O tratamento baseia-se no uso de antibióticos (SOARES, et al., 2000).

A avicultura industrial está em mudança, devido à preocupação com o bem estar animal e a qualidade dos produtos gerados por eles, levando a um grande aumento em criações rústicas e orgânicas e a criação de animais ao ar livre, principalmente para produção de ovos. Desta forma, a possibilidade de ocorrer novos surtos de borreliose aviária é alta, devido à maior susceptibilidade as infestações por argasídeos nestes sistemas de criação (ATALIBA et al., 2008).

Devido ao questionamento do uso de antibióticos em animais de produção, bem como a possibilidade de resistência microbiana, terapias alternativas têm sido alvo para pesquisas, dentre elas destaca-se a terapia fotodinâmica. A associação da luz ultravioleta (UV) com riboflavina é eficiente na inativação de diversos agentes patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários, sem causar danos ao organismo, pois não produz subprodutos tóxicos que causariam lesões aos componentes sanguíneos e não induz a efeitos colaterais. Desta forma, preservam a atividade e a funcionalidade do sangue (CORBIN, 2002).

O estudo da borreliose aviária apresenta evolução lenta, tendo em vista o impacto econômico que surtos da doença podem representar. A medicina de aves está evoluindo, juntamente com o avanço na avicultura industrial para produção de carne e ovos. Além da maior preocupação com bem estar animal e o aumento de criações de animais orgânicos e de forma rústica. Esse desenvolvimento tem levado a necessidade de um maior conhecimento sobre a doença, a fim de evitar um impacto econômico grave. Por isso o objetivo do estudo foi propor uma nova terapia, a terapia fotodinâmica, para ser utilizada no controle e tratamento da doença, objetivando avaliar se o sangue parasitado com *Borrelia anserina* após tratamento com luz ultravioleta associada à riboflavina, quando inoculado em aves, foi capaz de provocar a enfermidade e, quando inoculado em meio BSK-H foi capaz de crescer, além de verificar a resposta imunológica e concentração de IgY das galinhas parasitadas e não parasitadas por *Borrelia anserina* após terapia fotodinâmica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais. Foram selecionadas 42 galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem Novagen, provenientes de uma Granja industrial de produção de ovos (Granja Moretto), vacinadas de acordo com o calendário sanitário da empresa, com

aproximadamente 900 dias de idade. Os animais foram divididos em sete grupos experimentais, cada grupo formado por seis galinhas.

As galinhas passaram por período de adaptação de sete dias e após esse período foram realizados exames laboratoriais e de diagnóstico

Foram selecionados sete frangos (*Gallus gallus domesticus*) com aproximadamente 40 dias de idade, que serviram como doadores de soro parasitado, para posterior inoculação dos grupos experimentais.

Grupos experimentais. Foram formados catorze grupos experimentais, sendo sete grupos experimentais utilizando animais denominada de etapa *In vivo* e, sete grupos experimentais utilizando placas de cultivo celular, denominado de etapa *In vitro*.

Etapas *in vivo*. Os animais foram divididos em: Grupo 1 (grupo saúde), formado por aves que não foram expostas a nenhum tratamento ou inoculação; Grupo 2 (grupo doença) formado por galinhas positivas para borreliose aviária; Grupo 3 (grupo imunossupressor) formado por aves que receberam somente o Depo medrol®; Grupo 4 (grupo luz), aves que receberam soro parasitado tratado por luz ultravioleta; Grupo 5 (grupo riboflavina), aves que receberam soro parasitado tratado com riboflavina; Grupo 6 (grupo veículo), aves que receberam soro parasitado tratado com cloreto de sódio a 0,9%; Grupo 7 (grupo tratado), que receberam cepa de *B. anserina* tratada por luz ultravioleta associada à riboflavina.

Etapas *in vitro*. Para a inoculação em placas de cultivo celular, sete grupos foram formados: o Grupo 8 (grupo saúde placa) recebeu soro proveniente de animais saudáveis, sem doença. O Grupo 9 (grupo doença placa) recebeu sangue proveniente de animais infectados com *B. anserina*. O grupo 10 (grupo imunossupressão placa) recebeu soro de animais saudáveis imunossuprimidos com Depo Medrol®; O Grupo 11 (grupo luz placa) recebeu soro infectado tratado com luz ultravioleta. O Grupo 12 (grupo riboflavina placa) recebeu soro infectado tratado com riboflavina diluída em cloreto de sódio 0,9%. O Grupo 13 (grupo veículo placa) recebeu soro proveniente infectado tratado com cloreto de sódio a 0,9%. O Grupo 14 (grupo tratamento placa) recebeu soro infectado tratado com a associação de luz ultravioleta e riboflavina.

Manejo dos animais. Os animais foram alojados em gaiolas, em ambiente telado e ventilado, receberam água *ad libitum* e ração elaborada pelo Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp – Botucatu, com suplemento mineral-vitamínico isento de coccidiostático e sem promotor de crescimento.

No momento zero (M0) as aves passaram por um período de sete dias para adaptação.

Imediatamente após o período de adaptação de sete dias, no momento um (M1), foram realizados exame clínico segundo Feitosa (2008), cálculo de espiroquetemia de acordo com Shommein e Khogali (1974), avaliação por meio de microscopia de campo escuro segundo Dhawedkar e Dhanesar (1983), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), reação em Cadeia da Polimerase (PCR), dosagem de imunoglobulina Y, análise bioquímica sérica de colesterol, triglicerídeos, fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteína plasmática total e volume globular segundo Thrall (2007), das 42 galinhas poedeiras. As amostras foram colhidas por venopunção (veia ulnar e metatársica), com a adequada contenção física dos animais, de forma tranquila, sem manter os animais com a cabeça para baixo e imobilizando a região do tarso (pernas) e asas (Feitosa, 2008), e com antisepsia local, utilizando álcool iodado. Foi colhido 1,0 mL de sangue por meio de venopunção da veia ulnar, em tudo criogênico contendo EDTA 3%, para a realização do esfregaço sanguíneo, volume globular e proteína plasmática total. Para a realização da espiroquetemia em campo escuro foi colhido sangue por meio de punção da veia metatársica em seis tubos capilares. Para os exames sorológicos e de bioquímica sérica foi colhido 4,0 mL de sangue por meio de punção da veia ulnar em tubos contendo gel e ativador de coágulo, que foram centrifugados a 5000 rpm durante oito minutos. O soro foi separado e acondicionado em tubos criogênicos a -20°C.

Inóculo de *Borrelia anserina*. O inóculo de *Borrelia anserina* foi obtido a partir da cepa de *B. anserina* PL proveniente do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, Rio de Janeiro – RJ, cedida gentilmente pelo Professor Doutor Adivaldo Henrique da Fonseca.

Foi inoculado 0,5 ml da cepa de *B. anserina* em um frango (*Gallus gallus domesticus*) de aproximadamente 40 dias de vida, pesando aproximadamente 2,5 kg, para a replicação da cepa. Este animal foi acompanhado até atingir o pico de espiroquetemia, o que ocorreu no quinto dia após a inoculação, quando foi realizada a coleta de sangue, para obtenção do inóculo para as aves doadoras de soro parasitado. Foi coletado sangue por meio de venopunção da ulnar e metatársica, o qual foi acondicionado em tubos contendo gel ativador de coágulo. O animal foi adequadamente

contido, por meio de contenção física. Foi realizada antissepsia local com iodo degermante, solução de digliconato de clorexidina degermante a 2% e álcool iodado. As penas do animal foram cobertas com um pano e a coleta foi realizada com um sistema a vácuo, utilizando escalpe vacutainer. A coleta foi realizada de maneira aséptica, a fim de evitar contaminação por outros patógenos. Para a obtenção do soro, o sangue foi centrifugado a 5000 rpm durante oito minutos e foi aliqotado em capela de fluxo laminar com material estéril.

Antes de inocular o soro obtido, foi realizado pelo serviço de Ornitopatologia da FMVZ – Unesp – Botucatu, o cultivo em meio Brain heart infusion (BHI).

Após o cultivo resultar em negativo, foi inoculado 0,5 ml em seis frangos doadores de aproximadamente 3 kg e 40 dias, os animais foram acompanhados até o pico de espiroquetemia. Neste dia foi realizada coleta de sangue, procedendo da mesma maneira que no frango replicador da cepa. O soro proveniente desses animais resultou em um “pool” das amostras, que foi aliqotado em capela de fluxo laminar com material estéril e separados para cada grupo experimental.

A cepa da *B. anserina* inoculada nos grupos experimentais obteve concentração de 440.000 espiroquetas/ml. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando microscópio de campo escuro (Nikon E200®), de acordo com Dhawedkar e Dhanesar (1983).

Redução do Patógeno (riboflavina associada à luz ultravioleta). A técnica de terapia fotodinâmica utilizada para tratamento do soro parasitado por *B. anserina* foi semelhante ao modelo preconizado por Rentas et al. (2007), Cardo et al. (2007), Lopes (2011) e Sacco (2013) modificado. O sistema usado para a irradiação atuou no comprimento de onda na faixa 365 nm. O dispositivo usado neste estudo foi o equipamento DNA Wokstation (Loccus Biotechnology®), com sistema de luz contínua, em placas de cultivo celular de 12 poços, foram armazenados 3,6 mL da suspensão de *Borrelia anserina* a qual foi adicionada a um volume fixo da solução de riboflavina e cloreto de sódio a 0,9%. A irradiação foi aplicada de acordo com os grupos experimentais: os grupos 4 (grupo luz) e 11 (grupo luz placa) receberam somente a irradiação de luz UV; os grupos 7 (grupo tratado) e 14 (grupo tratado placa) receberam a irradiação com luz UV associada à riboflavina. Este material foi submetido a uma radiação unilateral de luz ultravioleta com dose de luz de 6.24 J/mL, agitado constantemente por 87 minutos. Todo o processo foi feito em fluxo laminar com material estéril. Após os procedimentos de inativação as amostras foram inoculadas em aves imunossuprimidas e placas de cultivo celular contendo meio BSK-H para posterior avaliação conforme descrito na segunda etapa experimental.

Delineamento experimental. Etapa *in vivo*. No momento dois (M2), as aves dos grupos experimentais 2 (grupo doença), 3 (grupo imunossupressor), 4 (grupo luz), 5 (grupo riboflavina), 6 (grupo veículo), e 7 (grupo tratado), foram submetidas à imunossupressão, utilizando 30 mg/kg de acetato de metilprednisolona (Depomedrol®), por via intramuscular, em dose única. No dia seguinte, momento três (M3), foi realizado o tratamento do sangue infectado por *B. anserina* utilizando luz ultravioleta associada à riboflavina.

