

Nayara de Oliveira Belo

**OCORRÊNCIA DE *PLASMODIUM* spp. EM AVES SILVESTRES DA FAMÍLIA
PSITTACIDAE MANTIDAS EM CATIVEIRO NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Lygia Maria Friche Passos
(Laboratório de Protozoonoses-DMVP)

Co-Orientadora: Érika Martins Braga
(Laboratório de Malária-ICB)

Belo Horizonte-MG
Escola de Veterinária- UFMG
2007

B452 Belo, Nayara de Oliveira, 1979-

Ocorrência de Plasmodium spp. em aves silvestres da família psittacidae mantidas em cativeiro no Brasil / Nayara de Oliveira Belo.- 2007.
45 p. : il.

Orientadora: Lygia Maria Friche Passos

Co-orientadora: Érika Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Papagaio (Ave) – Doenças – Teses. 2. Malária aviária – Teses.
3. Plasmodium – Teses. I. Passos, Lygia Maria Friche. II. Martins, Érika.
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.686 089 6

Assinaturas

**Aos meus pais Nelson e Valmisia,
às minhas irmãs Najara e Naiana
e ao Mário.**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e presença em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais pelo incentivo. Às minhas irmãs, Najara e Naiana, pela amizade, carinho e conselhos sempre muito importantes.

Ao Mário pelo companheirismo, carinho, amor e compreensão.

Às minhas amigas da graduação Michelle, Raquel, Camila, Mayra e Mariana. Às minhas amigas, amantes dos animais silvestres, Luciana e Simone pelas conversas e pela amizade.

À professora e orientadora Lygia Maria Friche Passos por me orientar desde a iniciação científica, sempre demonstrando sabedoria e fornecendo todo apoio quando necessário.

À professora Érika Martins Braga por me co-orientar e por ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante o processo de pesquisa. Por sua amizade, principalmente.

Às amigas do "lab" de Protozoonoses Ana Célia e Ana Paula. Aos funcionários Mercês e Ricardo pelo carinho.

À Camila, agradeço pela sua amizade e por estar sempre presente desde a iniciação científica e durante todo o meu mestrado, sempre pronta a colaborar. À Julinha, amiga desde os primeiros períodos da graduação.

À Simone, pelo carinho e conselhos durante minha caminhada pelo mundo da ciência. Obrigada pelo grande incentivo.

Ao amigo Livio, agradeço pelas grandes idéias, pelo incentivo e pela enorme ajuda durante todo o meu mestrado. Obrigada mesmo!

Aos amigos do Laboratório de malária, Ludy, Rogério e Líliam por me receberem tão bem e com tanto carinho. Em especial para Kézia, agradeço por sua amizade e por estar sempre disposta a ajudar. Agradeço a Márcia pela ajuda no exame dos esfregaços sanguíneos.

Ao professor Múcio pelo uso do microscópio para as fotografias.

Ao Carlos por ter cedido às amostras de sangue das aves do Vale Verde Parque Ecológico.

À Taciana, pela coleta e envio das amostras de sangue das aves de Fortaleza.

Agradeço à Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte por ter permitido a realização das coletas das amostras de sangue das aves. Ao Marcelo pela amizade e ajuda fornecida durante as coletas. À Ângela pela ajuda nas escolhas das aves.

Ao professor Dr. Paulo Pimenta do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René Rachou por ter cedido às amostras de sangue infectadas com *Plasmodium gallinaceum*. Ao professor Dr. Nelson Rodrigo por ter cedido as amostras de sangue dos pintinhos, meu controle negativo.

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	9
1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1.	PARASITOS SANGUÍNEOS DE AVES	11
2.2.	PLASMÓDIOS AVIÁRIOS.....	12
2.2.1.	PAATOLOGIA DA INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> EM AVES	13
2.3.	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	14
2.3.1.	ESFREGAÇO SANGUÍNEO.....	14
2.3.2.	TÉCNICA MOLECULAR.....	15
3.	OBJETIVOS.....	16
3.1.	OBJETIVO GERAL	16
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1.	ORIGEM DOS ANIMAIS ANALISADOS	16
4.1.1.	FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DE BELO HORIZONTE (FZB-BH)	16
4.1.2.	VALE VERDE PARQUE ECOLÓGICO (VVPE)	17
4.1.3.	ZOOLOGICO DO MUNICÍPIO DE FORTALEZA (Zoo CE).....	17
4.1.4.	DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE AVES ANALISADAS	17
4.2.	COLETA DE MATERIAL	19
4.2.1.	ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS	23
4.2.2.	EXTRAÇÃO DO DNA.....	23
4.2.3.	AMPLIFICAÇÃO DO DNA-ALVO PELA PCR.....	23
4.2.4.	SEQÜENCIAMENTO	25
4.3.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	25
5.	RESULTADOS	26
5.1.	INFECÇÃO POR <i>PLASMODIUM</i> spp	26
5.1.1.	EXAME MICROSCÓPICO DE ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS.....	26
5.1.2.	DETECÇÃO DE <i>PLASMODIUM</i> PELA NESTED PCR (nPCR)	29
5.1.3.	OCORRÊNCIA TOTAL OBTIDA PELA CORRELAÇÃO ENTRE A MICROSCOPIA ÓPTICA E nPCR.....	32
5.1.4.	VARIAÇÃO SAZONAL NA OCORRÊNCIA DE <i>PLASMODIUM</i> spp	35
5.2.	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA.....	36
6.	DISCUSSÃO.....	36
7.	CONCLUSÕES.....	41
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Gêneros e espécies das aves examinadas por localidade estudada.....	18
Tabela 2	Ocorrência de <i>Plasmodium</i> spp. através do exame microscópico de esfregaços sanguíneos de psitacídeos (2005).....	29

Tabela 3	Ocorrência de <i>Plasmodium</i> spp. em psitacídeos através da nPCR. (2005).....	30
Tabela 4	Ocorrência total de <i>Plasmodium</i> spp entre psitacídeos da FZB-BH, VVPE e Zoo CE, avaliada pela M.O. e PCR.....	32
Tabela 5	Números e freqüências de amostras positivas e negativas para <i>Plasmodium</i> sp., obtidos pela microscopia óptica e PCR em aves da FZB-BH.....	33
Tabela 6	Números e freqüências de amostras positivas e negativas para <i>Plasmodium</i> sp., obtidos pela M.O. e PCR em aves do VVPE.....	33
Tabela 7	Números e freqüências de amostras positivas e negativas para <i>Plasmodium</i> sp., obtidos pela M.O. e PCR em aves do Zoo CE.....	33
Tabela 8	Números e freqüências totais de amostras positivas e negativas para <i>Plasmodium</i> sp., obtidos pela M.O. e PCR para 127 aves analisadas.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ave submetida à anestesia inalatória.....	19
Figura 2	Obtenção da amostra de sangue para confecção dos esfregaços sanguíneos e para a extração do DNA.....	19
Figura 3	Confecção do esfregaço sanguíneo.....	21
Figura 4	Obtenção do sangue para extração de DNA.....	21
Figura 5	Desenho esquemático da região de anelamento dos iniciadores da <i>nested</i> PCR e o tamanho dos fragmentos amplificados. Os números nos parênteses indicam as posições dos oligonucleotídeos no gene da 18S rRNA de <i>Plasmodium</i>	24
Figura 6	Esfregaço sanguíneo corado com Giemsa obtido de <i>Amazona aestiva</i> , evidenciando um trofozoíto de <i>Plasmodium</i> spp. (aumento 1000X).....	27
Figura 7	Exemplares de microfilárias observadas em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa obtidos de <i>Propyrrhura maracana</i> (aumento 1000X).....	27
Figura 8	Gel de poliácridamida 6% mostrando os produtos de amplificação das amostras de DNA por meio da amplificação do gene 18S rRNA de <i>Plasmodium</i> spp. por nPCR.....	30
Figura 9	Índice de Positividade dos gêneros de aves infectadas por <i>Plasmodium</i> sp., detectadas pela análise simultânea por M.O. e PCR em 127 aves pertencentes à três áreas distintas estudadas.....	34
Figura 10	Ocorrência total de <i>Plasmodium</i> sp. detectadas pela análise simultânea por M.O. e PCR de acordo com as três áreas distintas estudadas.....	34
Figura 11	Variação sazonal na ocorrência de <i>Plasmodium</i> sp. em psitacídeos da FZB-BH.....	35
Figura 12	Dendrograma relacionando a seqüência parcial do SSU rRNA e as seqüências obtidas das amostras de psitacídeos infectados por malária com as seqüências de plasmódios conhecidas. <i>Plasmodium falciparum</i> foi incluído para comparação da malária aviária com a malária de mamíferos.....	36

RESUMO

A ocorrência de malária aviária em 127 psitacídeos mantidos em condições de cativeiro em duas diferentes regiões do Brasil (estados de Minas Gerais e Ceará) foi analisada por exame microscópico de esfregaços sanguíneos e a amplificação do gene 18SSU rRNA de *Plasmodium*. Os resultados obtidos revelam uma alta ocorrência de *Plasmodium* spp. (36%), com índices de positividade similares entre as regiões estudadas. Trinta e nove aves pertencentes ao Zoológico de Belo Horizonte analisadas durante a estação da chuva e a estação da seca, não foram observadas diferenças significativas na frequência de infecção por *Plasmodium* entre as duas estações do ano. As espécies de aves mais comumente parasitadas foram: *Ara ararauna* (6/10) (60%), *Amazona amazonica* (3/10) (30%) e *Amazona aestiva* (28/73) (38,4%). A baixa parasitemia observada entre as aves infectadas sugere um status crônico da infecção nestas aves. Dez isolados obtidos de aves infectadas foram sequenciados e analisados, indicando a possível ocorrência de diferentes espécies de *Plasmodium* entre as aves investigadas. A alta ocorrência de infecção por *Plasmodium* spp. em aves de cativeiro aponta para a necessidade de um melhor controle de importações e exportações de psitacídeos entre diferentes regiões.

Palavras-chave: Psittacidae, Cativeiro, Malária aviária, *Plasmodium*, 18SSU rRNA.

ABSTRACT

The occurrence of avian malaria in 127 psittacine birds kept in captivity in two distinct regions in Brazil was evaluated through the direct examination of blood smears and the amplification of the 18SSU rRNA gene of *Plasmodium*. The results indicate a high occurrence of *Plasmodium* spp. (36%), without differences among the studied regions. Thirty-nine birds from one of the regions were evaluated during one rainy season and one dry season. However, no significant difference was observed between the prevalence rates of *Plasmodium* in the two seasons. The most frequently infected avian species were: *Ara ararauna* (6/10) (60%), *Amazona amazonica* (3/10) (30%) and *Amazona aestiva* (28/73) (38,4%). The low parasitemias observed among the infected birds suggest a chronic status of infection in these birds. The sequence analyses of ten isolates indicate a potential occurrence of distinct *Plasmodium* species among the bird species investigated. The high occurrence of *Plasmodium* spp. infections in captive birds points out to the need of a better control of importation and exportation of psittacine birds between different regions.

Keywords: Psittacidae; Captivity; Avian Malaria; *Plasmodium*, 18SSU rRNA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A malária aviária é uma doença infecciosa, produzida por várias espécies de parasitos sanguíneos do gênero *Plasmodium* acometendo aves de diversas espécies, gêneros e famílias. Além das aves, os plasmódios são encontrados entre répteis, seres humanos e outros mamíferos. Estes parasitos pertencem ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Haemosporina, família Plasmodidae, gênero *Plasmodium*, sendo agrupados em 14 subgêneros, assim distribuídos: sete subgêneros ocorrem em répteis (Telford, 1984), três subgêneros em mamíferos, quatro subgêneros em aves (GARNHAM, 1960). Os subgêneros foram divididos com base nas características morfológicas e biológicas dos estágios eritrocíticos e exo-eritrocíticos.

A identificação dos parasitos, realizada a partir da observação microscópica, é baseada nas características dos estágios intra-eritrocíticos assexuados e dos estágios gametogônicos, além da presença de grânulos de hemozoína (Telford, 1988).

Os plasmódios aviários estão distribuídos em várias partes do mundo, associados à presença de vetores dípteros pertencentes, principalmente, à família Culicidae.