Imediatamente após o tratamento (M3), no momento quatro (M4) foi realizada a inoculação das aves, por via intramuscular. O Grupo 1 (grupo saúde) não foi submetido a nenhuma inoculação; O Grupo 2 (grupo doença) recebeu 0,25 mL de soro infectado por *B. anserina* não tratado; Grupo 3 (grupo imunossupressor) formado por animais que receberam somente o imunossupressor, na dose de 30 mg/kg (Depo medrol®); O Grupo 4 (grupo luz) recebeu 0,25 mL de soro infectado tratado com luz ultravioleta; O Grupo 5 (grupo riboflavina) que recebeu 0,25 mL de soro infectado tratado com riboflavina diluída em cloreto de sódio a 0,9%; O Grupo 6 (grupo veículo) recebeu 0,25 mL de soro infectado tratado com cloreto de sódio a 0,9%; O Grupo 7 (grupo tratamento) recebeu 0,25 mL de soro parasitado por *B. anserina*, tratado com luz ultravioleta associado à riboflavina.

As aves foram acompanhadas diariamente desde a inoculação, e durante 45 dias após inoculação, onde foi avaliado o estado clínico. A cada cinco dias foram coletadas amostras para a realização dos exames laboratoriais e de diagnóstico.

Delineamento experimental. Etapa *in vitro*. Para a inoculação em meio de cultura, foi realizada avaliação da cepa de *B. anserina* por meio de microscopia de campo escuro para o diagnóstico de borreliose. Foi utilizado 0,25 mL da cepa parasitada por *B. anserina* em 1,25 mL de meio Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) com 6 % de soro de coelho, acondicionado em placas para cultivo celular de 12 poços. Todo o processo de inoculação foi feito em capela de fluxo laminar com material estéril.

O Grupo 8 (grupo saúde placa) recebeu soro proveniente de animais saudáveis, sem doença. O Grupo 9 (grupo doença placa) recebeu sangue proveniente de animais infectados com *B. anserina*. O grupo 10 (grupo imunossupressão placa) recebeu soro de animais saudáveis imunossuprimidos com Depo Medrol®; O Grupo 11 (grupo luz placa) recebeu soro infectado tratado com luz

ultravioleta. O Grupo 12 (grupo riboflavina placa) recebeu soro infectado tratado com riboflavina diluída em cloreto de sódio 0,9%. O Grupo 13 (grupo veículo placa) recebeu soro proveniente infectado tratado com cloreto de sódio a 0,9%. O Grupo 14 (grupo tratamento placa) recebeu soro infectado tratado com a associação de luz ultravioleta e riboflavina.

Foi realizado acompanhamento, até o 45º dia após a inoculação, onde a cada cinco dias foram realizados exames diagnósticos (qPCR e espiroquetemia em campo escuro) e 0,5 mL do meio de cultura foi repicado para um novo meio.

Avaliações das amostras e exames. Etapa *In vivo*. Exame clínico. Os animais foram observados diariamente quanto ao estado geral dos animais e do ambiente, verificando a produção de ovos, ingestão de água, estado das fezes e penas. A cada cinco dias foi realizada pesagem das aves, utilizando balança eletrônica, aferição de temperatura utilizando termômetro de mercúrio, avaliação de mucosas, e inspeção dos animais, com adequada contenção física de forma tranquila, sem manter os animais com a cabeça para baixo e imobilizando a região do tarso (pernas) e asas (Feitosa, 2008).

Bioquímica sérica. Após centrifugação do sangue total em laboratório, foi utilizado soro para realização dos exames de bioquímica sérica, onde foram dosadas Fosfatase alcalina (FA), Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Colesterol e Triglicerídeos. Os exames foram realizados em aparelho automático Cobas Mira Plus®, utilizando kits bioquímicos da Bioclin®. Foram utilizados como intervalo de referência fisiológicos os dados do Sistema Internacional de Informação das Espécies (Conventional U.S.S Units – Outubro de 1999) para *Gallus gallus*, calculado para ambos os sexos e todas as idades combinadas, são valores de referência de amostras apresentadas por 11 instituições e Campbell Apud Thrall et al., (2012). Os valores de referência utilizados estão descritos na Tabela 1.

Volume Globular e Proteína Total. Foi coletado sangue por meio de punção venosa e armazenado em criotubos contendo EDTA 3%. Para a realização do Volume Globular (VG) foi utilizada a técnica descrita por Lassen e Weiser Apud Thrall (2007), por meio do exame de microhematócrito. Para a determinação da concentração de proteína plasmática total foi utilizada a técnica de refratometria descrita por Lassen e Weiser in Thrall (2007). Como intervalos de referência fisiológicos, foram utilizados os dados do Sistema Internacional de Informação das Espécies (Conventional U.S.A. Units – Outubro de 1999) e Campbell in Thrall et al., (2012). Os valores estão descritos na Tabela 2.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Após centrifugação do sangue em laboratório, foi utilizado soro para realização da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). As amostras foram colhidas a cada cinco dias. O protocolo para a realização do exame foi semelhante à técnica descrita por Horta et al. (2004).

As lâminas com 12 poços contendo antígeno foram feitas a partir de amostras positivas para *B. anserina*, no Laboratório de Doenças Parasitárias – Cultivo de Células e de Hemoparasitos, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Estas lâminas estavam sob refrigeração a -20°C.

Após descongelamento das lâminas, em cada lâmina de RIFI foram realizados 12 testes, sendo um controle positivo (soro de animal positivo para *B. anserina*) e um controle negativo (soro de animal negativo para *B. anserina*).

Para cada teste, as amostras de soro foram diluídas em PBS (solução fosfato tamponada), na diluição de 1:32, e a seguir depositadas na lâmina contendo antígeno. Após incubação em estufa a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas em PBS e secas em temperatura ambiente. Foi adicionado conjugado anti-IgY com diluição de 1:40 em PBS, em cada lâmina. Durante 30 minutos foram incubadas em estufas a 37°C e ao abrigo de qualquer fonte de luz. As lâminas foram lavadas em PBS e secas em temperatura ambiente ao abrigo de luz.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência. Foram considerados positivos os soros com títulos 1:32.

Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR). Foi utilizado sangue total para realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As amostras foram colhidas a cada cinco dias.

O DNA das amostras de sangue das galinhas foi extraído de 10 µL do sangue coletado, utilizando-se o Illustra Blood Mini Spin Kit. O DNA extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C, até o momento da realização das provas. Controles negativos (água nuclease free) foram adicionados a cada bateria de extração.

O par de primers escolhidos foi BorAns-fla F 5' CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 3' e BorAns-fla R 5' ACACCCATACCAGCAGCATC 3'. Foi testado a análise *in silico* no PRIMER BLAST, e foi observado que esse conjunto reconhece apenas membros do gênero *Borrelia*.

No resultado da análise "in silico" foi identificado que o mesmo amplificava fragmento de 124 bp de várias espécies de *Borrelia*. O Tm ficou próximo dos 60°C.

Os primers não alinham com outra bactéria e também não alinham com a espécie de estudo *Gallus gallus domesticus*.

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 µL, contendo 10µL de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 µL DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting com fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado em cada placa o controle negativo (água nuclease free).

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10 foram observados os resultados demonstrados na Figura 1 e Figura 2. Na análise dos resultados dessas reações utilizando esse conjunto de primers, foi observado uma eficiência de 86,21% e r2 de 1, entretanto, na análise da curva de melting (Figura 1) não foi observado amplificação da amostra negativa, sendo este conjunto de primers escolhido para a realização do exame.

Para controle interno das reações, foi utilizado o par de primers normalizadores GAPDH F 5' TGGAGAGATGGCAGAGGTG 3' e GAPDH 5' AACAGAGACATTGGGGGTTG 3' (Ninov, 2010).

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 µL, contendo 10µL de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 µL DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) (Figura 22). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting (Figura 3), utilizando o fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado em cada placa o controle negativo (água nuclease free).

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10, foram observados os resultados demonstrados na Figura 3 e Figura 4. Na análise dos resultados dessas reações utilizando esse conjunto de primers, foi observada uma eficiência de 91,28% e r2 de 0,975 e, na análise da curva de melting (Figura 3) e todas as amostras testadas amplificaram, com exceção do controle negativo sendo este conjunto de primers escolhido para a normalização das reações.

Após a quantificação das amostras, foi realizado um cálculo para correção dos valores de qPCR. O cálculo foi realizado a partir do maior valor obtido das quantificações utilizando o primer GAPDH, onde este valor foi dividido pelo valor de cada quantificação e este foi multiplicado pelo valor da quantificação obtida quando utilizado os primers *Borrelia anserina* fla gene.

Espiroquetemia em campo escuro. As amostras foram colhidas a cada cinco dias, por meio de punção da veia metatársica, em seis tubos capilares e posteriormente centrifugados em alta velocidade para separação do soro.

A motilidade e quantificação foram avaliadas de acordo com Dwawedkar e Dhanesar (1983) em microscópio de campo escuro (Nikon E200®), utilizando a objetiva de 20x. A contagem foi realizada na câmara de Neubauer e quando necessário foi utilizada diluição do soro em solução de HBSS (Hank's Balanced Salt Soln), na concentração de 1:10

A motilidade foi avaliada em cruzes, sendo zero para ausência de motilidade, uma cruz para motilidade baixa, duas cruzes para motilidade ativa, três cruzes para motilidade vigorosa e quatro cruzes para motilidade intensa.

Espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado. O cálculo de espiroquetemia foi realizado semelhante ao descrito por Shommein e Kogali (1974) por meio de esfregaço sanguíneo corado com o corante comercial Panótico rápido Laborclin® e Wright, onde foi realizada a contagem de 50 campos aleatórios e realizada a média das espiroquetas por campo.

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) indireto. Após centrifugação do sangue total em laboratório, foi utilizado soro para realização do exame.

Os soros obtidos foram submetidos à pesquisa de anticorpos da classe de Imunoglobulina Y (IgY) contra antígeno bruto de *B. anserina* utilizando o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) indireto padronizado por Cordeiro et al. (2012).

Neste ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 orifícios (NUNC Surface®) sensibilizadas com 100 µL do antígeno de *B. anserina*, cepa oriunda de Pedro Leopoldo - MG, diluído a 5 µg/mL em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas durante 12 horas em câmara úmida à 4°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com Tampão salino fosfato (PBS Tween 20 0,05% pH 7,4), posteriormente bloqueadas com 200 µL de Leite em pó 6% diluído em PBST e incubadas em câmara úmida por 90 minutos, em estufa bacteriológica a 37° Celsius. Em seguida realizaram-se novamente três lavagens das placas com PBST.

Foram utilizadas 10 amostras negativas de animais previamente testados e um controle positivo em duplicata de um animal inoculado com antígeno inativado de *B. anserina*. Os 10 controles negativos, o controle positivo e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:800 em PBST e dispostos 100 µL nas placas, que foram incubadas à 37° Celsius por 90 minutos e, posteriormente lavadas como na etapa anterior. Então, foi disposto 100 µL do conjugado IgG de coelho (KPL®) na diluição de 1:4000 em PBST com mais 90 minutos de incubação nas condições citadas anteriormente, seguindo novamente as lavagens das placas. Após esta última incubação foram empregados 100 µL do substrato revelador Paranitrofenilfosfato de Sódio (PNPP - SIGMA Chemical) diluído em Tampão de Dietanolamina pH 9,8 na concentração de 1 mg/mL. As leituras das placas foi realizada em espectrofotômetro para microplacas de 96 poços, durante 15 minutos (Termo Scientific® UniscienceMultiskan FC), sob comprimento de onda de 405 nm.

A linha de corte (*cut off*) foi obtida e estimada pelo valor da média das densidades ópticas dos controles negativos multiplicado por 2,5. A atividade imunológica dos soros testes foi calculada para determinação das amostras positivas em cada diluição, considerando o soro controle positivo e os negativos, como a equação a seguir (MACHADO et al., 1997):

$$\text{Valor real} = \frac{(\text{Densidade óptica amostra} - \text{média de negativos})}{(\text{Média de positivos} - \text{média de negativos})}$$

Avaliações das amostras e exames. Etapa *In vitro*. Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qPCR). As amostras de meio de cultura celular foram retiradas do meio de cultivo BSK-H, a cada cinco dias, realizadas junto com o repique da placa celular, realizado em capela de fluxo laminar com material estéril.

O DNA foi extraído de 10 µL do meio, onde este foi centrifugado a 9197 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi retirado, o material restante foi ressuspensionado em 100 µL de H₂O nuclease free e 100 µL de resina Chelex 110® (BioRad), foi retirado o sobrenadante e acondicionado em um microtubo de 1,5 mL. O DNA extraído foi armazenado sob congelamento a -20°C, até o momento da realização das provas. Controles negativos (água nuclease free) foram adicionados a cada bateria de extração.

O par de primers escolhidos foi BorAns-fla F 5' CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 3' e BorAns-fla R 5' ACACCCATACCAGCAGCATC 3'. Foi testado a análise *in silico* no PRIMER BLAST, e foi observado que esse conjunto reconhece apenas membros do gênero *Borrelia*.

No resultado da análise "in silico" foi identificado que o mesmo amplificava fragmento de 124 bp de várias espécies de *Borrelia*. O Tm ficou próximo dos 60°C.

Os primers não alinharam com outra bactéria e também não alinharam com a espécie de estudo *Gallus gallus domesticus*.

As reações de qPCR foram realizadas com volumes final de 20 µL, contendo 10 µL de goTaq® qPCR Master Mix (Promega), 300 nM de cada primer, 2 µL DNA extraído e água nuclease free qsp. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). O sistema goTaq® qPCR Master Mix Promega goTaq® qPCR Master Mix Promega utiliza agente fluorescente intercalante denominado SYBR® Green I. Os ciclos de temperatura e tempo consistiram em uma desnaturação inicial por 5 minutos a 95°, seguida de um número total de 40 ciclos, onde a cada ciclo o processo foi: 15 segundos a 95°, 1 minuto a 60°, 15 segundos a 95°. Em seguida foi realizado o ciclo da curva de melting com fluoróforo intercalante. Em cada bateria de reações foi testado em cada placa o controle negativo (água nuclease free).

Quando essa reação foi aplicada à amostra padrão diluída serialmente em razão 10 foram observados os resultados demonstrados na Figura 1 e Figura 2. Na análise dos resultados dessas reações utilizando esse conjunto de primers, foi observado uma eficiência de 86,21% e r² de 1, entretanto, na análise da curva de melting (Figura 1) não foi observado amplificação da amostra negativa, sendo este conjunto de primers escolhido para a realização do exame.

Espiroquetemia em campo escuro. As amostras de meio de cultura celular foram retiradas do meio de cultivo BSK-H, a cada cinco dias, realizadas junto com o repique da placa celular, realizado em capela de fluxo laminar com material estéril.

A motilidade foi avaliada em cruces, sendo zero para ausência de motilidade, uma cruz para motilidade baixa, duas cruces para motilidade ativa, três cruces para motilidade vigorosa e quatro cruces para motilidade intensa.

A contagem das placas foi avaliada em cruces de acordo com a quantidade de aglomerados de espiroquetas, sendo uma cruz para até um aglomerado, duas cruces até dois aglomerados e três cruces até 3 aglomerados.

Análise dos Resultados. A comparação das médias entre os grupos foi realizada por meio do Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, pois as medidas não apresentaram distribuição normal. Quando houve diferença significativa de um grupo em relação aos demais ($p < 0,05$) realizou-se o Teste de Dunn ou Student-Newman-Keuls para identificar os grupos que apresentaram medianas distintas. As comparações foram realizadas em cada momento de observação. As análises foram obtidas com o programa SPSS. Statistics 17.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa *In vivo*. Exame clínico. A análise estatística do peso das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 3.

Os animais apresentavam no M1, ovipostura, ingestão de água e ração dentro da normalidade, mostravam-se saudáveis em estado de alerta e cristas avermelhadas.

No primeiro dia após a imunossupressão e inoculação, os animais dos grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram diarreia e aumento na ingestão de água. No segundo dia, após a inoculação, esses animais apresentaram diarreia esverdeada, apatia, suspensão da produção de ovos, sonolência, anorexia, polidipsia, penas arrepiadas e cristas pálidas.

Em relação à perda de peso, quando comparado o M5 com o M1, foi possível observar que o G1 manteve-se estável, e houve emagrecimento no M5, dos grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7, porém sem diferença estatística significativa. Um animal do G4 e dois animais do G6 vieram a óbito no M5.

No M6, o G1 apresentou discreto aumento de peso em relação ao M1, cinco animais do G2 vieram a óbito, permanecendo uma ave, que apresentou emagrecimento. O G3 apresentou redução de peso. Todos os animais do G4, G5 e G6 vieram a óbito no M6. Cinco galinhas do G7 vieram a óbito, restando um animal, que apresentou emagrecimento.

Os animais do G1 mantiveram-se com produção de ovos dentro da normalidade, ingestão de água e ração normais, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis com estado de alerta e cristas vermelhas.

O animal do G2 que sobreviveu, apresentou melhora a partir do M11, onde houve aumento no peso corporal, fezes normais, normodipsia e normorexia, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis e alertas, e manteve-se estável até o M13, porém o animal não voltou a ovipostura.

Os animais do G3 começaram a ganhar peso corporal a partir do M8, e mantiveram-se assim até o M13, com produção de ovos dentro da normalidade, normodipsia e normorexia, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis e alertas e cristas vermelhas, um animal veio a óbito no M8 e outro animal no M10.

O animal do G7 começou a apresentar melhora no M10, com aumento de peso corporal, fezes normais, normodipsia e normorexia, apresentando estado clínico geral de aves saudáveis e alertas e cristas róseas. No M11 o animal apresentava cristas avermelhadas e manteve-se estável até o fim do experimento, onde voltou a ovipostura neste momento.

Lisboa (2006) relatou em infecção experimental de *B. anserina* por carrapatos, perda de apetite, penas arrepiadas, sonolência e crista pálida, sinais relatados também por Marchoux e Salimbeni (1903) em infecções naturais, Cepeda (2015) relatou os mesmos sinais clínicos em animais inoculados com soro infectado por *B. anserina*, sinais clínicos observados também presente estudo.

Não ocorreu diferença significativa para os valores de peso corporal, porém o emagrecimento observado nas aves dos grupos 2 e 7 também foram relatados por Lisboa (2006) e Cepeda (2015).

Bioquímica sérica. A análise estatística de bioquímica sérica das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4,

5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 4.

Os animais de todos os grupos, em todos os momentos, apresentaram valores de fosfatase alcalina dentro do intervalo de referência. No momento 1 não houve diferença significativa entre os grupos. No momento 5 houve diferença significativa no grupo 1 comparado aos grupos 4, 5, 6 e 7 e quando comparado o grupo 3 em relação aos grupos 4, 5, 6 e 7, porém ambos os grupos apresentaram valores dentro do intervalo de referência.

Em aves a elevação da fosfatase alcalina é rara. O que é mais comumente observado é a redução em casos de lesões hepáticas (RIVETZ et al., 1977; CAMPBELL *in* THRALL et al., 2012 e SCHIMIDT *in* CUBAS et al., 2014), o mesmo foi observado no presente estudo, porém com valores dentro dos valores de normalidade para a espécie.

Os valores médios e desvios padrão dos valores de Aspartato aminotransferase (UI/l) estão apresentados na Tabela 5.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores de aspartato aminotransferase dentro do intervalo de referência para a espécie. E não houve diferença estatística significativa.

No momento 5 houve diferença estatística significativa quando o grupo 1 foi comparado com todos os outros grupos.

Os animais dos grupos 2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram valores elevados de AST no momento 5.

O animal do grupo 2 apresentou elevação nos valores de AST em todos os momentos, com exceção do momento 7.

Os animais do grupo 3 apresentaram elevação nos valores de AST em todos os momentos.

O animal do grupo 7 apresentou valores de AST elevados até o momento 11, nos momentos 12 e 13 apresentou valores dentro do intervalo de referência.

A elevação da enzima AST foi relatada por Cepeda (2015) em infecções experimentais por carrapatos infectados e por soro infectado, o que também foi observado por Rivetz, et. al., (1977), concordando com o encontrado no presente estudo.

O aumento desta enzima pode sugerir lesão hepática grave e difusa, ou distúrbios musculares (Schmidt *in* Cubas et al., 2014; KANEKO, et al., 2008). A AST localiza-se parcialmente no citoplasma dos hepatócitos, portanto, ser considerada um marcador sensível, porém não específico de distúrbios hepatocelulares (Schmidt *in* Cubas et al., 2014).

Os valores médios e desvio padrão dos valores de Alanina aminotransferase (UI/l) estão apresentados na Tabela 6.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores de ALT dentro do intervalo de referência com exceção do grupo 3, que apresentou discreta elevação (96 UI/L). Não houve diferença estatística significativa neste momento.

No momento 5 houve redução nos valores de ALT dos grupos 2, 3, 4, 5 e 7. O grupo 1 e 6 apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2, e quando comparado o grupo 3 com o G2 e G7.