O ciclo biológico do *Plasmodium* é heteroxeno, composto por um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado. A transmissão ocorre quando o vetor alimenta-se em uma ave infectada e ingere formas sexuadas denominadas gametócitos, que irão formar, no estômago do vetor, o oocisto. Este, ao se romper, libera os esporozoítos na cavidade celomática que seguem em direção às glândulas salivares, sendo o hospedeiro vertebrado infectado com esta forma quando picado pelo vetor. Os esporozoítos penetram nas células do sistema retículo endotelial e nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) presentes no local da picada e, posteriormente, nas células do SFM fixas à camada endotelial dos capilares sanguíneos cerebrais, do

baço, fígado, rins e de outros órgãos (Paraense, 1945), iniciando o ciclo exo-eritrocítico. Por divisão assexuada formam-se os esquizontes em divisões repetidas de merozoítos. Durante o desenvolvimento do ciclo eritrocítico os merozoítos após invadirem um eritrócito transformam-se por divisão esquizogônica, em esquizontes sanguíneos que ao romperem os eritrócitos liberam os merozoítos que invadirão hemácias maduras e imaturas. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos alguns trofozoítos se diferenciam originando as formas eritrocíticas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos que serão ingeridos pelo vetor.

A infecção causada pelo parasito é na maioria dos casos subclínica, porém recaídas podem ocorrer em condições de estresse ou na presença de infecções concomitantes com outros agentes de doença (Graczyk et al., 1994a; Waldenstrom et al., 2002). O aparecimento de sinais clínicos está associado a infecções agudas com a expressão muito rápida dos sintomas. As aves infectadas podem apresentar-se letárgicas, rejeitarem a bebida e comida, manifestar sinais de dor, além de penas eriçadas, cabeça decaída e olhos fechados. Em casos mais graves pode ocorrer palidez das mucosas, dispnéia, inapetência, regurgitação e morte (Atkinson et al., 1995).

A ocorrência e as conseqüências de infecções por *Plasmodium* em seus hospedeiros têm sido extensivamente estudadas em aves de vida livre. Vários estudos sobre a ocorrência do plasmódio em aves têm sido realizados em várias partes do mundo, incluindo América do Norte, América do Sul, Europa, Ásia e África (van Riper III, 1994; Deviche et al., 2001; Waldenstrom et al., 2002; Murata et al., 2002). A maioria destes estudos utiliza como método de diagnóstico o esfregaço sanguíneo para quantificar os hemoparasitos. Nos últimos anos, métodos de diagnóstico moleculares, com o objetivo de detectar as infecções por malária através da investigação do DNA, vêm sendo

utilizados para estudos epidemiológicos alcançando resultados satisfatórios.

Apesar do grande número de estudos relacionando a presença de hemoparasitos nas aves silvestres com os possíveis efeitos negativos que estes podem produzir, existem poucas informações sobre a ocorrência destes parasitos nas espécies da família Psittacidae e, principalmente, entre as aves mantidas em condições de cativeiro (Grim et al., 2003; Schrenzel et al., 2003).

Psitacídeos mantidos em cativeiro podem carregar agentes de doenças de áreas territoriais distantes consistindo um risco para a transmissão de doenças emergentes. O parasito pode não ser particularmente patogênico para algumas espécies, mas aves infectadas podem servir como reservatório para infecções de espécies mais vulneráveis (Ziman et al., 2004).

Algumas espécies de aves desta família são consideradas animais de estimação, convivendo com seres humanos e outros animais domésticos. Além disto, aves em cativeiro têm sido frequentemente destinadas para a reintrodução em ambientes naturais contribuindo para a distribuição mundial de parasitos. Assim, é necessário reconhecer a importância dos parasitos sanguíneos, como as espécies de *Plasmodium*, como potenciais agentes de doenças infecciosas entre as aves de cativeiro causando prejuízos econômicos para criatórios comerciais e danos para o meio ambiente livre deste parasito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PARASITOS SANGUÍNEOS DE AVES

Os hemoparasitos ou parasitos do sangue podem causar extinções de espécies de aves (van Riper III et al., 1986; Feldman et al., 1995), além de afetar a seleção sexual, a coloração de plumagem e o estado reprodutivo (Kirkpatrick e Ryan, 1991; Ricklefs et al., 1992; Deviche et al., 2001). Além disso, os indivíduos mais parasitados podem ser mais susceptíveis aos predadores e menos hábeis para

estabelecer territórios (Anderson e May, 1979).

Há vários anos, inúmeros estudos têm sido realizados em várias regiões do mundo sobre a ocorrência e prevalência de parasitos sanguíneos de aves (Greiner et al., 1975; Gutierrez, 1989; Bennett et al., 1991; Young et al., 1993; Muratta et al., 2002; Valkiunas et al., 2004; Reullier et al., 2006). No Brasil, a detecção de hemoparasitos de aves por microscopia óptica (M.O.) foi realizada no estado do Pará por Lainson et al. (1970), no estado de São Paulo por Bennett et al. (1980), Woodworth-Lynas et al. (1989) e Adriano e Cordeiro (2001). Sebaio em 2002 verificou a ocorrência de hemoparasitos em aves de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais.

Entre os gêneros do filo Apicomplexa mais prevalentes encontram-se *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* e *Lankesterella* (Bennett e Borrero, 1976; Julian e Galt, 1980; Hopinks et al., 1990; Garvin et al., 1993). O parasito do gênero *Trypanosoma*, assim como os filarídeos, ocorrem com frequência em aves silvestres e domésticas (Bennett e Borrero, 1976; Garvin et al., 1993; Holmstad et al., 2003; Matta et al., 2004).

Plasmodium, *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* têm sido documentados em várias partes do mundo associados à presença de vetores das famílias Culicidae e Simuliidae (Greiner et al., 1975). O *Haemoproteus* e o *Leucocytozoon* são considerados hospedeiro-específicos em nível de família ou subfamília (Bennett et al., 1982).

O *Haemoproteus* é um hemoparasito de alta ocorrência em algumas espécies de aves. Adriano e Cordeiro (2001) relataram ocorrência de 90% de pombos infectados por *Haemoproteus columbae* na cidade de Junqueirópolis/SP. Grande parte das infecções é assintomática e quando ocorre manifestação clínica, na maioria dos casos, está relacionada com a ruptura dos eritrócitos levando a um quadro de anemia (Garnham, 1960).

O *Leucocytozoon* é um parasito exclusivo de aves domésticas e silvestres. As espécies patogênicas podem causar sinais clínicos caracterizados por emaciação, anemia, sonolência, convulsão e coma. Quando o parasitismo é elevado pode-se observar a morte do animal (Garnham, 1960).

O *Trypanosoma avium*, assim como outros membros pertencentes a este gênero, são conhecidos como causadores de patologias no homem e animais, mas existem poucas evidências sobre a sua patogenicidade em aves (Baker, 1976).

Os filarídeos são nematódeos transmitidos pelos mosquitos da família Culicidae. Os vermes adultos vivem e amadurecem em cavidades do corpo, incluindo o olho, cérebro, sistema respiratório e cardiovascular, alguns produzem nódulos subcutâneos (Garnham, 1960).

2.2. PLASMÓDIOS AVIÁRIOS

Os plasmódios aviários são considerados parasitos de grande importância por serem utilizados extensivamente como modelos ecológicos de sistemas hospedeiro/parasito (Hamilton e Zuk, 1982; Atkinson e van Riper III, 1991), além de servirem como modelo para o estudo da malária humana. Assim, o ciclo completo de desenvolvimento dos plasmódios foi primeiramente determinado pelo estudo da malária aviária. Segundo Lucena (1939), foi na terapêutica da malária humana que o estudo da malária aviária alcançou maior prestígio com experimentos para verificar a atividade do cloridrato de quinina sobre o *Plasmodium praecox*, que acomete aves, conforme descrito por Kopenaris em 1911. Por outro lado, uma considerável parte do que se sabe hoje sobre a malária aviária surgiu de trabalhos sobre as espécies de *Plasmodium* em mamíferos (van Riper III et al., 1994).

Os parasitos do gênero *Plasmodium* podem ser transmitidos com relativa facilidade entre os hospedeiros a partir do repasto sanguíneo de vetores, geralmente dípteros ornitofílicos da família Culicidae, e principalmente dos gêneros *Culex*, *Aedes* e

raramente do gênero *Anopheles*, com conseqüente inoculação de esporozoítos. Estudos baseados na transmissão do parasito por passagens sanguíneas têm demonstrado que muitas espécies de *Plasmodium* de aves possuem uma ampla variedade de hospedeiros, o que resulta em uma rejeição à filosofia “um hospedeiro – um parasito”, anteriormente utilizada por muitos taxonomistas (van Riper III et al., 1994). Baseada em métodos moleculares esta filosofia tem sido re-interpretada. Estudos filogenéticos demonstram que há uma troca freqüente de hospedeiros durante a evolução do parasito. Assim, foi observado que uma linhagem de parasito pode infectar múltiplas espécies de hospedeiros (Waldenstrom et al., 2002).

Quatro subgêneros de *Plasmodium* são descritos: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Novyella* e *Huffia*.

O subgênero *Haemamoeba* compreende espécies com esquizontes eritrocíticos grandes e arredondados, gametócitos arredondados e esquizogonia exo-eritrocítica no sistema fagocítico mononuclear. É representado pelas espécies *P. relictum*, *P. matutinum*, *P. cathemerium* e *P. giovannolaia* que infectam passeriformes e são experimentalmente infectantes para canários. As espécies *P. gallinaceum*, *P. durae* e *P. griffithsi*, que são parasitos de aves galliformes, infectam experimentalmente galinhas (Garnham, 1960). O grupo de parasitos encontrados nos passeriformes e galliformes são transmitidos pelos culicídeos.

O subgênero *Giovannolaia* compreende parasitos com esquizontes eritrocíticos de tamanhos moderados a grandes, gametócitos alongados e a esquizogonia exo-eritrocítica que ocorre no sistema fagocítico mononuclear. A forma alongada dos gametócitos permite a diferenciação entre os subgêneros *Giovannolaia* e *Haemamoeba*. As principais espécies representantes deste subgênero são: *P. circumflexum* e *P. polare* que infectam passeriformes. As espécies que ocorrem em galliformes incluem o *P. lophurae*, *P. gundersi*, *P. durae*, *P. fallax*, *P. Garnhami*,

P. pinotti e *P. formosanum*. (Garnham, 1960).

O subgênero *Novyella* inclui espécies com esquizontes pequenos com no máximo oito merozoítos e gametócitos alongados: Os estágios assexuados possuem pouco citoplasma. As espécies podem ser divididas de acordo com seus hospedeiros vertebrados. Nos passeriformes as espécies encontradas são o *P. vaughani*, *P. rouxi*, *P. nucleophilum* e *P. hexamerium*. Nos Galliformes a espécie encontrada é o *P. juxtannucleare* (Garnham, 1960).

O subgênero *Huffia* é facilmente reconhecido por suas diferenças na esquizogonia exo-eritrocítica, possuem esquizontes eritrocíticos relativamente pequenos, com dez ou menos merozoítos, gametócitos alongados e esquizogonia exo-eritrocítica profunda e contínua nas células do sistema hematopoético, particularmente nas células precursoras dos eritrócitos. As espécies características são o *P. elongatum* e o *P. huffia* que parasita os tucanos (Garnham, 1960).

Através da classificação dos plasmódios em subgêneros fica mais fácil a identificação das espécies através da análise morfológica em esfregaços sanguíneos realizado por microscopia óptica. Atualmente acredita-se que 32 espécies de *Plasmodium* de aves sejam válidas (van Riper III et al., 1994).

A classificação das espécies de *Plasmodium* nos subgêneros proposta por Garnham (1960) tem sido questionada por alguns pesquisadores de plasmódios aviários (Greiner et al., 1975; Bennett et al., 1982) que advertem sobre a necessidade de uma maior compreensão sobre os ciclos de vida, hospedeiros e vetores para determinar quais dos subgêneros propostos são válidos.

2.2.1. PATOLOGIA DA INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* EM AVES

Estudos sobre a patologia provocada pelos parasitos da malária em aves apresentam resultados variados e, às vezes,

inconclusivos. Esses protozoários parecem ter relação comensal com a maioria de seus hospedeiros apresentando patogenicidade somente sob circunstâncias especiais (Julian e Galt, 1980).