O animal do grupo 2 apresentou elevação desta enzima a partir do momento 7 (15 dias após infecção), o qual se normalizou no momento 12.

O animal do grupo 7 apresentou elevação da ALT nos momentos 7, 8 e 9, e após este momento até o fim do experimento houve redução desta enzima.

Cepeda (2015) observou elevação da ALT, em grupo experimental infectado com soro parasitado, a partir de 12 dias após a infecção, que normalizou após 24 dias após inoculação. Vashist (2011) observou elevação da ALT a partir da primeira semana após infecção.

Cepeda (2015) relatou que o aumento da enzima pode ser devido ao estresse da contenção para coleta e/ou diferenças ambientais, que podem alterar a fisiologia e o metabolismo dos animais.

Os valores médios e desvio padrão dos valores de Colesterol sérico (mg/dL) estão apresentados nas Tabelas 7.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores médios de Colesterol sérico dentro do intervalo de referência. Não houve diferença significativa entre eles.

No momento 5 todos os grupos, com exceção do G3 que apresentou elevação de colesterol, permaneceram com valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa quando comparado o grupo 1 em relação aos grupos 3, 4, 5, e 7; e quando comparado o grupo 3 houve diferença significativa em relação aos grupos 2, 4, 5 e 6.

Os animais do grupo 1 apresentaram em todos os momentos valores de colesterol dentro de intervalo de referência.

O animal do G2 apresentou aumento de colesterol a partir do momento 7 e valores dentro do intervalo de referência nos momentos 11 e 13.

O animal do G7 apresentou elevação nos momento 6 até o momento 11, e se normalizou a partir do momento 12.

O grupo 3 apresentou elevação entre os momentos 5 e 10, e a partir do momento 11 voltou a apresentar valores dentro do intervalo de referência.

Cepeda (2015) observou elevação nos níveis de colesterol do 8º ao 24º dia após a infecção, no grupo infectado com soro parasitado.

O colesterol endógeno é produzido principalmente no fígado. Nas aves o aumento do colesterol pode acontecer por insuficiência hepática, obstrução biliar extra hepática, fibrose ou hiperplasia de ductos biliares (AMAND, 1986; KANEKO, et al., 2008). Observa-se aumento da concentração de colesterol durante a vitelogenese e a formação de ovo, e também em aves com hipotireoidismo, distúrbios hepáticos, jejum prolongado e dietas ricas em gordura. A hipercolesteremia pode ser causada pela dieta ou por insuficiência hepática. Quando associada a elevações nos teores de AST, ácidos biliares e LDH indica lipidose hepática (Schmidt *in* Cubas et al., 2014).

Os valores médios e desvio padrão dos valores de Triglicerídeos séricos (mg/dL) estão apresentados na Tabela 8.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores de triglicerídeos séricos dentro do intervalo de referência, com exceção do grupo 3 (2279 mg/dl). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

No momento 5 todos os grupos apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa do grupo 1 em relação aos grupos 2, 4, 5, 6, e 7. E em relação ao grupo 3 quando comparado com os grupos 2, 4, 5 e 6 também houve diferença significativa.

O grupo 1 apresentou em todos os momentos valores de triglicerídeos dentro do intervalo de referência.

O grupo 2 e 7 apresentaram elevação no momento 8, nos demais momentos mantiveram-se dentro do intervalo de referência.

No grupo 3 foi observado aumento de triglicerídeos apenas nos momentos 8 e 9.

Volume globular e proteína plasmática total. A análise estatística do volume globular e proteína plasmática total das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7.

Os valores médios e desvio padrão dos valores de volume globular (%) estão apresentados na Tabela 9.

No momento 1 todos os grupos apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Houve diferença significativa quando comparado o grupo 4 com os grupos 1, 2 e 3.

No momento 5 houve diferença significativa quando comparado o grupo 1 com os grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7. E quando comparado o grupo 3 em relação aos grupos 1, 4, 5, 6 e 7. Os grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 apresentaram declínio nos valores de VG, indicando anemia.

O grupo 1 manteve-se dentro do intervalo de referência em todos os momentos, com exceção do momento 6, onde apresentou discreta redução (24%).

Os animais do G2 e G7 apresentaram redução nos valores de volume globular entre os momentos 5 e 9. A partir do momento 10 os valores apresentaram-se dentro dos valores de referência.

Lisboa et al., (2008) relatou discreta anemia em aves infectadas experimentalmente por *B. anserina* com carrapatos, os resultados obtidos no presente estudo mostram anemia severa, principalmente nos grupos 2, 4, 5, 6 e 7. A anemia causada pela borreliose, pode ser causada pela destruição ou diminuição na produção das hemácias, essa diminuição é decorrência da multiplicação *B. anserina* e liberação de substâncias tóxicas no baço, fígado e medula óssea (HUTYRA et al., 1947).

Os valores médios e desvio padrão dos valores de proteína plasmática total (g/dL) estão apresentados na Tabela 10.

No momento 1 todos os grupos apresentaram hiperproteinemia.

No momento 5 os animais do G4, G5 e G6 apresentaram valores dentro do intervalo de referência. Os animais dos grupos 1, 2, 3 e 7 apresentaram valores elevados de PPT.

Os grupos 1, 2 e 3 apresentaram em todos os momentos hiperproteinemia.

O grupo 2 apenas no momento 2 apresentou valores de PPT dentro do intervalo de referência, nos demais apresentou elevação da mesma em relação ao intervalo de referência.

Lisboa (2006) observou hiperproteinemia no oitavo dia após inoculação. Ocorre hiperproteinemia quando há a produção de imunoglobulinas, desidratação, estresse e condições imunossupressoras (RIVETZ et al., 1977; CAMPBELL *in* THRALL et al., 2012), o que foi compatível com as condições do estudo.

Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR). A análise estatística dos valores de qPCR (espiroquetas/ml) das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores médios e desvios padrão estão apresentados na Tabela 11.

Os animais do G1 e G3 mantiveram-se negativos em todos os momentos.

Os grupos 2, 4, 5 e 6 apresentaram resultados positivos no momento 5, e voltaram a apresentar resultados negativos nos próximos momentos.

Não houve diferença estatística entre os grupos 1 e 3. Houve diferença estatística entre o grupo 1 com os grupos 2, 5, 6 e 7 e entre o grupo 3 com os grupos 2, 5, 6 e 7.

Não houve diferença significativa entre os grupos 2, 4, 5, 6 e 7.

O animal do G7 apresentou resultados negativos a partir do momento 6, até o momento 10, onde apresentou resultado positivo (286.560 espiroquetas/ml), neste momento o animal apresentava-se clinicamente e laboratorialmente saudável.

No M11 até o M13 o animal apresentou valor negativo.

Espiroquetemia em campo escuro. A análise estatística dos valores de espiroquetemia em campo escuro (espiroquetas/ml) das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores médios e desvios padrão obtidos estão dispostos na Tabela 12.

Como esperado, os grupos 1 e 3 foram negativos em todos os momentos.

No momento 1 todos os grupos apresentaram resultados negativos, enquanto no momento 5 os animais dos grupos 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram espiroquetemia positiva (Figura 40).

O animal do grupo 2 apresentou resultados negativos a partir do M6 e permanecendo até o M13.

O animal do grupo 7 apresentou resultados negativos nos momentos 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 13. No momento 11 o animal voltou a apresentar espiroquetas na circulação, porém o animal estava clinicamente saudável, e os exames laboratoriais como VG e bioquímica sérica, apresentavam-se com seus valores dentro do intervalo de referência.

Espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado. A análise estatística dos valores de espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado (espiroquetas/campo) das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 13.

Como esperado, os grupos 1 e 3 estavam negativos em todos os momentos.

No momento 1 todos os grupos apresentaram resultados negativos.

No momento 5, os grupos 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram espiroquetas no esfregaço sanguíneo corado (Figura 43), neste momento houve diferença estatística significativa entre os grupos 1 em relação aos grupos 2, 4, 5, 6 e 7 e em relação ao grupo 3 comparado aos grupos 2, 4, 5, 6 e 7.

Nos momentos, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 todos os grupos foram negativos.

Ensaio de Imunoadsorção Enzimático indireto (ELISA indireto). A análise estatística dos valores de ELISA indireto das aves foi realizada apenas nos momentos 1 e 5, pois nos demais momentos ocorreu o óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e apenas um animal sobreviveu nos grupos 2 e 7. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 14.

Os grupos 1 e 3 apresentaram resultados negativos em todos os momentos do experimento.

Os grupos 4, 5 e 6 apresentaram resultados negativos nos momentos 1 e 5.

O animal do grupo 2 começou a apresentar resultados positivos a partir do momento 7 até o fim do experimento.

O animal do grupo 7 começou a apresentar resultados positivos a partir do momento 6 até o fim do experimento.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos momentos 1 e 5.

Imunofluorescência indireta (RIFI). A análise estatística dos valores de ELISA indireto das aves foi realizada nos momentos 1 e 5, nos demais momentos não foi possível devido ao óbito de todos os animais dos grupos 4, 5 e 6, e do grupo 2 e 7 sobreviveu um animal de cada grupo, não sendo possível a análise. Os valores das médias e desvios padrão estão dispostos na Tabela 15.

Os animais do grupo 1 e 3 foram negativos em todos momentos.

No momento 5, os animais dos grupos 2, 4 e 5, 40% foram positivos; do grupo 7, 50% foram positivos.

Mortalidade dos animais. Observou-se uma sensibilidade da linhagem Novagen, pois a literatura sobre borreliose aviária não demonstra o alto índice de mortalidade encontrado no presente estudo. Shommein e Kogali 1974 infectaram experimentalmente três raças de galinhas, a raça de galinha poedeira branca, como relatado no trabalho, alcançou 100% de mortalidade após 120 horas após inoculação.

Nos animais do grupo saúde a mortalidade foi 0%, nos grupos luz, riboflavina e veículo foi de 100%, nos grupos doença e tratado foi de 83,3%.

Foi realizada necropsia dos animais que vieram à óbito, foi realizada imprinting de um coágulo encontrado em cavidade abdominal.

Etapas *In vitro*. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo (qPCR). A análise estatística das placas de cultivo celular foi realizada em todos os momentos do experimento. Os valores médios e desvios padrão estão apresentados na Tabela 16.

As placas do G8 e G10 apresentaram resultados negativos em todos os momentos.

O grupo 9 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 9 e 11, e nos momentos 10, 12 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 11 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 9 e 12, nos momentos 10, 11 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 12 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 9 e 12, nos momentos 10, 11 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 13 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 8, 11 e 12, nos momentos 9, 10 e 13 apresentou resultados negativos.