Em particular, o *Plasmodium* pode ter um forte impacto negativo em seus hospedeiros especialmente quando a espécie de ave é exposta a este parasito pela primeira vez (van Riper III et al., 1986). A recuperação de uma infecção aguda por malária pode beneficiar um indivíduo e conferir resistência à re-infecção com isolados homólogos do parasito. A resistência à infecção de parasitos sanguíneos em aves também pode ser genética ou pode variar em certas localidades. A resistência pode ainda estar associada à idade (Schutler et al., 1995).

Segundo Garvin et al. (2003), a infecção por *Plasmodium* pode tornar os hospedeiros mais susceptíveis a fatores de mortalidade, incluindo outros patógenos e predadores. Além disso, hospedeiros parasitados podem se tornar menos hábeis para estabelecer territórios (Anderson e May, 1979). Apesar das parasitoses serem responsáveis por extinções de espécies silvestres, a causa de mortalidade só tem sido identificada a *posteriori* (McCallum e Dobson, 1995).

A sintomatologia da infecção por hemoparasitos demonstra ser bastante variável, apresentando desde expressão assintomática a casos de óbito. Essa variação pode estar relacionada a diversos fatores que influenciam o organismo da ave infectada e que levam a um quadro de imunodepressão (Cubas, 1992). Observa-se ainda que a gravidade da doença está diretamente relacionada com o nível de parasitemia (Garnham, 1960). A maioria das aves infectadas permanece ativa, não exibindo sinais de dor (Castle e Christensen, 1990). Porém, Atkinson et al. (2000) verificaram experimentalmente que aves infectadas por *P. relictum* apresentaram significativo declínio no consumo de alimentos e perda de peso após 60 dias de infecção. Estudos realizados em laboratório por Atkinson e van Riper III (1991), onde canários, galinhas, patos e perus foram infectados com

Plasmodium spp., mostraram que os efeitos patológicos da infecção sobre os hospedeiros estão associados tanto com os estágios teciduais como eritrocíticos do parasito.

Aves infectadas por *Plasmodium* spp. podem apresentar uma fase crônica ou latente de infecção, na qual a resposta imune tenha reduzido a parasitemia a níveis bastante baixos e as aves sobreviventes apresentam, portanto, pouco ou nenhum sinal de infecção. Assim, as aves podem permanecer infectadas por toda a vida, resistindo a recaídas periódicas que são controladas por interações complexas entre a resposta imune do hospedeiro e o estresse fisiológico (Atkinson e van Riper III, 1991). Essas infecções crônicas que acometem a grande maioria das aves são difíceis de serem detectadas através do exame de esfregaços sanguíneos a menos que ocorra uma reativação por atividade hormonal ou estresse fisiológico e ambiental (Atkinson e van Riper III, 1991).

Estudos sobre a defesa imune contra hemoparasitos sugerem que a resposta imunológica varia entre as espécies e assim poderia afetar na aptidão de cada uma selecionando-as de maneira a contribuir para uma maior abundância de uma espécie em relação à outra (Lee et al., 2006). Os parasitos têm potencial para influenciar a mortalidade e reprodução podendo representar importante fator de seleção entre as aves.

A malária aviária é uma doença de aves de vida livre e aves mantidas em condições de cativeiro (Grim et al., 2003). A malária em aves de cativeiro vem sendo identificada como a causa de morte na presença de sinais clínicos como anorexia, depressão, dificuldade respiratória e com parasitemia alta. Os sinais *post-mortem* incluem esplenomegalia, edema pulmonar, hidropericárdio e presença do parasito no sistema retículo-endotelial (Grim et al., 2003). Aves em cativeiro apresentam com frequência alterações reprodutivas, sendo relacionadas na maioria das vezes, às condições estressantes que são submetidas. Um estudo realizado por

Marzal et al. (2004) revela que o parasitismo por malária pode influenciar o sucesso reprodutivo das aves devido à alteração da dinâmica do sistema imune causada pela infecção.

Um grande problema relacionado com infecções por *Plasmodium* em aves de cativeiro é a impossibilidade de saber se a ave foi infectada antes ou após sua entrada no cativeiro. Como medida de controle, é essencial que as aves destinadas ao cativeiro sejam submetidas a um período de quarentena antes da sua entrada nos recintos (Ziman et al., 2004).

A ocorrência do parasito é afetada pela capacidade do hospedeiro para igualmente repetir a infecção parasitária ou controlar a infecção já estabelecida (Atkinson e van Riper III, 1991).

2.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

2.3.1. ESFREGAÇO SANGUÍNEO

Vários estudos sobre ocorrência de parasitos do sangue de aves têm sido realizados. A maior parte das pesquisas se concentrou em regiões específicas da Ásia (Murata et al., 2002), África (Seghal et al., 2005), Europa (Scheuerlein et al., 2004). Nas Américas, os trabalhos se concentram na América do Norte (Deviche et al., 2001; Bennett et al., 1991) e América do Sul (Valkiunas et al., 2004; Matta et al., 2004).

No Brasil, os estudos mais recentes foram realizados por Adriano e Cordeiro (2001), Woodworth-Lynas et al. (1989) e Bennett e Souza (1980), todos no estado de São Paulo. No estado de Minas Gerais, Sebaio et al. (2002) encontraram baixa ocorrência de hemoparasitos (15,8%) em aves localizadas na Mata Atlântica quando comparadas às regiões temperadas.

Estes estudos que investigaram a ocorrência e/ou a parasitemia de plasmódios aviários e de outros hemoparasitos de aves utilizaram como método de diagnóstico o esfregaço sanguíneo. Este método busca quantificar

os hemoparasitos através da observação de um determinado número de campos microscópicos e/ou período de tempo do exame fornecendo uma estimativa do número de parasitos (van Riper III et al., 1986).

A análise de esfregaços sanguíneos para se estimar o número de eritrócitos infectados não fornece determinação precisa do número de parasitos presentes. Além disso, um período preestabelecido de tempo para o exame dos esfregaços pode não ser uma estimativa confiável do número total de eritrócitos examinados (Godfrey et al., 1987).

A detecção direta de parasitos em esfregaços sanguíneos não é uma tarefa fácil durante as fases crônicas ou latentes, que correspondem à situação da maioria das aves infectadas (Atkinson e van Riper III, 1991). Outra desvantagem do esfregaço sanguíneo é que, por se tratar de um método muito trabalhoso, requer técnicos treinados capazes de examinar um número elevado de esfregaços por dia (Barker et al., 1992). Apesar das desvantagens apresentadas pelo método, ele ainda é considerado essencial para a detecção do parasito na ave, sendo utilizado extensivamente como método de diagnóstico padrão.

2.3.2. TÉCNICA MOLECULAR

Nos últimos anos, foram realizados esforços consideráveis na tentativa de desenvolver métodos de diagnóstico para detecção de infecções por malária baseados na investigação do DNA do parasito.

Técnicas moleculares permitem o processamento de um número elevado de amostras por dia, por um único técnico treinado, tornando tais métodos adequados para estudos epidemiológicos e para diagnósticos de rotina (Barker et al., 1992). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um desses métodos de diagnóstico. Este método usa o conhecimento da variação das seqüências para detectar especificamente linhagens diferentes de parasitos. A amplificação de uma seqüência

genômica específica através da PCR para estudos epidemiológicos é bastante conveniente por se tratar, na maioria dos casos, de quantidades limitadas de amostras disponíveis (Henning et al., 1999).

As pesquisas têm demonstrado que a PCR é uma técnica mais sensível do que o exame microscópico de esfregaços sanguíneos para a detecção de *Plasmodium* spp. no sangue de mamíferos, répteis e aves (Feldman et al., 1995; Perkins et al., 1998; Ribeiro et al., 2005).

Alguns protocolos de PCR são sensíveis para detectar infecções com concentrações de DNA do parasito correspondente a um eritrócito infectado em 100.000 não infectados (Waldenstrom et al., 2002; Fallon et al., 2003).

Muitos protocolos de PCR foram desenvolvidos a partir de seqüências conservadas do *Plasmodium* e assim amplificam este gênero (Richard et al., 2002). Richard et al. (2002) fizeram uma comparação entre quatro protocolos de PCR para a detecção de *Plasmodium* spp. em aves, entre eles os descritos por Feldman et al. (1995) e por Bensch et al. (2000). Os autores demonstram que alguns protocolos podem funcionar bem em determinadas circunstâncias, mas podem também não funcionar em outras.

A maioria dos estudos baseados na técnica de PCR para a detecção de *Plasmodium* em aves utilizam iniciadores que visam amplificar uma região do gene codificador do RNA ribossomal do parasito, especificamente uma região da subunidade menor 18S (18S rRNA) (Feldman et al., 1995). Existem ainda iniciadores desenvolvidos com base em regiões conservadas do gene do citocromo b (Bensch et al., 2000).

A técnica de PCR pode ser utilizada na caracterização de diferentes populações de plasmódios em aves naturalmente infectadas. Além disso, pode fornecer diagnósticos rápidos e confiáveis mesmo quando determinada amostra apresentar baixos níveis de parasitismo ou encontrar-

se infectada por mais de uma espécie de parasito. É considerado um método muito eficiente e com maior acurácia (Richard et al., 2002).

Através de métodos moleculares e análise filogenética é possível relacionar molecularmente as várias espécies de plasmódios que infectam mamíferos, aves e répteis. Recentemente, vários estudos baseados na análise molecular do parasito causador da malária aviária, revelaram uma riqueza de diversidade genética entre as linhagens do parasito que não são aparentes em sua morfologia (Bensch et al., 2000; Ricklefs e Fallon, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a ocorrência de *Plasmodium* spp em aves silvestres brasileiras da família Psittacidae mantidas em cativeiro em duas regiões diferentes do Brasil através de métodos de diagnóstico direto.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o parasitismo por *Plasmodium* spp. em psitacédeos através de exame microscópico de esfregaços sanguíneos;
- Extrair DNA a partir de sangue total de psitacédeos mantidos em cativeiro;
- Detectar a infecção por *Plasmodium* spp. em psitacédeos utilizando a PCR para amplificação específica do gene que codifica a subunidade menor do rRNA (18S rRNA);
- Comparar os resultados obtidos pela técnica de PCR e o exame direto de esfregaços sanguíneos para detecção da infecção por *Plasmodium* sp em psitacédeos no Brasil;
- Correlacionar a frequência de *Plasmodium* às dietas das aves;

- Verificar a possível variação sazonal do parasitismo entre psitacédeos mantidos em cativeiro;
- Caracterizar molecularmente as diferentes amostras de *Plasmodium* que infectam naturalmente psitacédeos em cativeiro através do seqüenciamento do gene 18S rRNA dos parasitos e comparar com as seqüências já depositadas no GeneBank.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ORIGEM DOS ANIMAIS ANALISADOS

4.1.1. FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DE BELO HORIZONTE (FZB-BH)

Foram coletadas amostras de sangue de psitacédeos da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, localizada à avenida Dr. Otacílio Negrão de Lima, nº 8000, bairro Pampulha. A FZB-BH é formada por um zoológico dividido pelas Seções de Répteis, Aves, Mamíferos, Veterinária, Nutrição e Fazenda Educativa, Enriquecimento Ambiental e Condicionamento Animal.

A Seção de Aves mantém em cativeiro 600 indivíduos classificados em 139 espécies, 33 famílias e 16 ordens. Possui uma infraestrutura composta por 82 recintos em área de exposição distribuídos ao longo do Parque da seguinte forma

- Lago dos Cisnes;
- Recintos: Urubu-rei, Garça faceira, Tucano-açú;
- Área dos pássaros coloridos, que compreende 21 recintos;
- Praça das Aves, que possui 52 recintos;
- Lago dos Flamingos, com mais 4 ambientes para as aves.

Para dar suporte à área de exposição, a Seção mantém um Setor-Extra de Aves que compreende 42 recintos. Todos os recintos

possuem telas metálicas, as aves têm acesso livre ao solo que, na grande maioria, é coberto por cimento ou areia. Toda esta estrutura é mantida por um biólogo, um técnico agrícola e nove tratadores que trabalham diariamente na manutenção e conservação das aves em cativeiro. A higienização dos recintos é realizada diariamente, bem como a limpeza dos vasilhames de alimento e água. A alimentação é a base de ração industrializada com complementação de frutas.

4.1.2. VALE VERDE PARQUE ECOLÓGICO (VVPE)

Foram utilizadas aves da espécie *Amazona aestiva* do plantel do Vale Verde Parque Ecológico (VVPE) que está localizado próximo ao quilometro 39 da rodovia MG 50, no bairro de Vianópolis, região rural do município de Betim – MG.

O local é um parque zoológico especializado em aves com cerca de 1.000 animais das mais variadas ordens e um criatório de Psitaciformes. O VVPE possui uma área de aproximadamente 20 ha., cercado por canaviais e uma reserva florestal, além de duas lagoas com cerca de 12.000 m² de lâmina d'água. O criatório comercial do VVPE está localizado no terço final da propriedade, em uma área de cerca de 10.000 m². Possui um plantel de aves silvestres nacionais da família Psittacidae, a grande maioria, pertencentes à espécie *Amazona aestiva* conhecida popularmente por papagaios verdadeiros.

Os animais são alocados em viveiros tipo gaiolas suspensas, portanto não têm acesso ao chão diminuindo os riscos sanitários. Os viveiros são de tela metálica soldada e formato retangular (2,5 m. de comprimento x 1,5 m de altura de 1,5 m de largura), suspensos sobre estrutura metálica a 1,0 m. do chão. O manejo é feito duas vezes ao dia. Nesta rotina, água e comida são renovados, bem como são executadas rotinas de higiene.

A alimentação é feita através de rações extrusadas que oferecem a totalidade dos nutrientes necessários, além de outros

alimentos como frutas, legumes, verduras e sementes, numa proporção de cerca de 10% a 15% do consumo diário de comida. A água é oferecida *ad libitum*.

4.1.3. ZOOLOGICO DO MUNICÍPIO DE FORTALEZA (Zoo CE)

Foram coletadas amostras de aves pertencentes a dois zoológicos da região metropolitana de Fortaleza, o Zoológico Municipal de Fortaleza e o Parque Ecológico Ecopoint (Zoo CE). As aves, nos dois zoológicos, são alojadas em recintos fechados. As aves possuem contato com o chão que é coberto de areia. A limpeza dos recintos é realizada diariamente.

Os psitacídeos ficam agrupados nos recintos de acordo com o tamanho da espécie, ou seja, araras, papagaios e periquitos. No Zoológico Municipal de Fortaleza existem aproximadamente sete espécies de psitacídeos, enquanto que no zoológico Ecopoint as aves estão distribuídas em seis espécies da família Psittacidae.

Há uma lagoa a 500 metros de distância dos recintos do Zoológico Municipal. No Zoológico Ecopoint existem recintos com tanques de água que são higienizados em dias alternados, a lagoa mais próxima localiza-se a 1 km de distância do zoológico. A alimentação é composta por ração, assim como nos outros criatórios, baseada em uma mistura de sementes e frutas que são fornecidos diariamente. A água é oferecida *ad libitum*.

4.1.4. DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE AVES ANALISADAS

Foram analisadas 127 aves pertencentes à família Psittacidae totalizando 21 espécies distribuídas em 10 diferentes gêneros. Das 127 aves, 41 pertenciam a FZB-BH, 54 ao VVPE e 32 ao Zoo CE. As 54 aves pertencentes ao VVPE eram todas da espécie *Amazona aestiva* (Tabela 1). Para a FZB-BH e Zoo CE outros gêneros e espécies foram amostrados conforme apresentado na Tabela 1

Tabela 1: Gêneros e espécies das aves examinadas por localidade estudada.

Área	Gênero	Espécie	Nomes populares	Nº de aves examinadas
	<i>Amazona</i>	<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio do mangue	5
		<i>Amazona festiva</i>	Arara colar	1
		<i>Amazona rhodocorytha</i>	Papagaio do Espírito Santo	1
		<i>Amazona xanthops</i>	Papagaio galego	2
	<i>Anodorhynchus</i>	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara azul	2
	<i>Ara</i>	<i>Ara ararauna</i>	Arara canindé	10
		<i>Ara macao</i>	Arara piranga	1
FZB-BH	<i>Deropterus</i>	<i>Deropterus accipitrinus</i>	Anacã	1
	<i>Graydilasculus</i>	<i>Graydilasculus brachyurus</i>	Curica verde	1
	<i>Nandayus</i>	<i>Nandayus nenday</i>	Príncipe negro	5
	<i>Pionus</i>	<i>Pionus maximilliani</i>	maritaca	2
		<i>Pionus maximilianus</i>	maitaca	5
	<i>Pionopsitta</i>	<i>Pionopsitta pileata</i>	Cuiú-cuiú	1
	<i>Propyrrhura</i>	<i>Propyrrhura auricollis</i>	Arara de colar	1
		<i>Propyrrhura maracana</i>	Arara maracanã	3
VVPE	<i>Amazona</i>	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	54
Zoo CE	<i>Amazona</i>	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	19
		<i>Amazona amazonica</i>	Papagaio do mangue	6
		<i>Amazona farinosa</i>	Papagaio moleiro	2
	<i>Ara</i>	<i>Ara chloroptera</i>	Arara vermelha	1
	<i>Aratinga</i>	<i>Aratinga cactorum</i>	Ararinha do sertão	1
		<i>Aratinga jandaya</i>	Jandaia-verdadeira	3
TOTAL				127

4.2. COLETA DE MATERIAL

Amostras de sangue foram coletadas de 127 aves silvestres da família Psittacidae que compõem o plantel da FZB-BH, da fazenda VVPE e do Zoo CE. Os animais foram retirados de seus viveiros com o auxílio de um puçá e contidos quimicamente pelo uso de agente anestésico volátil

(Isoflurano) através de uma máscara facial. Esta medida visou tornar mais fácil a manipulação da ave e, ao mesmo tempo, tornou o procedimento menos traumático (Figuras 1 e 2).

As aves foram pesadas e passaram por um exame clínico padrão.

As mesmas aves pertencentes a FZB-BH foram avaliadas por dois períodos, de agosto a setembro e de janeiro a fevereiro, correspondendo aos períodos de seca e chuva, respectivamente.

Foram coletados aproximadamente 100 μ l de sangue periférico colhido a partir do corte superficial de uma unha da ave (Figuras 3 e 4), o qual se destinou parte à confecção imediata de esfregaços sanguíneos totalizando três esfregaços por animal. O restante foi adicionado em tubo contendo EDTA mantidos sob refrigeração para posterior extração de DNA (Figuras 3 e 5).

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (registro n.º 149/05)



Figura 1: Ave submetida à anestesia inalatória.



Figura 2: Obtenção da amostra de sangue para confecção dos esfregaços sanguíneos e para a extração do DNA



Figura 3: Confeção do esfregaço sanguíneo



Figura 4: Obtenção do sangue para extração de DNA

4.2.1. ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS

Os esfregaços sanguíneos foram preparados no local da coleta (Figura 3), seca ao ar e no Laboratório de Malária do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB) foram fixados em metanol por 5 minutos e, em seguida, corados com solução de Giemsa 10% para a pesquisa direta de hemoparasitos. Os esfregaços foram examinados exaustivamente. O re-exame dos esfregaços sanguíneos foi realizado por microscopia óptica (M.O.) após a positividade observada pela PCR e a densidade de *Plasmodium* spp. foi quantificada após a observação de 200 campos microscópicos (aproximadamente 150 eritrócitos/campo) em aumento de 1000X usando óleo de imersão.

4.2.2. EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada empregando-se o Kit Wizard® Genomic

DNA Purification (Promega MA, EUA). Vinte microlitros de sangue que estavam em tubos com EDTA foram adicionados a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml contendo 300 µL de solução de lise celular permanecendo por 20 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 1,5 µL de solução de RNase A (4 mg/ml) a cada tubo contendo as amostras, em seguida foram incubados a 37°C em banho-maria por 15 minutos, após o resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 100µL de solução de precipitação de proteína. Os tubos foram homogeneizados por 20 segundos e centrifugados a 13.000 - 16.000g por 3 minutos à temperatura ambiente.

rPLU1 → 5' - TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA – 3'

rPLU5 → 5' - CCTGTTGTT GCCTTAAACTCC – 3'

rPLU3 → 5' - TTT TTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT – 3'

rPLU4 → 5' - TACCGTCATAGCCATGTTAGCCAATACC – 3'

Na primeira reação de amplificação, cada tubo recebeu 5 µl do "DNA -molde" e 20 µl de tampão de reação contendo 10 mM Tris HCl, pH 8,5, 50 mM KCl; 4mM MgCl₂ (PHONEUTRA); 200 µM dNTP; 2,5 U Taq DNA polimerase; 15pm/µl de cada iniciador

Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 300 µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos gentilmente até o aparecimento de fitas brancas de DNA e centrifugados por 1 minuto a 13.000 -16.000 g à temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante foram adicionados 300 microlitros de etanol 70% para a lavagem do sedimento e remoção de traços de sal. Os tubos foram novamente centrifugados por 1 minuto a 13.000 -16.000 g, o líquido sobrenadante foi desprezado e escorrido em papel absorvente. Um volume de 50 µL de solução de rehidratação de DNA (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) foi adicionado por tubo para ressuspensão do DNA. O DNA foi armazenado a 4°C até o momento da amplificação.

4.2.3. AMPLIFICAÇÃO DO DNA-ALVO PELA PCR

A amostras do DNA foram processadas por *nested* PCR (nPCR) para amplificação do gene estrutural 18S rRNA executada de acordo com Ribeiro et al. (2005). Na primeira reação de amplificação, foram utilizados iniciadores *Plasmodium* - específico (rPLU 1 e rPLU 5), sendo o produto desta reação utilizado como "DNA-molde" para uma segunda reação de amplificação, com iniciadores também gênero-específico (rPLU 3 e rPLU4) (Figura 5).

As seqüências dos iniciadores utilizados foram as seguintes

e água ultra pura estéril. Para evitar a evaporação dos reagentes foi adicionado uma gota de óleo mineral extra-puro.

O programa da primeira amplificação consistiu de 40 ciclos de desnaturação a

94°C por 30 segundos, seguida de anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 min. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C por 4 min e a extensão final a 72°C por 4 min, finalizando com temperatura de 4°C.

Na segunda reação de amplificação, cada tubo recebeu a mesma composição descrita anteriormente modificando apenas a temperatura de anelamento que foi de 62°C.

Os controles positivos utilizados nas reações de PCR compreenderam DNA genômico de *Plasmodium berghei* (obtidos de sangue de camundongos experimentalmente infectados) e de *Plasmodium gallinaceum* (obtidos de pintinhos infectados experimentalmente e gentilmente cedido pelo professor Dr. Paulo Pimenta do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisa René

Rachou (CPqRR), Belo Horizonte). Os controles negativos foram amostras de DNA obtidas de sangue de pintinhos mantidos livres de infecção (gentilmente cedido pelo professor Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte).

Os produtos de 210 pb a 300 pb da reação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 6%, não desnaturante, em tampão TBE 1X. Os géis de poliacrilamida foram fixados em solução de álcool etílico 10% e ácido acético 0,5%, corados em solução de nitrato de prata e os fragmentos de DNA evidenciados quando em solução reveladora de hidróxido de sódio e formaldeído (Sanguinetti et al., 1994).