O grupo 14 apresentou resultados positivos nos momentos 5, 6, 7, 9 e 11, nos momentos 8, 10, 12 e 13 apresentou resultados negativos.

Espiroquetemia em campo escuro. A análise estatística das placas de cultivo celular foi realizada em todos os momentos do experimento. Os valores médios e desvios padrão estão apresentados na Tabela 17.

Os resultados foram determinados em cruzes, pois não haviam espiroquetas livres na amostra, possivelmente porque o agente patogênico não estava em um ambiente propício para sua correta multiplicação.

A avaliação de motilidade foi avaliada em cruzes, e os resultados estão dispostos na tabela 18.

Os grupos 8 e 10 mantiveram-se negativos durante todos os momentos.

Os grupos 9, 11, 12, 13 e 14 apresentaram espiroquetemia positiva em todos momentos analisados.

Considerações finais. Uma galinha do grupo tratado apresentou sintomatologia de borreliose aviária, entretanto sobreviveu a infecção e apresentou recuperação clínica e laboratorial, elevação da concentração de IgY, voltou a se alimentar e retomou a ovipostura. Esta ave apresentou resultados de qPCR positivo no momento 10 e espiroquetemia positiva no momento 11, porém estava clinicamente e laboratorialmente saudável, podendo indicar uma perspectiva promissora para futuros estudos utilizando a terapia fotodinâmica, utilizando novos protocolos e novas associações.

CONCLUSÕES

O tratamento utilizando a associação de luz ultravioleta e riboflavina não apresentou os resultados esperados nas condições em que o experimento foi realizado: - pois foi capaz desenvolver a doença em aves susceptíveis, uma vez que o índice de mortalidade do grupo tratado foi de 83,3%; - Não impediu o crescimento de *Borrelia anserina* no meio de cultivo BSK-H.

A imunossupressão levou a debilidade dos animais e depressão do sistema imunológico.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao apoio da FAPESP no auxílio à Pesquisa (2014/03353-4) e bolsa FAPESP (2014/03303-4).

REFERÊNCIAS

- AMAND, W.B. Avian Clinical Hematology and Blood Chemistry. In: FOWLER, M.E. *Zoo and Wild Animal Medicine*, 2nd edition. Philadelphia, W.B. Saunders, p. 264-276, 1986.
- ATALIBA, A. C. Estudo de *Borrelia* spp. no Brasil. *Dissertação de mestrado da Universidade de São Paulo*, SP, 2006.
- ATALIBA, A. C.; RESENDE, J. S.; YOSHINARI, N.; LABRUN, M. B. Isolation and molecular characterization of a Brazilian strain of *Borrelia anserina*, the agente fowl spirochaetosis. *Research in Veterinary Science*.v. 83. p.145-149, 2007.
- CAMPBELL, T.W. Bioquímica Clínica de Aves. In: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2 Ed. São Paulo: Roca, 2012.
- CARDO, L.J.; SALATA, J.; MENDEZ, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion and Apheresis Science*. v.37, p. 131–137, 2007.
- CEPEDA, M. B. Transmissão experimental de *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) em *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758): Parâmetros Clínicos, Bioquímicos e Anátomo-Histopatológico. 2015. 68p. *Dissertação de Mestrado (em Ciências Veterinárias)apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, RJ, 2015.
- CORBIN F. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. *International Journal of Hematology*. v.76 (Suppl 2), p. 253-7, 2002.
- CORDEIRO, M. D; MEIRELES, G. S.; SILVA, J. B.; SOUZA, M. M. S.; FONSECA, A. H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. Em cães no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. v.34, n. 3, p.251-256, 2012.
- DHAWEDKAR, R. G; DHANESAR, N. S. Preservation of *Borrelia anserina* by nitrogen refrigeration. *Indian Journal Animal Science*. v. 53, n.10, p.1124-1127, 1983.
- FEITOSA, F.L.F. *Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico*. 2ª ed. Roca, São Paulo. p.754, 2008.
- HORTA, M.C; LABRUNA, M. B; SANGIONI, L. A; VIANNA, M. C. B; GENNARI, S. M; et. al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a brazilian spotted fever–endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.71, n.1, p.93-97, 2004.
- HUTYRA, F.; MAREK, J.; MANNINGER, R. *Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos*. Vol. 1. Editorial Labor, S.A, p. 934-941, 1947.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6 ed. Elsevier: Academic Press, Amsterdam, 2008.
- LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia Laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Editora Roca, São Paulo, SP, 2007.
- LISBÔA, R. S. Estudo da transmissão experimental de *Borrelia anserina* (SAKHAROFF, 1981) POR *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 e avaliação comparativa de parâmetros clínicos e hematológicos em *Gallus gallus* Linnaeus, 1758. *Dissertação de mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, RJ, 2006.
- LISBÔA, R. S.; GUEDES JÚNIOR, 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.
- LOPES, L. G. Avaliação da ação da riboflavina associada à radiação ultravioleta na inativação do *Anaplasma marginale* em sangue bovino conservado para transfusão e estudo das alterações hematológicas e bioquímicas durante o período de estocagem. *Dissertação de metrado apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu*, SP, 2011.
- MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R. F.; VALADÃO, I. F. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection on antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.
- MARCHOUX, E.; SALIMBENI, A. La spirillose des poules. *Annales de l’Insttut Pasteur Lille*, v.17, p.569-580, 1903.
- NINOV, K. Expressão de genes envolvidos no controle muscular do desenvolvimento da musculatura esquelética em galinhas. *Tese de doutorado apresentada à Universidade de São Paulo “Escola superior de agricultura Luis de Queiroz”*. Piracicaba, SP. 2010.

- RENTAS, F; HARMAN, R; GOMEZ, C; SALATA, J; CHILDS, J; et al. Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. *Transfusion*. v.47, 2007.
- RIVETZ, B.; BOGIN, E.; WEISMAN, Y.; AVIDAR, J.; HADANI, A. Changes in the biochemical composition of blood in chickens infected with *Borrelia anserina*. *Avian Pathology*, v.6, n.4, p.343-351, 1977.
- SACCO, S. R. Ação da luz ultravioleta e da riboflavina na inativação da *Leishmania infantum chagasi* em sangue canino conservado em bolsas para transfusão. *Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"*, Botucatu, SP, 2013.
- SCHMIDT, E. M. S. Patologia Clínica em Aves. IN: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária. Editora Roca. São Paulo, SP, 2014.
- SHOMMEIN, A. M.; KHOGALI, A. Fowl spirochaetosis haematological and histopathological studies. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, v. 22, n. 3, p. 255-261, 1974.
- SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. A.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.20, n.1, p.1-19, 2000.
- THRALL, M. A; Hematologia e Bioquímica Veterinária. Editora Rocca. 2007.
- VASHIST, USHA. Avaliação biológica, bioquímica e histopatológica das infecções experimentais causadas por *Plasmodium (Bennettinia) juxtanucleare Versiani & Gomes, 1941* e *Borrelia anserina (Sakharoff, 1891)* em *Gallus gallus* l. 1758. 2011. 114p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.
- WALKER, R. L.; GREENE, R. T.; NICHOLSON, W. L.; LEVINE, J. F. Shared flagellar epitopes of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia anserina*. *Veterinary Microbiology*. v.9, p.361-371, 1989.

LEGENDAS DAS FIGURAS

FIGURA 1. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para *Borrelia anserina* nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers *Borrelia anserina* fla gene.

FIGURA 2. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas positivas para *Borrelia anserina* nas concentrações decrescentes de 440000, 44000, 4400, 440 e 44 espiroquetas/mL, utilizando os primers *Borrelia anserina* fla gene.

FIGURA 3. Curva de dissociação realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers GAPDH.

FIGURA 4. Curva padrão realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue de galinhas, utilizando os primers GAPDH.

TABELA 1. Valores de referência de Fosfatase alcalina, Aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol e triglicerídeos. International Species Information System, Conventional U.S.A Units e Campbell in Thrall et al., (2012).

Exame	Unidade	Valor mínimo	Valor máximo
Fosfatase alcalina	UI/L	107	5030
Aspartato aminotransferase	UI/L	125	299
Alanina aminotransferase	UI/L	19	50
Colesterol	mg/dL	76	296
Triglicerídeos	mg/dL	57	2207

TABELA 2. Valores de referência de Volume Globular (VG) e Proteína Plasmática Total (PPT). Sistema Internacional de Informação das Espécies (Conventional U.S.A. Units – Outubro de 1999) e Campbell in Thrall et al., (2012).