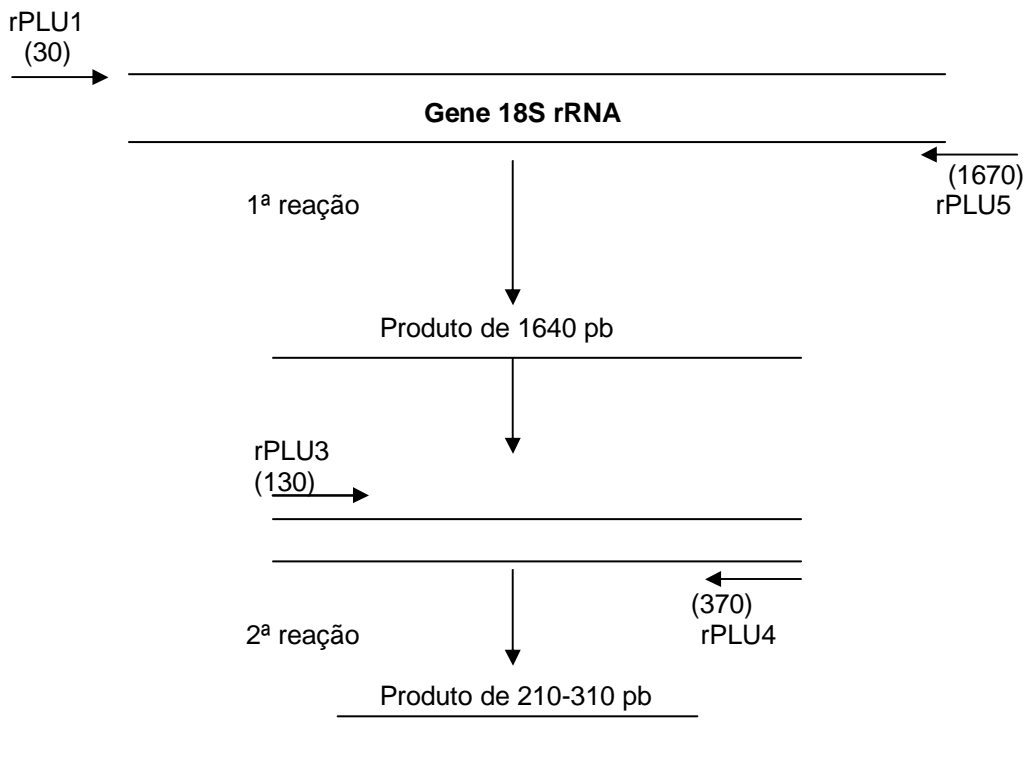


Figura 5: Desenho esquemático da região de anelamento dos iniciadores da *nested* PCR e o tamanho dos fragmentos amplificados. Os números nos parênteses indicam as posições dos oligonucleotídeos no gene da 18S rRNA de *Plasmodium*

4.2.4. SEQÜENCIAMENTO

Os produtos da nPCR de 10 amostras positivas foram purificados a partir do gel de ágarose 1,5% utilizando o Kit de purificação de gel Amersham (Biosciences). As amostras foram obtidas a partir do corte das bandas formadas no gel colocadas em tubos de microcentrífuga, pesadas e, para cada 10 mg de peso do gel, adicionou-se 10 µL de solução tampão. Em seguida, os tubos foram vortexados vigorosamente, incubados a 60°C por 5-15 minutos até a dissolução completa do gel de agarose e centrifugada. A amostra foi transferida para purificação em uma coluna GFX. Após a transferência da amostra, incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto, centrifugou-se por 30 segundos e o líquido presente no tubo coletor foi descartado. À coluna GFX foram adicionados 500 µL de solução de lavagem (10mM Tris-HCL pH 8.0, 1mM EDTA) centrifugando por 30 segundos. Novamente o líquido remanescente no tubo coletor foi descartado. A coluna GFX foi acoplada a um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Trinta microlitros de solução tampão (10 mM Tris-HCL pH 8.0, TE pH 8.0) foram adicionados diretamente à coluna GFX. Finalmente, após incubar por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugar por 1 minuto, obteve-se o DNA purificado no tubo de microcentrífuga.

O sequenciamento foi realizado de acordo com o DYEnamic™ ET dye terminator kit (Amersham Biosciences) em tubos de microcentrífuga de 0,5mL ou placas de sequenciamento (96 poços) com um volume final de 10 µL contendo 0,5 µM do iniciador rPLU3 direto (5' - TTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT-3') ou reverso rPLU4(5'-TACCGTCATAGCCATGTTAGGCCA ATACC - 3') 200ng de DNA plasmidial, 4 µL de ETkit (premix para sequenciamento) e água ultra pura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em um termociclador com 30 ciclos a 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram

precipitados pela adição de 1µL de acetato de amônio (7,5M) e 25µL de etanol 95%, após incubação a 25°C por 15 minutos, seguido de centrifugação a 4000g por 45 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e 150µL de etanol 70% adicionado às amostras seguindo-se de uma centrifugação a 4000g por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento re-suspenso por agitação em vortex com 10µL do tampão de re-suspensão contendo 70% de formamida e 1mM de EDTA.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos à leitura no sequenciador automático capilar *MegaBACE 1000 sequencing system* com uma injeção de 2 Kv por 100 segundos e corrida de 6 Kv por 230 segundos.

As seqüências foram alinhadas e editadas no programa Mega 3.0 (Kumar et al., 2004). A definição da linhagem do parasito foi baseada na divergência de 240 nucleotídeos seqüenciados do gene do parasito. Para comparação, as seqüências de *Plasmodium juxtannucleare* (AF463507.1), *P. gallinaceum* (M61723.1), *P. lophurae* (X13706.1) da ordem dos galliformes, *P. cathemerium* (AY625607.1) da ordem dos passeriformes e *P. falciparum* (M19173), foram incluídas nas análises.

As seqüências de nucleotídeos foram submetidas ao GenBank com números de acesso: EF090273, EF090274, EF090275, EF090276

4.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Epi-info version 6.03 (Center of Diseases Control, Atlanta, GA). O teste de Qui-quadrado com correção de Yates foi realizado para a análise e comparação das freqüências do parasito nas aves do FZB-BH, VVPE e Zoo CE. Este teste também foi utilizado para verificar diferenças entre as ocorrências de *Plasmodium* spp para os períodos da seca e chuva e de acordo com as características biológicas como o sexo e a idade das aves.

Valor de $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. INFECÇÃO POR *PLASMODIUM* spp

5.1.1. EXAME MICROSCÓPICO DE ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS

Em uma primeira etapa, determinou-se a ocorrência geral de infecção por *Plasmodium* spp. de acordo com a presença de formas eritrocíticas do parasito detectadas pela observação microscópica de esfregaços sanguíneos. Para isso, analisaram-se somente as aves amostradas na primeira coleta das duas coletas realizadas na FZB-BH em comparação às aves pertencentes ao VVPE e Zoo CE.

Do total de 127 esfregaços sanguíneos examinados, 31 apresentaram parasitos do gênero *Plasmodium*, perfazendo, assim uma ocorrência total de 24,4 % (Figura 6). As espécies que apresentaram maior frequência de indivíduos parasitados pela análise microscópica de esfregaços

sanguíneos foram *Amazona aestiva* (n =73) (32,8%) e *Ara ararauna* (n=10) (30%).

Não foi verificada diferença significativa na ocorrência de infecção por *Plasmodium* para cada uma das localidades estudadas (22% para FZB-BH, 31% para VVPE e 18,8 % para Zoo CE) (Tabela 2).

É importante mencionar que o nível de parasitos detectado nos exames microscópicos foi baixo (1-7 parasitos/200 campos microscópicos) sendo frequentemente encontradas poucas formas evolutivas dos parasitos (trofozoítos em sua maioria), impossibilitando a identificação específica de acordo com as características morfológicas dos mesmos.

Um exemplar de microfilária foi microscopicamente observado em esfregaços de uma das aves amostradas (*Procyrrhura maracana*) pertencente à FZB-BH (Figura 7). Este foi o único hemoparasito, além dos plasmódios, observado microscopicamente para todas as 127 aves amostradas.



Figura 6: Esfregaço sanguíneo corado com Giemsa obtido de *Amazona aestiva*, evidenciando um trofozoíto de *Plasmodium* spp. (aumento 1000X)

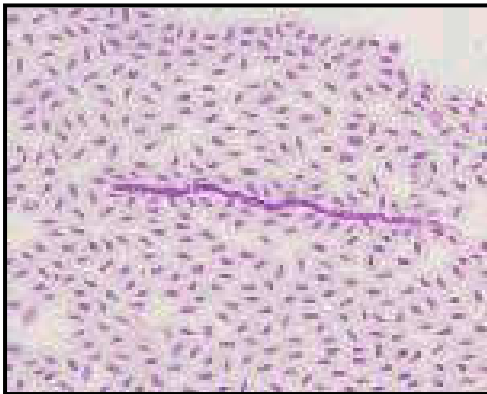


Figura 7: Exemplos de microfírias observadas em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa obtidos de *Propyrrhura maracana* (aumento 1000X).

Tabela 2: Ocorrência de *Plasmodium* spp. através do exame microscópico de esfregaços sanguíneos de psitacídeos (2005)

Área	Espécie	Nº aves examinadas	Nº aves infectados	Índice de positividade (%)
FZB-BH	<i>Amazona amazonica</i>	5	1	20
	<i>Amazona festiva</i>	1	0	0
	<i>Amazona rhodocorytha</i>	1	1	100
	<i>Amazona xanthops</i>	2	1	50
	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	2	0	0
	<i>Ara ararauna</i>	10	3	30
	<i>Ara macao</i>	1	0	0
	<i>Deroptyus accipitrinus</i>	1	1	100
	<i>Graydílascalus brachyurus</i>	1	1	100
	<i>Nandayus nenday</i>	5	0	0
	<i>Pionus maximillanii</i>	2	0	0
	<i>Pionus maximilianus</i>	5	0	0
	<i>Pionopsitta pileata</i>	1	0	0
	<i>Propyrrhura auricollis</i>	1	0	0
	<i>Propyrrhura maracana</i>	3	1	33
TOTAL		41	9	22
VVPE	<i>Amazona aestiva</i>	54	17	31,5
TOTAL		54	17	31,5
Zoo CE	<i>Amazona aestiva</i>	19	5	26,3
	<i>Amazona amazonica</i>	6	1	16,7
	<i>Amazona farinosa</i>	2	0	0
	<i>Ara chloroptera</i>	1	0	0
	<i>Aratinga cactorum</i>	1	0	0
	<i>Aratinga jandaya</i>	3	0	0
TOTAL		32	6	18,8

5.1.2. DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* PELA NESTED PCR (nPCR)

A ocorrência de plasmódios também foi determinada utilizando-se a amplificação de gene 18S rRNA para as 127 aves em três localidades distintas. Para isso, da mesma forma como para o exame microscópico, foram analisadas somente as aves amostradas na primeira coleta realizada na FZB-BH em comparação às aves pertencentes ao VVPE e Zoo CE.

As frequências de infecções por plasmódios detectadas por PCR para as localidades FZB-BH, VVPE e Zoo CE foram de 31,7%, 39% e 31,2% , respectivamente (Tabela 3).

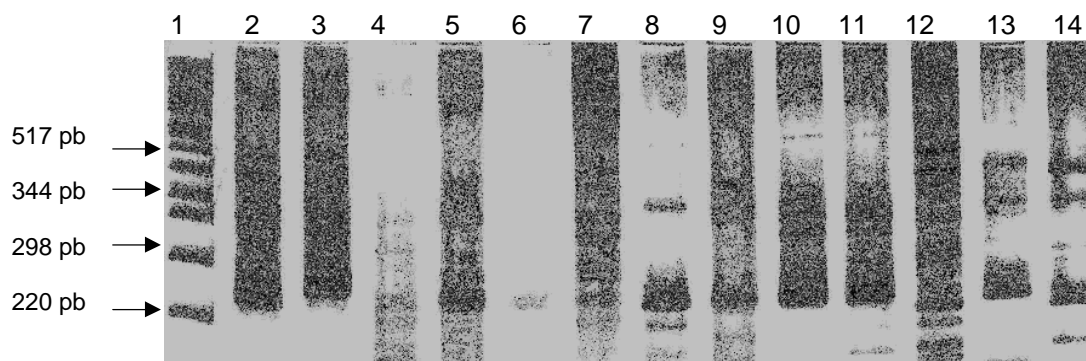
Do total de 127 amostras de DNA, 44 apresentaram amplificação do DNA de *Plasmodium*, perfazendo, assim uma ocorrência de 34,6%.

O gênero *Plasmodium* teve maior índice de positividade em aves das espécies *Amazona aestiva* (27/73) (36,9%), *Amazona amazonica* (3/11) (27,3%) e *Ara ararauna* (5/10) (50%) (Tabela 3). Entretanto, não foi verificada diferença estatística significativa entre as ocorrências de infecção para as diferentes espécies de hospedeiros ($p > 0,05$).

A figura 8 ilustra um gel de poliácridamida 6% no qual estão os resultados obtidos a partir da amplificação de amostras positivas das diferentes áreas estudadas bem como os controles positivos e negativos. A figura 9

ilustra um gel de poliacrilamida 6% no qual estão os resultados obtidos a partir da amplificação de amostras positivas das

diferentes áreas estudadas bem como os controles positivos e negativos.