Exame	Unidade	Valor mínimo	Valor máximo
VG	%	25	48
PPT	g/dL	2,5	4,5

TABELA 3. Média e desvio padrão dos valores de peso corporal (Kg) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	1,69± 0,29a	6*	1,73 ± 0,15a	6*	1,82 ± 0,14a	6*	1,90± 0,18a	6*	1,89± 0,15a	6*	1,89± 0,16a	6*	1,79 ± 0,16a	6*
5	1,68± 0,29a	6*	1,62± 0,10a	4*	1,59 ± 0,24a	6*	1,74± 0,21a	5*	1,68± 0,15a	6*	1,69± 0,12a	4*	1,6 ± 0,17a	6*
6	1,76	6*	1,5	1*	1,49	6*	----	0	----	0	----	0	1,34	1*
7	1,74	6*	1,49	1*	1,89	6*	----	0	----	0	----	0	1,32	1*
8	1,76	6*	1,38	1*	1,34	5*	----	0	----	0	----	0	1,31	1*
9	1,74	6*	1,31	1*	1,21	5*	----	0	----	0	----	0	1,23	1*
10	1,73	6*	1,4	1*	1,22	4*	----	0	----	0	----	0	1,16	1*
11	1,74	6*	1,46	1*	1,43	4*	----	0	----	0	----	0	1,25	1*
12	1,73	6*	1,48	1*	1,47	4*	----	0	----	0	----	0	1,33	1*
13	1,70	6*	1,5	1*	1,45	4*	----	0	----	0	----	0	1,52	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 4. Média e desvio padrão dos valores de Fosfatase alcalina sérica (UI/l) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	516,8± 270,5a	6*	1187,8± 584,9a	6*	482,0± 297,4a	6*	601,3± 367,6a	6*	672,3± 302,6a	6*	602,8± 370,4a	6*	736,6± 771,06a	6*
5	876,33± 695,2a	6*	175± 76,4a	4*	351,5± 211,2a	6*	98,6± 34,0A	5*	14,8± 81,5A	6*	99± 52,9a	4*	104,6± 40,20A	6*
6	682,67	6*	565,0	1*	156,5	6*	----	0	----	0	----	0	65,0	1*
7	541,83	6*	294,0	1*	279,6	6*	----	0	----	0	----	0	69,0	1*
8	463,17	6*	494,0	1*	214,2	5*	----	0	----	0	----	0	127,0	1*
9	535,50	6*	644,0	1*	376,6	5*	----	0	----	0	----	0	146,0	1*
10	613,0	6*	843,0	1*	929,5	4*	----	0	----	0	----	0	419,0	1*
11	488,17	6*	705,0	1*	772,5	4*	----	0	----	0	----	0	1351,0	1*
12	528,8	6*	714,0	1*	388,7	4*	----	0	----	0	----	0	1164,0	1*
13	385,0	6*	416,0	1*	685,7	4*	----	0	----	0	----	0	545,0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 5. Média e desvio padrão dos valores de Aspartato aminotransferase (AST) (UI/l) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	207,6± 87,1a	6*	279,3± 146,2a	6*	233,6± 61,65a	6*	227± 31,91a	6*	254,5± 54,39a	6*	243,3± 39,10a	6*	241,6± 39,08a	6*
5	204± 92,6a	6*	405,7± 87,26A	4*	453,5± 69,36a	6*	432,8± 37,61a	5*	461,0± 107,49a	6*	414,0± 91,26a	4*	420,0± 90,5A	6*
6	236,1	6*	500,0	1*	425,6	6*	----	0	----	0	----	0	598,0	1*
7	241,8	6*	260,0	1*	455,6	6*	----	0	----	0	----	0	519,0	1*
8	216,8	6*	350,0	1*	498,6	5*	----	0	----	0	----	0	540,0	1*
9	224,6	6*	238,0	1*	534,4	5*	----	0	----	0	----	0	551,0	1*
10	237,6	6*	539,0	1*	435,7	4*	----	0	----	0	----	0	357,0	1*
11	227,1	6*	575,0	1*	150,5	4*	----	0	----	0	----	0	329,0	1*
12	241,6	6*	590,0	1*	316,2	4*	----	0	----	0	----	0	269,0	1*
13	246,3	6*	443,0	1*	324,25	4*	----	0	----	0	----	0	211,0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 6. Média e desvio padrão dos valores de Alanina aminotransferase (ALT) (UI/l) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	22,8± 16,4a	6*	33,6± 13,7a	6*	96± 147,6a	6*	34± 19,14a	6*	51,1± 24,31a	6*	39,3± 29,32a	6*	46,8± 37,4a	6*
5	23,6± 17,2a	6*	7,5± 1,29A	4*	25,3± 15,8a	6*	9,4± 2,30a	5*	20,0± 15,86a	6*	16,5± 6,14a	4*	12,0± 5,2a	6*
6	19,2	6*	13	1*	27,5	6*	----	0	----	0	----	0	13	1*
7	29,17	6*	132	1*	113,6	6*	----	0	----	0	----	0	126	1*
8	32,1	6*	270	1*	124,4	5*	----	0	----	0	----	0	285	1*
9	33,1	6*	187	1*	114,4	5*	----	0	----	0	----	0	65	1*
10	28,6	6*	76	1*	76,7	4*	----	0	----	0	----	0	4	1*
11	45,3	6*	66	1*	18,2	4*	----	0	----	0	----	0	2	1*
12	22,5	6*	40	1*	8,5	4*	----	0	----	0	----	0	8	1*
13	14,5	6*	26	1*	6,5	4*	----	0	----	0	----	0	12	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 7. Média e desvio padrão dos valores de Colesterol sérico (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	166,6± 41,8a	6*	201,0± 47,45a	6*	279,5± 210,37a	6*	186± 57,06a	6*	225,1± 53,56a	6*	200,8± 76,01a	6*	200,2± 71,66a	6*
5	156,7± 35,3a	6*	244,5± 18,19a	4*	605,3± 198,91a	6*	273,6± 109,03A	5*	251,6± 77,78A	6*	238,2± 74,25A	4*	269,2± 74,95A	5*
6	135,8	6*	287	1*	345,3	6*	----	0	----	0	----	0	352	1*
7	161,8	6*	740	1*	492,3	6*	----	0	----	0	----	0	497	1*
8	143,1	6*	780	1*	722,2	5*	----	0	----	0	----	0	728	1*
9	137,8	6*	711	1*	597,6	5*	----	0	----	0	----	0	954	1*
10	180,8	6*	472	1*	343,7	4*	----	0	----	0	----	0	488	1*
11	139,1	6*	190	1*	145	4*	----	0	----	0	----	0	344	1*
12	214,8	6*	437	1*	127,7	4*	----	0	----	0	----	0	255	1*
13	192,6	6*	212	1*	118,7	4*	----	0	----	0	----	0	257	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 8. Média e desvio padrão dos valores de Triglicerídeos séricos (mg/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	1112,6± 577,7a	6*	1732,8± 462,25a	6*	2279,0± 2140,51a	6*	808,5± 600,42a	6*	2035± 652,89a	6*	1321,1± 1166,72a	6*	2078,3± 1151,02a	6*
5	1021,0± 391,0a	6*	189±1 11,93A	4*	598,6± 380,38a	6*	186,8± 144,33A	5*	204,8± 149,64a	6*	181± 36,45A	4*	278,2± 173,66A	5*
6	1328,8	6*	193,0	1*	192,3	6*	----	0	----	0	----	0	141	1*
7	1502,5	6*	1200,0	1*	827,1	6*	----	0	----	0	----	0	1200	1*
8	1839,0	6*	4900,0	1*	2622,8	5*	----	0	----	0	----	0	8080	1*
9	1525,8	6*	1200,0	1*	2304,4	5*	----	0	----	0	----	0	1290	1*
10	1230,0	6*	1180,0	1*	267	4*	----	0	----	0	----	0	96	1*
11	1287,8	6*	763,0	1*	1957,5	4*	----	0	----	0	----	0	171	1*
12	1180,5	6*	1200,0	1*	520,2	4*	----	0	----	0	----	0	173	1*
13	1082,8	6*	1310,0	1*	547,2	4*	----	0	----	0	----	0	1200,0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 9. Média e desvio padrão dos valores do volume globular (%) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	40,1±3,7a	6*	39,5±6,95a	6*	40,8±4,75a	6*	28,1±2,14A	6*	29,1±2,93a	6*	30,3±3,33a	6*	29,5±2,59a	6*
5	30,6±3,7a	6*	15±4,08A	4*	23,1±5,56a	6*	12,6±4,83A	5*	13±2,9A	6*	12±2,94 ^a	4*	18,3±2,56A	5*
6	24	6*	24	1*	18,8	6*	----	0	----	0	----	0	15	1*
7	27,1	6*	15	1*	16	6*	----	0	----	0	----	0	17	1*
8	26,5	6*	20	1*	16,2	5*	----	0	----	0	----	0	15	1*
9	27,1	6*	20	1*	15,7	5*	----	0	----	0	----	0	23	1*
10	36	6*	33	1*	33,5	4*	----	0	----	0	----	0	25	1*
11	30	6*	31	1*	31,2	4*	----	0	----	0	----	0	29	1*
12	27,3	6*	28	1*	28	4*	----	0	----	0	----	0	34	1*
13	38,3	6*	25	1*	30,5	4*	----	0	----	0	----	0	30	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 10. Média e desvio padrão dos valores de proteína plasmática total (g/dL) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	6,6±1,32a	6*	5,3±0,51a	6*	5,5±0,45a	6*	7,3±0,33a	6*	8,2±1,19A	6*	7,2±1,26a	6*	7,6±1,76a	6*
5	5,6±0,98a	6*	4,8±0,63a	4*	5,3±0,98a	6*	4,3±0,67a	5*	4,0±1,20a	6*	4,4±0,99a	4*	4,8±0,87a	5*
6	5,8	6*	4,2	1*	4,7	6*	----	0	----	0	----	0	5,0	1*
7	6,2	6*	5,6	1*	8,6	6*	----	0	----	0	----	0	6,4	1*
8	6,2	6*	9	1*	8,6	5*	----	0	----	0	----	0	5,0	1*
9	6,2	6*	10,6	1*	7,3	5*	----	0	----	0	----	0	8,0	1*
10	6,6	6*	9,6	1*	4,9	4*	----	0	----	0	----	0	5,8	1*
11	6,0	6*	7,4	1*	6,4	4*	----	0	----	0	----	0	4,6	1*
12	6,3	6*	6,6	1*	4,1	4*	----	0	----	0	----	0	4,6	1*
13	6,0	6*	8,0	1*	4,9	4*	----	0	----	0	----	0	6,6	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 11. Média e desvio padrão dos valores da Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) (espiroquetas/ml) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0a	6*	664.524± 92737,0A	4*	0a	6*	601.868± 121808,0A	5*	831.606± 387584,0a	6*	661.360± 51519,0A	4*	645.852± 71713,0A	5*
6	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
7	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
8	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
9	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
10	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	286.560	1*
11	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
12	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
13	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 12. Média e desvio padrão dos valores de espiroquetemia ($\times 10^7/\text{ml}$) e motilidade das espiroquetas das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0a	6*	5,28± 6,30 (++)a	4*	0a	6*	23± 37,68 (++)A	5*	106,17± 115,0 (+++)A	6*	84,5± 100,67 (++)A	4*	38,75± 71,11 (++)A	5*
6	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
7	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
8	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
9	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
10	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	286.560	1*
11	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
12	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
13	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 13. Média e desvio padrão dos valores de espiroquetemia em esfregaço sanguíneo corado (espiroquetas/campo) das galinhas (*Gallus gallus domesticus*), nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0a	6*	62,95± 24,4A	4*	0a	6*	59,06± 23,3A	5*	81,88± 26,62A	6*	70,40± 23,49A	4*	55,22± 3,64A	5*
6	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
7	0	6*	0	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	0	1*
8	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
9	0	6*	0	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	0	1*
10	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
11	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
12	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*
13	0	6*	0	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	0	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 14. Média dos valores do Ensaio de Imunoadsorção Enzimático indireto (ELISA indireto) padronizado (CDO*100/CUT off) (g/dL) de galinhas poedeiras, nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	25,44±34,7a	6*	21,8±27,73a	6*	41,2±39,4a	6*	45,6±71,13a	6*	20,2±13,6a	6*	22,3±12,95a	6*	6,6±12,02a	6*
5	31,1±21,3a	6*	10,0±12,10a	4*	25,2±36,21a	6*	21,2±42,76a	5*	5,0±7,13a	6*	16,0±12,11a	4*	1,1±7,76a	5*
6	18,0	6*	98,3	1*	40,5	6*	----	0	----	0	----	0	104,8	1*
7	18,6	6*	167,0	1*	12,8	6*	----	0	----	0	----	0	251,4	1*
8	23,8	6*	151,5	1*	18,6	5*	----	0	----	0	----	0	216,5	1*
9	17,5	6*	151,5	1*	13,7	5*	----	0	----	0	----	0	284,3	1*
10	46,7	6*	238,1	1*	54,9	4*	----	0	----	0	----	0	287,0	1*
11	23,4	6*	276,1	1*	31	4*	----	0	----	0	----	0	290,0	1*
12	44,7	6*	333,1	1*	36,3	4*	----	0	----	0	----	0	342,9	1*
13	41,7	6*	310,9	1*	45,5	4*	----	0	----	0	----	0	334,3	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 15. Porcentagem de galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) positivas para o exame de Imunofluorescência indireta (RIFI) (%) de, nos momentos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 1 (grupo saúde), grupo 2 (grupo doença), grupo 3 (grupo imunossupressão), grupo 4 (grupo luz), grupo 5 (grupo riboflavina), grupo 6 (grupo veículo) e grupo 7 (grupo tratado). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	N=	Grupo doença	N=	Grupo Imunossupressão	N=	Grupo Luz	N=	Grupo Riboflavina	N=	Grupo Veículo	N=	Grupo tratado	N=
1	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*	0	6*
5	0	6*	40	4*	0	6*	40	5*	40	6*	50	4*	50	5*
6	0	6*	100	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	100	1*
7	0	6*	100	1*	0	6*	----	0	----	0	----	0	100	1*
8	0	6*	100	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	100	1*
9	0	6*	100	1*	0	5*	----	0	----	0	----	0	100	1*
10	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*
11	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*
12	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*
13	0	6*	100	1*	0	4*	----	0	----	0	----	0	100	1*