- 1- Padrão de peso molecular;
 2- Controle positivo (*P. berghei*);
 3- Controle positivo (*P. gallinaceum*);
 4- Controle negativo (sangue de pintinho);
 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 - Amostras positivas;
 6 e 7 - Amostras negativas.

Figura 8: Gel de poliacrilamida 6% mostrando os produtos de amplificação das amostras de DNA por meio da amplificação do gene 18S rRNA de *Plasmodium* spp. por nPCR.

Tabela 3: Ocorrência de *Plasmodium* spp. em psitacídeos através da nPCR. (2005)

Área	Espécie	Nº aves examinadas	Nº aves infectadas	Índice de positividade (%)
FZB-BH	<i>Amazona amazonica</i>	5	1	20
	<i>Amazona festiva</i>	1	0	0
	<i>Amazona rhodocorytha</i>	1	1	100
	<i>Amazona xanthops</i>	2	1	50
	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	2	0	0
	<i>Ara ararauna</i>	10	5	50
	<i>Ara macao</i>	1	0	0
	<i>Deroytyus accipitrinus</i>	1	1	100
	<i>Graydilasculus brachyurus</i>	1	1	100
	<i>Nandayus nenday</i>	5	0	0
	<i>Pionus maximilliani</i>	2	0	0
	<i>Pionus maximilianus</i>	5	1	20
	<i>Pionopsitta pileata</i>	1	0	0
	<i>Propyrrhura auricollis</i>	1	0	0
	<i>Propyrrhura maracana</i>	3	2	66,6
TOTAL		41	13	31,7
VVPE	<i>Amazona aestiva</i>	54	21	38,9
TOTAL		54	21	38,9
Zoo CE	<i>Amazona aestiva</i>	19	6	31,6
	<i>Amazona amazonica</i>	6	2	33
	<i>Amazona farinosa</i>	2	0	0
	<i>Ara chloroptera</i>	1	0	0
	<i>Aratinga cactorum</i>	1	1	100
	<i>Aratinga jandaya</i>	3	1	33
TOTAL		32	10	31,3

5.1.3. OCORRÊNCIA TOTAL OBTIDA PELA CORRELAÇÃO ENTRE EXAME MICROSCÓPICO DE ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS E nPCR

Considerando um total de 127 aves analisadas (41 aves da FZB-BH (1ª coleta), 54 aves do VVPE e 32 aves do Zoo CE), a correlação dos resultados obtidos pelo exame microscópico de esfregaços sanguíneos e pela análise por nPCR revelou uma ocorrência total de 36 % de aves infectadas pelo *Plasmodium* spp. Como mostrado na tabela 5, a ocorrência de plasmódio apresentou ampla variação entre as espécies (0 a 100% de aves infectadas). As espécies de aves com ocorrência relativamente alta de infecção por plasmódios incluem: arara canindé (*Ara ararauna*) com 60% (6/10) de infecção, papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) com 39% (28/73) e papagaios do mangue (*Amazona amazonica*) com 30% (3/10) (Figura 10). Nove espécies (43%) das 21 espécies da família Psittacidae (*Amazona festiva* (n=1), *Ara macao* (n=1), *Nandayus nenday* (n=5), *Pionus maximilliani* (n=2), *Pionopsitta pileata* (n=1), *Propyrrhura auricollis* (n=1), *Amazona farinosa* (n=2), *Ara chloroptera* (n=1), *Anodorhynchus*

hyacinthinus (n=2) não apresentaram parasitismo por *Plasmodium*. A figura 9 mostra os gêneros de psitacídeos infectados por *Plasmodium* spp, detectadas pela análise simultânea por M.O. e PCR em 127 aves pertencentes à três áreas distintas estudadas.

A ocorrência total observada entre as diferentes regiões foi: 34 % para FZB-BH e Zoo CE e 39% para VVPE (Tabela 4) ($p > 0,05$).

Com relação à concordância entre os métodos utilizados, observou-se que houve concordância entre os resultados obtidos pela microscopia óptica e os obtidos pela PCR nos três locais regiões estudados (Coeficiente Kappa= 0,56 (FZB-BH), Coeficiente Kappa= 0,83 (VVPE), Coeficiente Kappa= 0,51 (Zoo CE), $p < 0,05$) (Tabelas 5 a 7).

Da mesma forma, houve concordância entre a microscopia óptica e a PCR quando foram analisados os resultados das 127 aves estudadas (Coeficiente Kappa= 0,71, $p < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 4: Ocorrência total de *Plasmodium* spp entre psitacídeos da FZB-BH, VVPE e Zoo CE, avaliada pela M.O. e PCR.

Área	Espécies examinadas	% Ocorrência (n/+)
FZB-BH	<i>Amazona amazonica</i>	20 (5/1)
	<i>Amazona festiva</i>	0 (1/0)
	<i>Amazona rhodocorytha</i>	100 (1/1)
	<i>Amazona xanthops</i>	50 (2/1)
	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	50 (2/1)
	<i>Ara ararauna</i>	60 (10/6)
	<i>Ara macao</i>	0 (1/0)
	<i>Deropterus accipitrinus</i>	100 (1/1)
	<i>Graydilasculus brachyurus</i>	100 (1/1)
	<i>Nandayus nenday</i>	0 (5/0)
	<i>Pionus maximilliani</i>	0 (2/0)
	<i>Pionus maximilianus</i>	20 (5/1)
	<i>Pionopsitta pileata</i>	0 (1/0)
	<i>Propyrrhura auricollis</i>	0 (1/0)
	<i>Propyrrhura maracana</i>	66,6 (3/2)
	Ocorrência total	34 (41/14)
VVPE	<i>Amazona aestiva</i>	39 (54/21)
	Ocorrência total	39 (54/21)
Zoo CE	<i>Amazona aestiva</i>	36,8 (19/7)
	<i>Amazona amazonica</i>	33,3 (6/2)
	<i>Amazona farinosa</i>	0 (2/0)
	<i>Ara chloroptera</i>	0 (1/0)
	<i>Aratinga aurea</i>	0 (1/0)
	<i>Aratinga cactorum</i>	100 (1/1)
	<i>Aratinga jandaya</i>	33 (3/1)
	Ocorrência total	34 (32/11)

Tabela 5: Números e frequências de amostras positivas e negativas para *Plasmodium* sp., obtidos pela microscopia óptica e PCR em aves da FZB-BH

		Nested PCR		
		Positivo	Negativo	Total
M.O.	Positivo	7 (17%)	1 (2,4%)	8 (19,5%)
	Negativo	6 (14,6%)	27 (65,8%)	33 (80,5%)
	Total	13 (31,7%)	28 (68,3%)	41

Coeficiente Kappa= 0, 56

Tabela 6: Números e frequências de amostras positivas e negativas para *Plasmodium* sp., obtidos pela M.O. e PCR em aves do VVPE

		Nested PCR		
		Positivo	Negativo	Total
M.O.	Positivo	5 (15,6%)	1 (3%)	6 (18,8%)
	Negativo	5 (15,6%)	21 (65,6%)	26 (81,2%)
	Total	10 (31,3%)	22 (68,8%)	32

Coeficiente Kappa= 0, 83

Tabela 7: Números e frequências de amostras positivas e negativas para *Plasmodium* sp., obtidos pela M.O. e PCR em aves do Zoo CE

		Nested PCR		
		Positivo	Negativo	Total
M.O.	Positivo	17 (31,5%)	0	17 (31,5%)
	Negativo	4 (7,4%)	33 (61%)	37 (68,5%)
	Total	21 (38,9%)	33 (61%)	54

Coeficiente Kappa= 0, 51

Tabela 8: Números e frequências totais de amostras positivas e negativas para *Plasmodium* sp., obtidos pela M.O. e PCR para 127 aves analisadas .

		Nested PCR		
		Positivo	Negativo	Total
M.O.	Positivo	29 (22,8%)	2 (1,6%)	31 (24,4%)
	Negativo	15 (11,8%)	81 (63,8%)	96 (75,6%)
	Total	44 (34,6%)	83 (65,4%)	127

Coeficiente Kappa= 0, 71

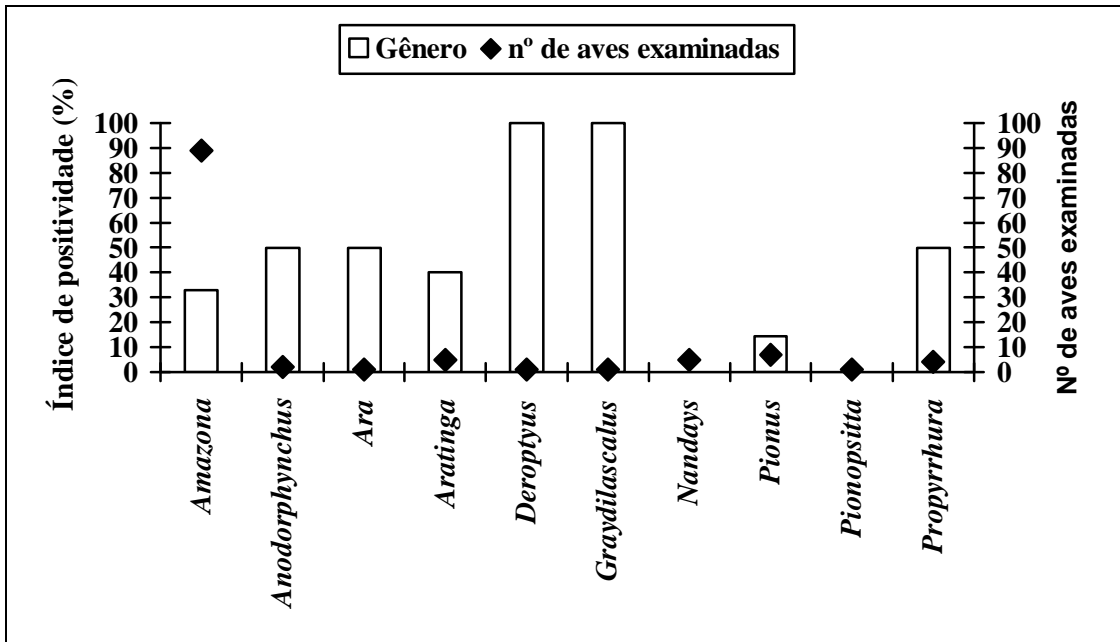


Figura 9: Índice de Positividade dos gêneros de aves infectadas por *Plasmodium* sp., detectadas pela análise simultânea por M.O. e PCR em 127 aves pertencentes à três áreas distintas estudadas

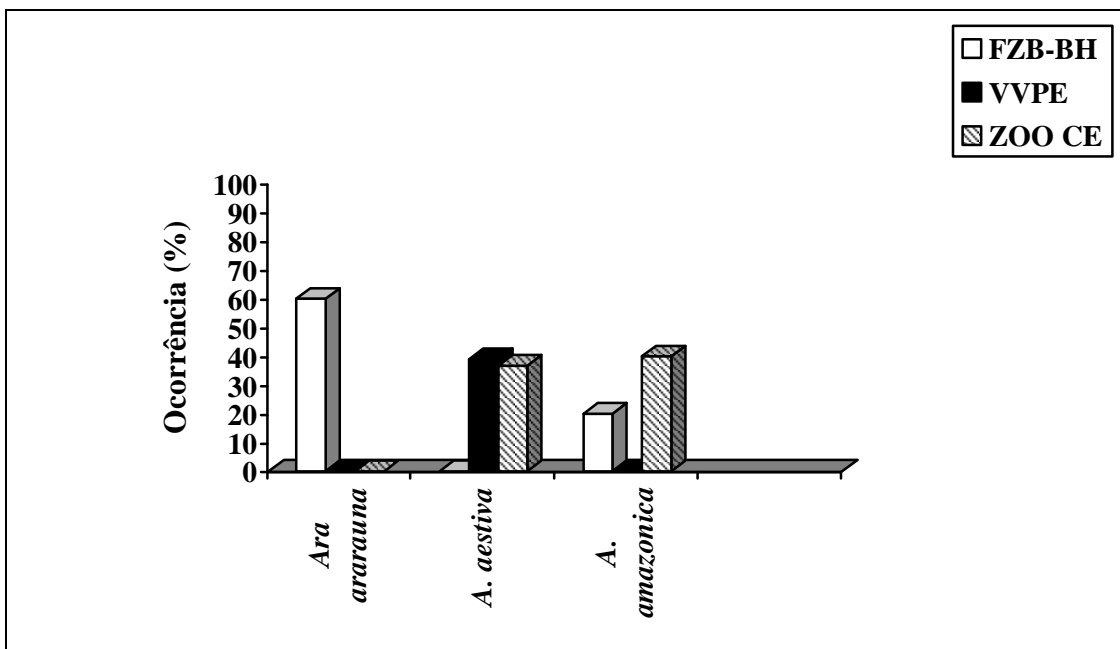


Figura 10: Ocorrência total de *Plasmodium* sp. detectadas pela análise simultânea por M.O. e PCR de acordo com as três áreas distintas estudadas.