*Animais sobreviventes

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 16. Média e desvio padrão dos valores de Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) (espiroquetas/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015.

Momentos	Grupo saúde	Grupo doença	Grupo Imunossupressão	Grupo Luz	Grupo Riboflavina	Grupo Veículo	Grupo tratado
5	0a	412.167 ± 8495,10A	0a	418.500± 40362,11A	345.000± 43981,81A	357.667± 31551,02A	432.667 ± 33850,65A
6	0a	381.000 ± 2942,37A	0a	348.000± 10449,88A	386.167± 27021,60A	388.667± 56740,34A	364.883 ± 32999,49A
7	0a	259.500 ± 48471,64A	0a	241.667± 121115,92A	234.000± 192080,19A	242.833± 131031,93A	200.667 ± 161881,03A
8	0a	583.333 ± 142886,9A	0a	75.333± 116748,73A	104.33± 170538,75A	235.666±132276,48A	0a
9	0a	380.000 ± 93080,61A	0a	45.667± 111860,03A	43.833± 107369,30A	0a	131.833 ± 146048,51A
10	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a
11	0a	375.000 ± 91855,87A	0a	0a	0a	182.000± 141703,92A	172.333 ± 134593,71A
12	0a	0a	0a	127.833± 134593,71A	119.500± 131200,23A	37.000± 90631,12A	0a
13	0a	0a	0a	0a	0a	0a	0a

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si estatisticamente.

TABELA 17. Média dos valores de aglomerados de espiroquetas (/ml) das placas de cultivo celular, nos momentos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015.

Grupo	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+	++
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	++	++	+++	+++	+++	+	++
12	+	++	++	++	++	++	++	+
13	+	++	+++	+++	+	+	++	++
14	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Até 1 aglomerado
 ++ Até 2 aglomerados
 +++ Até 3 aglomerados
 ++++ Até 4 aglomerados

TABELA 18. Motilidade das espiroquetas das placas de cultivo celular, no momentos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. Grupo 8 (grupo saúde placa), grupo 9 (grupo doença placa), grupo 10 (grupo imunossupressão placa), grupo 11 (grupo luz placa), grupo 12 (grupo riboflavina placa), grupo 13 (grupo veículo placa) e grupo 14 (grupo tratado placa). Botucatu – SP, 2015.

Grupo	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	++	-	-	-	-	-	-
12	++	++	-	-	-	-	-	-
13	++	++	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-	-	-

- Motilidade ausente
 + Motilidade pouco ativa
 ++ Motilidade ativa

ANEXOS

ANEXO 1.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Inativação da *Borrelia anserina* pela ação da luz ultravioleta associada à riboflavina em soro sanguíneo de *Gallus gallus domesticus***", Protocolo nº 36/2014-CEUA, do Professor Raimundo Souza Lopes, desta Faculdade, a ser conduzido por **Daniela Marques Maciel Dabus** foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 11 de abril de 2014.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTCTCGGGCCTTGTACACAC	20	59.97	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	CTTCCTCCCTTGCGGGTTAG	20	60.11	60.00	3.00	0.00

Products on target templates

>[CP0](#) product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20
 Template 443168 443149

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20
 Template 443085 443104

>[CP010308.1](#) *Borrelia miyamotoi* strain CT14D4, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20
 Template 443488 443469

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20
 Template 443405 443424

>[CP006647.2](#) *Borrelia miyamotoi* LB-2001, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20
 Template 443488 443469

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20
 Template 443405 443424

>[AB897891.1](#) Uncultured *Borrelia* sp. gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: 130707_13_HJF_16S

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20
 Template 1349 1368

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20
 Template 1432 1413

>[AB904793.1](#) *Borrelia miyamotoi* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: HT31

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20
 Template 1321 1340

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20
 Template 1404 1385

>[AB900817.1](#) *Borrelia miyamotoi* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: Y13T1

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20

Template 1349 1368

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 1432 1413

>[CP011060.1](#) *Borrelia hermsii* CC1, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20

Template 447437 447418

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 447354 447373

>[NR_121776.1](#) *Borrelia parkeri* 16S ribosomal RNA, complete sequence

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20

Template 1376 1395

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 1459 1440

>[NR_121775.1](#) *Borrelia anserina* BA2 strain BA2 16S ribosomal RNA, complete sequence

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20

Template 1367 1386

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 1450 1431

>[NR_121757.1](#) *Borrelia miyamotoi* 16S ribosomal RNA, complete sequence

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20

Template 1376 1395

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 1459 1440

>[NR_121718.1](#) *Borrelia coriaceae* strain Co53 16S ribosomal RNA gene, complete sequence

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGTACACAC 20

Template 1366 1385

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 1449 1430

>[CP004146.1](#) *Borrelia hermsii* YOR, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 446731 446712

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 446648 446667

>[CP004217.1](#) *Borrelia miyamotoi* FR64b, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 462415 462434

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 462498 462479

>[CP004267.1](#) *Borrelia crocidurae* DOU, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 447820 447801

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 447737 447756

>[CP005829.1](#) *Borrelia anserina* BA2, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 437617 437598

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 437534 437553

>[CP005851.1](#) *Borrelia parkeri* SLO, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 472696 472715

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 472779 472760

>[CP005745.1](#) *Borrelia coriaceae* Co53, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 440152 440133

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 440069 440088

>[CP005706.1](#) *Borrelia hermsii* YBT, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 440893 440874

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 440810 440829

>[CP005680.1](#) *Borrelia hermsii* MTW, complete genome

product length = 84

Forward primer 1 TTCTCGGGCCTTGACACAC 20

Template 447355 447336

Reverse primer 1 CTTCTCCCTTGCGGGTTAG 20

Template 447272 447291

[09910.1](#) *Borrelia chilensis* strain VA1, complete genome

ANEXO 3.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA	25	58.22	36.00	8.00	3.00
Reverse primer	CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA	20	60.11	55.00	3.00	0.00

Products on target templates

>[CP005830.1](#) Borrelia anserina BA2 plasmid Contig0002 genomic sequence

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 62279 62303

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 62402 62383

>[CP005829.1](#) Borrelia anserina BA2, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 147330 147306

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 147207 147226

>[JF414732.1](#) Borrelia anserina isolate 65 flagellin gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 14 38

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 137 118

>[X75201.1](#) B.anserina fla gene

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 127 151

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 250 231

>[D82858.1](#) Borrelia sp. DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T..... 124

>[D82857.1](#) Borrelia sp. DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T..... 124

>[D82855.1](#) Borrelia sp. DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[D82854.1](#) Borrelia sp. DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[D82849.1](#) Borrelia turdi DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T..... 124

>[D82846.1](#) Borrelia garinii DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[D63370.1](#) Borrelia garinii DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[D63369.1](#) Borrelia garinii DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[D63368.1](#) *Borrelia garinii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[D63367.1](#) *Borrelia garinii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[D63365.1](#) *Borrelia afzelii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[D63364.1](#) *Borrelia garinii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[D63374.1](#) *Borrelia garinii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[D63373.1](#) *Borrelia garinii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[D63372.1](#) *Borrelia garinii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[D63363.1](#) *Borrelia* sp. DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T..... 124

>[CP004146.1](#) *Borrelia hermsii* YOR, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148792A..... 148768

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148669 148688

>[CP004267.1](#) *Borrelia crocidurae* DOU, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 151617A..... 151593

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 151494 151513

>[CP005745.1](#) *Borrelia coriaceae* Co53, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 143936A..... 143912

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143813 143832

>[CP005680.1](#) *Borrelia hermsii* MTW, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148962A..... 148938

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148839 148858

>[JX292917.1](#) *Borrelia crocidurae* strain DOS-3 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 124

>[JX292913.1](#) *Borrelia crocidurae* strain DOU-686 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 124

>[JX292912.1](#) *Borrelia crocidurae* strain DOU-1b flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 124

>[JX292911.1](#) *Borrelia crocidurae* strain DOS-27 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 124

>[CP003426.1](#) *Borrelia crocidurae* str. Achema, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 152284A..... 152260

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 152161 152180

>[FJ868584.1](#) *Borrelia* sp. CPB1 FlaB (flaB) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 97A..... 121

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 220 201

>[EF595741.1](#) *Borrelia hermsii* strain LPO FlaB (flaB) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[CP000993.1](#) *Borrelia recurrentis* A1, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 161145A..... 161121

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 161022 161041

>[CP000976.1](#) *Borrelia duttonii* Ly, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 160267A..... 160243

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 160144 160163

>[AY597798.1](#) *Borrelia hermsii* strain LAK-1 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[AY597795.1](#) *Borrelia hermsii* strain CMC flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[DQ346832.1](#) *Borrelia duttonii* isolate Lw flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[DQ346814.1](#) *Borrelia recurrentis* isolate A1 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[X75204.1](#) *B.crocidurae* fla gene

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 133A..... 157

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 256 237

>[D86618.1](#) *Borrelia recurrentis* gene for flagellin protein, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 124

>[D82864.1](#) *Borrelia coriaceae* DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 124

>[D82859.1](#) *Borrelia duttonii* DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 124

>[U28499.1](#) *Borrelia* sp. strain Spain flagellin gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 110A..... 134

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 233 214

>[U28498.1](#) *Borrelia hispanica* flagellin gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 103A..... 127

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 226 207

>[U28496.1](#) *Borrelia crocidurae* flagellin gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 97A..... 121

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 220 201

>[D82856.1](#) *Borrelia* sp. DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T.....G..... 124

>[D82848.1](#) *Borrelia tanukii* DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C.....T..... 124

>[D82847.1](#) *Borrelia tanukii* DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C.....T..... 124

>[D63366.1](#) *Borrelia afzelii* DNA for flagellin protein, partial sequence

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C.....G..... 124

>[AB022134.1](#) *Borrelia valaisiana* gene for flagellin protein, partial cds, strain: CMN1b

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 G..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[AB022133.1](#) *Borrelia valaisiana* gene for flagellin protein, partial cds, strain: CKA2a

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 G..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[CP009058.1](#) *Borrelia afzelii* K78, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148332 ..A..... 148308

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148209 ..C..... 148228

>[CP011060.1](#) *Borrelia hermsii* CC1, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 149010A..... 148986

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148887 ..G..... 148906

>[CP009212.1](#) *Borrelia afzelii* Tom3107, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148315 ..A..... 148291

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148192 ..C..... 148211

>[CP009117.1](#) *Borrelia valaisiana* Tom4006, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 147841 ..A..... 147817

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 147718 ..C..... 147737

>[CP007564.1](#) *Borrelia garinii* SZ, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 753956 ..A..... 753980

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 754079 ..C..... 754060

>[CP005851.1](#) *Borrelia parkeri* SLO, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 769574A..... 769598

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 769697T..... 769678

>[CP005706.1](#) *Borrelia hermsii* YBT, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 143908A..... 143884

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143785 ..G..... 143804

>[CP007022.1](#) *Borrelia parkeri* HR1, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148610A..... 148586

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148487T..... 148506

>[KC883464.1](#) *Borrelia hermsii* strain WAR FlaB (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..G..... 124

>[JX570875.1](#) *Borrelia garinii* strain SZ 8-1 flagellin (fla) gene, complete cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[CP003882.1](#) *Borrelia afzelii* HLJ01, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148320 .A..... 148296

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148197 ..C..... 148216

>[CP003866.1](#) *Borrelia garinii* NMJW1, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148394 .A..... 148370

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148271 ..C..... 148290

>[CP003151.1](#) *Borrelia garinii* BgVir chromosome linear, complete sequence

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148173 .A..... 148149

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148050 ..C..... 148069

>[CP002933.1](#) *Borrelia afzelii* PKo, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148326 ..A..... 148302

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148203 ..C..... 148222

>[CP002746.1](#) *Borrelia bissetii* DN127, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148235 ..A..... 148211

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148112 ..T..... 148131

>[GQ175059.1](#) *Borrelia hermsii* strain YB-Th-60 flagellin (flaB) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..G..... 124

>[FJ874924.1](#) *Borrelia afzelii* strain 9W10-04 flagellin (flaB) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 30 ..A..... 54

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 153 ..C..... 134

>[CP000048.1](#) *Borrelia hermsii* DAH, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 149010A..... 148986

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148887 ..G..... 148906

>[CP000395.1](#) *Borrelia afzelii* PKo, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148091 ..A..... 148067

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 147968 ..C..... 147987

>[CP000013.1](#) *Borrelia garinii* PBi, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148236 ..A..... 148212

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148113 ..C..... 148132

>[AY597794.1](#) *Borrelia hermsii* strain WAD flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..G..... 124

>[AY597791.1](#) *Borrelia hermsii* strain ALL flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..G..... 124

>[AY597777.1](#) *Borrelia hermsii* DAH flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..G..... 124

>[AY604980.1](#) *Borrelia parkeri* isolate RML flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143T..... 124

>[AY934619.1](#) *Borrelia parkeri* isolate CA216 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143T..... 124

>[AF307101.1](#) *Borrelia parkeri* strain 6230 flagellin (fla) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143T..... 124

>[X69613.1](#) *B.burgdorferi* p41 gene (partial)

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[X69610.1](#) B.burgdorferi p41 gene

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[X69609.1](#) B.burgdorferi p41 gene

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[X63413.1](#) B.burgdorferi fla gene for flagellin

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[X69608.1](#) B.burgdorferi p41 gene (partial)

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[X69607.1](#) B.burgdorferi p41 gene (partial)

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[X69614.1](#) B.burgdorferi p41 gene

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[X75202.1](#) B.afzelii fla gene

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 132 .A..... 156

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 255 ..C..... 236

>[X75203.1](#) B.garinii (Ip90) fla gene

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 96 .A..... 120

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 219 ..C..... 200

>[X69597.1](#) B.burgdorferi p41 gene for p41 protein

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[X69598.1](#) B.burgdorferi p41 gene for p41 protein

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[X53940.1](#) B.hermsii fla gene for flagellin sub-unit protein

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..G..... 124

>[AB022136.1](#) Borrelia valaisiana gene for flagellin protein, complete cds, strain: CKA4a

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..C..... 124

>[AB022132.1](#) Borrelia valaisiana gene for flagellin protein, partial cds, strain: CKA1

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[D82863.1](#) *Borrelia parkeri* DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143T..... 124

>[D82861.1](#) *Borrelia hermsii* DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..G..... 124

>[L42885.1](#) *Borrelia garinii* strain Ip90 flagellin (fla) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[L42876.1](#) *Borrelia burgdorferi* (strain NBS1ab) flagellin (fla) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[M86838.1](#) *Borrelia hermsii* flagellin protein (fla) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 307A..... 331

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 430 ..G..... 411

>[KF569936.1](#) *Borrelia theileri* strain KAT flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A.....T..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[DQ679905.1](#) *Borrelia persica* isolate CBkc7 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 6C..A..... 30

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 129 110

>[DQ679904.1](#) *Borrelia persica* isolate C1015B flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 6C..A..... 30

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 129 110

>[DQ673617.1](#) *Borrelia persica* isolate FL1 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 6C..A..... 30

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 129 110

>[AY850064.1](#) *Borrelia lonestari* isolate MO2002-V2 flagellin (fla) gene, complete cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A.....T..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[AY850063.1](#) *Borrelia lonestari* isolate MO2002-V1 flagellin (fla) gene, complete cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A.....T..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[AY166716.1](#) *Borrelia lonestari* flagellin gene, complete cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 244A.....T..... 268

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 367 348

>[CP009656.1](#) *Borrelia burgdorferi* strain B31, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148604 ..A..... 148580

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148481 ..T.....G..... 148500

>[CP005925.1](#) *Borrelia burgdorferi* CA382, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148640 ..A..... 148616

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148517 ..T.....G..... 148536

>[CP002228.1](#) *Borrelia burgdorferi* N40, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148265 ..A..... 148241

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148142 ..T.....G..... 148161

>[CP002312.1](#) *Borrelia burgdorferi* JD1, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148495 ..A..... 148471

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148372 ..T.....G..... 148391

>[CP001205.1](#) *Borrelia burgdorferi* ZS7, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148337 ..A..... 148313

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148214 ..T.....G..... 148233

>[AE000783.1](#) *Borrelia burgdorferi* B31, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148640 ..A..... 148616

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148517 ..T.....G..... 148536

>[X69611.1](#) *B. burgdorferi* p41 gene (partial)

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 ..A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T.....G..... 124

>[X75200.1](#) B.burgdorferi fla gene

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 126 .A..... 150

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 249 ..T.....G..... 230

>[X56334.1](#) B.burgdorferi GeHo fla gene

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 276 .A..... 300

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 399 ..T.....G..... 380

>[X15661.1](#) Borrelia burgdorferi (B31) fla gene for flagellin

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T.....G..... 124

>[X15660.1](#) Borrelia burgdorferi (GeHo) fla gene for flagellin

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20 .A..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 ..T.....G..... 124

>[X16833.1](#) Borrelia burgdorferi gene for flagellum-associated 41kD antigen (flagellin)

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 203 .A..... 227

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 326 ..T.....G..... 307

>[M34710.1](#) Borrelia burgdorferi flagellin (fla) gene, 5' end

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 512 .A..... 536

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 635 ..T.....G..... 616

>[EU492387.1](#) Borrelia sp. IA-1 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A.....G.. 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143T..... 124

>[EF688579.1](#) Uncultured *Borrelia* sp. isolate Carios spiro-1 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A.....G.. 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143T..... 124

>[CP000049.1](#) *Borrelia turicatae* 91E135, complete genome

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 148686A.....G.. 148662

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 148563T..... 148582

>[AY604979.1](#) *Borrelia turicatae* isolate 91E135 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A.....G.. 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143T..... 124

>[AY380808.1](#) *Borrelia burgdorferi* strain PD91 flagellin (fla) gene, complete cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20 ..A.....G.... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143 ..C..... 124

>[AY934630.1](#) *Borrelia turicatae* isolate FCB flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A.....G.. 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20
 Template 143T..... 124

>[AY934624.1](#) *Borrelia turicatae* isolate 91E135 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124
 Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25
 Template 20A.....G.. 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143T..... 124

>[D82862.1](#) *Borrelia turicatae* DNA for flagellin protein, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20A.....G.. 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143T..... 124

>[CP010308.1](#) *Borrelia miyamotoi* strain CT14D4, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148852C..A.....C..... 148828

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148729 148748

>[CP006647.2](#) *Borrelia miyamotoi* LB-2001, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 148852C..A.....C..... 148828

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 148729 148748

>[CP004217.1](#) *Borrelia miyamotoi* FR64b, complete genome

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 756524C..A.....C..... 756548

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 756647 756628

>[FJ874925.1](#) *Borrelia miyamotoi* strain 6T04-2 flagellin (flaB) gene, complete cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 23C..A.....C..... 47

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 146 127

>[AY604981.1](#) *Borrelia miyamotoi* isolate FR64b flagellin (flaB) gene, complete cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 20C..A.....C..... 44

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 143 124

>[D43777.1](#) *Borrelia miyamotoi* DNA for flagellin protein, complete cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 320C..A.....C..... 344

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 443 424

>[DQ679911.1](#) *Borrelia persica* isolate TGd1 flagellin (flaB) gene, partial cds

product length = 124

Forward primer 1 CGTCAGCTATTAATGCTTCAAGAAA 25

Template 1 .---...C..A..... 22

Reverse primer 1 ACACCCATACCAGCAGCATC 20

Template 121 102