5.1.4. VARIACÃO SAZONAL NA OCORRÊNCIA DE *PLASMODIUM* spp

Para verificação do possível efeito da sazonalidade na determinação da infecção por plasmódios avaliaram-se amostras coletadas na FZB-BH em dois períodos distintos, entre os meses de agosto e setembro que corresponde à estação da seca (1ª coleta), e entre os meses de janeiro e fevereiro que corresponde à estação da chuva (2ª coleta).

Na primeira coleta, 41 aves foram analisadas, na segunda coleta foram 39 aves, devido a dois óbitos ocorridos no

período entre as duas coletas. Assim, foram consideradas 39 aves para a análise da ocorrência em ambos os períodos.

Considerou-se como ocorrência de infecção a positividade verificada por análise microscópica de esfregaços sanguíneos e por PCR. Desta forma, a ocorrência de infecção por *Plasmodium* na estação da seca foi de 34% e na estação da chuva de 35,9%, conforme demonstrado na figura 11, não havendo diferenças estatísticas entre as ocorrências para as duas estações ($p > 0,05$).

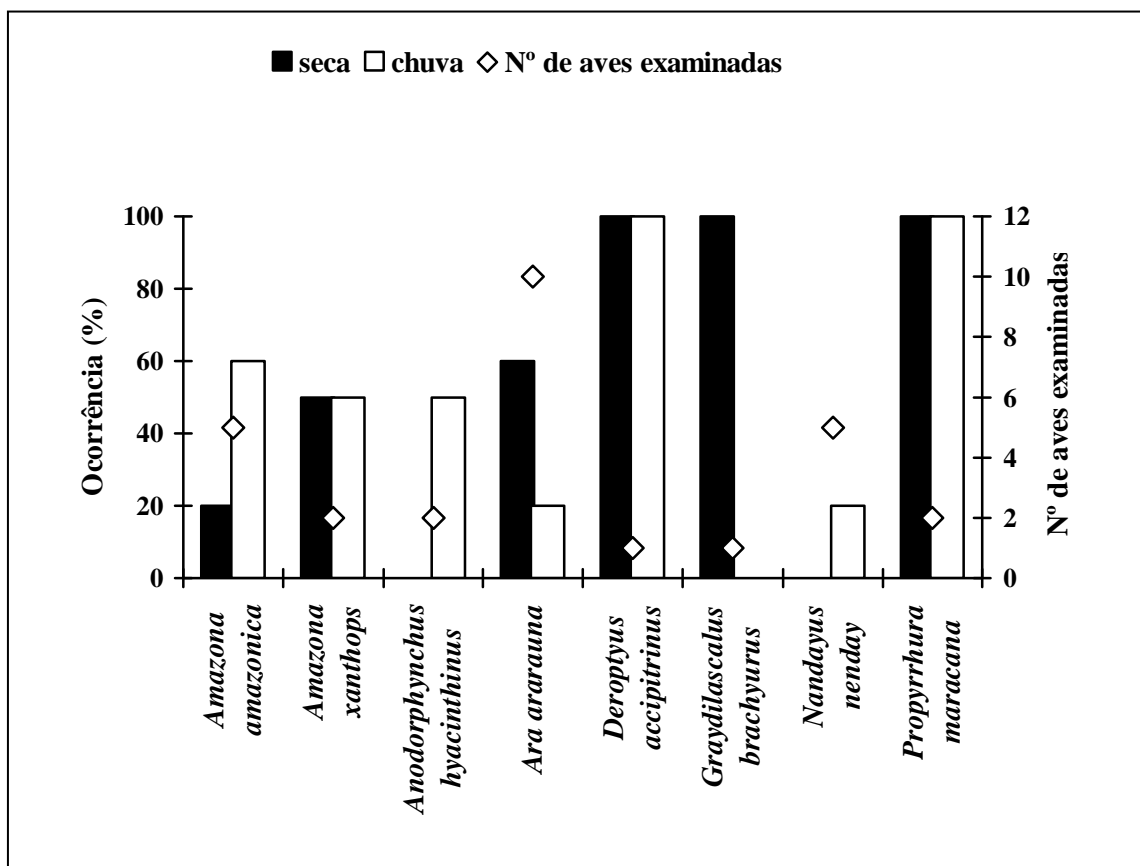


Figura 11: Variação sazonal na ocorrência de *Plasmodium* sp. em psitacédeos da FZB-BH.

5.2. ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

A análise da seqüência parcial do 18SSU rRNA de *P. gallinaceum*, *P. lophurae*, *P. cathemerium*, *P. juxtannucleare*, *P. falciparum* com as espécies desconhecidas de *Plasmodium* encontradas neste estudo e sua relação filogenética estão apresentadas na figura 12. Espécies de malária

detectadas neste estudo e sua relação filogenética apontam para a presença de quatro possíveis linhagens ou espécies diferentes de *Plasmodium*.

Observa-se que uma linhagem (ZOOBH1) parece estar relacionada filogeneticamente ao *P. falciparum*

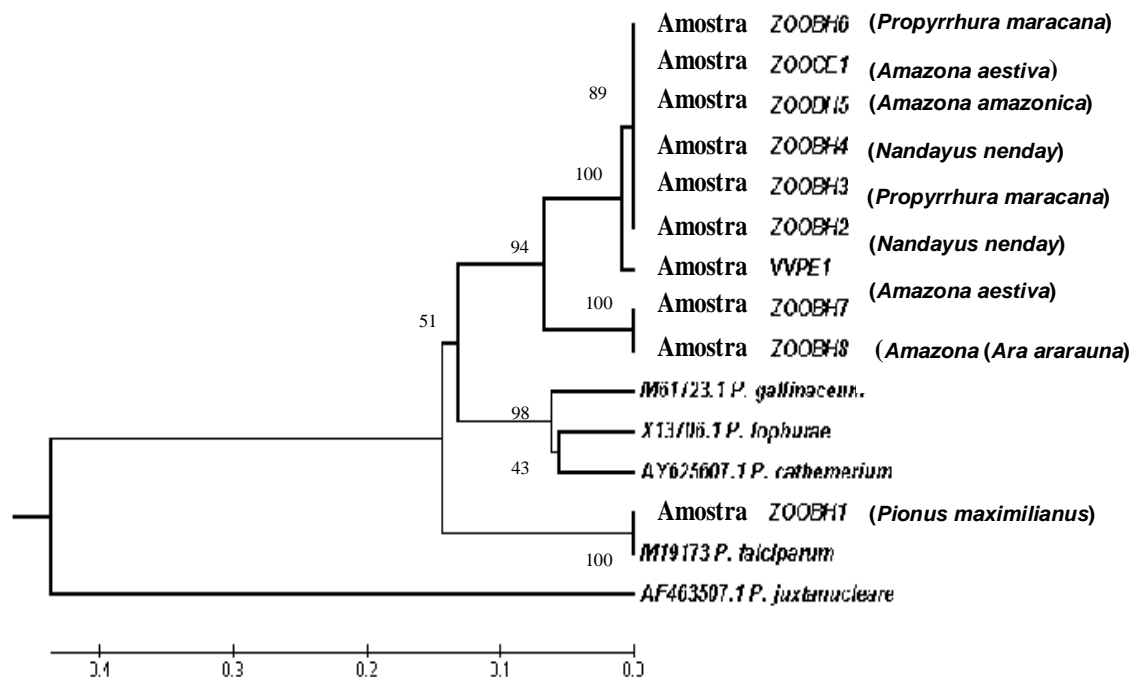


Figura 12: Dendrograma relacionando a seqüência parcial do SSU rRNA e as seqüências obtidas das amostras de psitacídeos infectados por malária com as seqüências de plasmódios conhecidos. *Plasmodium falciparum* foi incluído para comparação da malária aviária com a malária de mamíferos

6. DISCUSSÃO

Atualmente os animais de estimação têm um papel fundamental na vida de milhões de pessoas em todo o mundo. Pesquisas recentes mostram que a convivência com animais de estimação desempenha uma importante função terapêutica, reduzindo o estresse e melhorando as condições psicológicas das pessoas. Realmente, animais têm sido cada vez mais usados para tratamento de deficientes físicos e mentais. Assim como o cão e o gato, a participação das aves no mercado *pet* vem

crescendo cada vez mais. O mesmo fascínio que os animais, especialmente as aves nos causam, pode também desencadear um sério problema aos mesmos (Machado, 2006).

O comércio legal e ilegal de animais é o terceiro mercado mais lucrativo do mundo, atrás apenas do de drogas e armas. Para impedir o crescimento do tráfico ilegal, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) publicou as portarias 117 e 118 que

regulam a criação e comercialização de animais da fauna brasileira no país.

A legalização da criação e do comércio de aves silvestres permitiu que as técnicas de criação de aves silvestres em cativeiro fossem aprimoradas e, conseqüentemente, ficou muito mais seguro obter aves em melhores condições de saúde, evitando que essas sirvam de reservatório de infecções e parasitos do sangue para outras espécies mais vulneráveis (Ziman et al., 2004). Entretanto, devem-se considerar de grande importância as aves de vida livre que são facilmente capturadas por estarem debilitadas, devido a injúrias ou doenças e que são destinadas aos zoológicos para tratamento. Aves capturadas por traficantes de animais quando apreendidas pelo IBAMA estão geralmente muito debilitadas e são destinadas aos zoológicos ou a criatórios. Existem ainda aquelas que são reintroduzidas em ambientes naturais diferentes de sua origem. Estas aves podem introduzir novos patógenos em ambientes livres, seja ele de cativeiro ou natural.

Neste trabalho, a infecção por *Plasmodium* sp. em psitacídeos de cativeiro foi correlacionada com as condições do cativeiro, observando as instalações, sanidade e manejo efetuada em cada localidade, além da influência sazonal em uma região.

Foi encontrada uma alta ocorrência de *Plasmodium* (36%) entre psitacídeos mantidos em condições de cativeiro nas duas regiões no Brasil estudadas (estado de Minas Gerais e estado do Ceará). A alta sensibilidade do método molecular (PCR) utilizado no estudo para a detecção do parasito possibilitou observar uma alta ocorrência de infecção por *Plasmodium*. De fato, este estudo demonstrou um índice de positividade de 34,6% em aves de cativeiro através da PCR, sugerindo que o parasito causador da malária está provavelmente mais prevalente no ambiente de cativeiro do que já previamente descrito (Schrenzel et al., 2003).

Neste estudo, a ocorrência do parasito não variou regionalmente indicando que as aves

estão submetidas a condições semelhantes de cativeiro, sendo expostas aos potenciais vetores independentemente de seu local de origem. De fato, todas as aves são submetidas aos mesmos procedimentos de manejo que incluem alimentação, higienização dos recintos e sanidade animal. Um ponto importante é que, de maneira geral, os recintos apresentam condições que facilitam a exposição das aves de cativeiro aos possíveis vetores de malária, como a presença de lagoas e recintos contendo grande quantidade de água parada próxima aos recintos onde estas aves permanecem. Além disso, a construção dos recintos com grades metálicas permite a passagem dos mosquitos tendo assim acesso às aves.

Espécies de *Haemoproteus* e *Leucocytozoon* tem sido encontrada em várias espécies de aves na região dos trópicos (Valkiunas, 1997). Entretanto, estes hemoparasitos não foram detectados pela microscopia entre as aves das duas regiões. Apesar de não ter sido determinada a ocorrência de possíveis vetores (Simuliidae e Ceratopogonidae) destes hemoparasitos, acredita-se que tais vetores apresentem-se raros nestes criadouros explicando assim a ausência de infecção por estes parasitos. Em contrapartida, mosquitos (Culicidae), vetores primários do *Plasmodium* spp., são comuns nas regiões dos trópicos (Valkiunas, 1997) e principalmente no Brasil (Consoli et al., 1994); este fato pode explicar a alta ocorrência de plasmódio detectado neste trabalho.

O interesse pelos parasitos do sangue de aves tem crescido rapidamente nos últimos anos. Este aumento se deve às pesquisas recentes que vêm contrapondo um fato já tradicional que destaca os hemoparasitos de aves como agentes de pouca importância ou não patogênicos. Estas pesquisas revelam que os parasitos do sangue podem causar importantes alterações nas aves infectadas (Deviche et al., 2001; Bennett et al., 1993). Além disso, estudos sobre os hemoparasitos de aves podem ser relevantes no aspecto da sua conservação (Dobson e May, 1986).

Os resultados deste trabalho apresentaram concordância com estudos anteriores (Bensch et al., 2000; Waldenstrom et al., 2002) sugerindo que a ocorrência de infecção encontrada nas espécies de aves foi alta suficiente para justificar mudanças nas práticas de manejo das aves em cativeiro e das aves destinadas a reintrodução quando se conhece o portador de malária em uma criação. Além disso, malária aviária coloca em risco imediato ou em longo prazo os animais em cativeiro o que justifica o estudo epidemiológico molecular, aumentando o monitoramento, a eliminação de vetores potenciais e mudanças de algumas práticas de manejo para proteger os animais. A doença causada por parasitos do sangue deve ser inspecionada no período de quarentena. Se espécies de aves nativas forem expostas pela primeira vez a algum parasito do sangue importado, perdas catastróficas podem ocorrer entre elas (Murata et al., 2004). É necessário reconhecer os hemoparasitos como importantes agentes etiológicos e dar mais atenção às infecções transmitidas por aves importadas para cativeiro, aves comercializadas e aves destinadas a reintrodução.

A microscopia óptica de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa é considerada padrão-ouro para o diagnóstico de parasitos do sangue (Seghal et al., 2005).

A avaliação dos esfregaços sanguíneos neste estudo demonstrou uma ocorrência de 24,4% de aves infectadas pelo parasito, compreendendo oito gêneros e nove espécies. A alta frequência observada pode ser reflexo do re-exame dos esfregaços sanguíneos ocorrida após a positividade observada pela PCR. Os esfregaços correspondentes às amostras positivas pela PCR foram exaustivamente examinados para confirmar a presença do parasito. Com amostras apresentando parasitemias muito baixas (1 a 7 parasitos em média), foi necessário examinar todo o esfregaço sanguíneo para se detectar plasmódios nas amostras analisadas.

Além de parasitemias muito baixas, a presença de uma única forma evolutiva (trofozoíto) não permitiu a identificação de subgêneros ou espécies de *Plasmodium* pela análise morfológica.

Pela microscopia óptica, a ocorrência observada neste trabalho foi maior do que a encontrada por Matta et al. (2004), que estudaram a ocorrência de hemoparasitos em aves silvestres da ordem dos passeriformes de três regiões diferentes da Colômbia encontrando um parasitismo baixo por *Plasmodium* equivalente a 2% apenas. Um outro estudo que relata baixo índice de parasitismo foi o trabalho realizado por Valkiunas et al. (2004) que avaliaram a ocorrência de *Plasmodium* em aves silvestres pertencentes a uma área de conservação em Porto Rico onde apenas duas aves das famílias Virionidae e Thrapidae apresentaram infecção por plasmódio de um total de 354 aves examinadas compreendendo 141 espécies, 35 famílias e 5 ordens, relatando assim uma ocorrência de 0,6% de aves parasitadas.

Seghal et al. (2005) examinaram 969 aves (121 espécies e 21 famílias), por um período de 12 anos, relatando a ocorrência de 10,7% de aves parasitadas por *Plasmodium*. Murata et al. (2002) também estudaram por um longo período (13 anos), utilizando a microscopia óptica como método de diagnóstico, a presença de hemoparasitos em 701 aves no Japão relatando uma ocorrência de 1,7% de aves parasitadas por *Plasmodium*. Neste trabalho é enfatizado que as aves parasitadas eram aquelas que ocasionalmente formavam colônias nos arredores de um zoológico e assim poderiam ser um problema para as aves de cativeiro, já que existem espécies de *Plasmodium* patogênicas que constituem agentes de mortalidade para algumas espécies de aves mais sensíveis presentes em cativeiro.

Observa-se, no entanto, que todos estes estudos foram realizados a partir do exame de amostras obtidas de aves silvestres pertencentes a várias famílias, porém, nenhum abrange especificamente a família Psittacidae. Este trabalho é o primeiro a

estudar a ocorrência de *Plasmodium* em espécies da família Psittacidae no Brasil.

O estudo realizado por Richner et al. (1995) demonstrou uma ocorrência semelhante a aqui observada. Através da análise de uma única espécie de ave (*Parus major*) na Suíça, foi encontrada uma ocorrência de 35% de aves infectadas por *Plasmodium* através da observação microscópica de esfregaços sanguíneos.

O uso da microscopia para o diagnóstico de infecções crônicas com baixo nível de parasitemia pode seriamente subestimar a ocorrência do parasito (Jarvi et al., 2002). Contudo, através da análise conjunta da microscopia com métodos moleculares, (24,4% e 34,6% de positividade, respectivamente) como demonstrado neste trabalho, é possível obter maior sensibilidade a partir de uma análise mais apurada de todo o esfregaço.

A análise molecular através do uso da PCR como método de diagnóstico, permite o processamento de grandes quantidades de amostras por dia, tornando o método bastante adequado para estudos epidemiológicos (Barker Jr. et al., 1992).

Os iniciadores utilizados neste estudo têm como alvo a subunidade menor do rRNA do parasito (18SSU rRNA). Os produtos desse gene são essenciais para a sobrevivência do parasito. Os genes ribossomais possuem regiões de seqüências conservadas e variáveis que permitem a identificação precisa das células representantes de diferentes estágios de vida do patógeno, como os merozoítos e esporozoítos, que expressam genes ribossomais com diferentes seqüências de DNA (Gunderson et al., 1987).

Estudos recentes têm sugerido que a análise molecular por PCR melhora significativamente a detectabilidade de infecções crônicas por malária sobre os esfregaços sanguíneos por mais de 67% em hospedeiros aviários (Feldman et al., 1995) e 7% em répteis (Perkins et al., 1998).

No presente trabalho, a ocorrência detectada pela *nested* PCR foi de 34,6%, semelhante ao resultado do estudo realizado por Ribeiro et al. (2005) que executaram o mesmo protocolo detectando uma ocorrência de 34,3% de aves infectadas por plasmódio.

Apenas duas amostras positivas pela microscopia óptica não foram amplificadas pela PCR. O mesmo não ocorreu com estudo realizado por Ribeiro et al. (2005) que observaram um grande número de amostras positivas pela microscopia, mas negativas pela PCR. Este fato pode ser explicado pela falta de qualidade das amostras de DNA que foram obtidas a partir de esfregaços sanguíneos, diferente do presente trabalho cuja extração foi realizada a partir do sangue total das aves, ou seja, com menos riscos de possuir componentes inibitórios residuais nas amostras.

Valkiunas e Pierce, (2000) relataram uma extrema sensibilidade da *nested* rRNA PCR para a detecção de infecções crônicas com baixo nível de parasitemia, e propõem uma combinação de técnicas de diagnóstico para a identificação da infecção por *Plasmodium*. Sugerem que se inclua o esfregaço sanguíneo para verificar a identidade e a intensidade de infecção e uma *nested* PCR para a detecção de infecções com baixa parasitemia.

Beadell et al. (2004) estudaram a ocorrência de hemoparasitos através do uso de PCR em dois países. Na Papua Nova Guiné, 20 das 428 aves examinadas apresentaram o parasito correspondendo a uma ocorrência de 4,6% de aves infectadas. Ocorrência semelhante foi encontrada na Austrália onde foram examinadas 219 aves com 30 aves infectadas por *Plasmodium*, ou seja, 18,7% das aves. Eles relataram que não houve diferença estatística de ocorrência entre as famílias das aves.

Ribeiro et al. (2005) identificaram fragmentos específicos, amplificados a partir de amostras de sangue de aves, que variaram de aproximadamente 210 a 300pb, dado semelhante ao obtido neste estudo. Esta variação do tamanho dos produtos da

PCR se deve a presença de polimorfismos de DNA das amostras, que foram evidenciados a partir do seqüenciamento dos produtos da PCR como descrito a seguir.

O seqüenciamento do gene estrutural 18SSU rRNA dos isolados obtidos de algumas aves infectadas aponta para a possível existência de distintas espécies de *Plasmodium* entre as diferentes espécies hospedeiras investigadas. Um fato interessante é que um dos isolados apresentou-se filogeneticamente relacionado ao *P. falciparum*. Este resultado é semelhante a outros estudos que utilizaram a análise de seqüências de SSU rRNA (Waters et al., 1991).

Waters et al. (1991), compararam as seqüências de SSU rRNA de nove espécies de *Plasmodium*, determinando que os parasitos de aves formam um grupo filogenético com o *P. falciparum*. Os autores afirmaram que a origem destas espécies pode ter surgido por um evento similar de transferência lateral. Relatando que a capacidade dos esporozoítos de espécies de *Plasmodium* aviário de invadir uma variedade de tecidos pode possibilitar que o parasito efetue igualmente a transferência lateral. Os autores concluíram que a transferência lateral do *P. lophurae* para camundongo tem sido estabelecida em laboratório, demonstrando sua habilidade para invadir eritrócitos de várias espécies de mamíferos.

McCutchan et al. (1996) realizaram uma comparação filogenética utilizando a seqüência do gene TRAP de seis espécies diferentes de *Plasmodium* e demonstraram uma topologia similar e que indica uma relação filogenética entre *P. gallinaceum* e *P. falciparum*. Afirmaram que o *P. falciparum* está mais próximo dos plasmódios aviários do que dos parasitos humanos, mas não sugeriram que *P. falciparum* tenha originado diretamente do *P. gallinaceum*, mas que eles têm um ancestral em comum e assim pode-se observar uma similaridade que representa a conservação de um fator ancestral do parasito aviário e do *P. falciparum*.

Estudos sobre a diversidade genética têm sido conduzidos com a finalidade de estabelecer a susceptibilidade das espécies aviárias às infecções por *Plasmodium* através da definição do polimorfismo genético dos hospedeiros, da relação genética do hospedeiro com a resistência à doença e a avaliação dos efeitos produzidos pelo parasito na seleção dos genes dos hospedeiros (Jarvi et al., 2004)

Doenças infecciosas como a malária aviária é de grande importância, pois podem causar rápido declínio de populações, extinções e diminuição da biodiversidade. O estudo da filogenia das espécies de *Plasmodium* é essencial para se evitar casos de infecção por malária aguda e assim diminuir índices de mortalidade como descrito anteriormente. Por exemplo, a identificação correta da linhagem dos patógenos pode providenciar um regime de tratamento básico, já que o uso de drogas como sulfocloropirazina são efetivas no tratamento contra *P. juxtannucleare* (Atkinson et al., 2001). São necessários mais estudos que envolvam a filogenia dos plasmódios nas várias espécies de aves silvestres para permitir melhores medidas de prevenção, controle e tratamento em decorrência de introduções de novas espécies de *Plasmodium* em ambientes naturais. Tais estudos teriam forte implicação na conservação e no manejo das aves silvestres de vida livre ou mantida em cativeiro.

Com relação ao tipo de dieta não foi observada associação com a infecção por plasmódio. Isso se deve ao fato que todos os psitacídeos das três diferentes regiões se alimentam de ração industrializada e frutas com manejo nutricional adequado. Existem trabalhos que demonstram a associação do parasitismo por plasmódio e a dieta das aves. Ribeiro et al. (2005) relatam uma maior freqüência de *Plasmodium* em espécies de aves insetívoras, sugerindo que a destruição dos insetos durante a alimentação expõe com maior facilidade os esporozoítos, que penetram nas mucosas das aves.

A não observação de sinais clínicos em contraste com a alta taxa de infecção por *Plasmodium* sugere que as aves estejam em estado crônico de infecção, apresentando assim certo grau de imunidade.

A ocorrência do parasito, neste estudo, não variou sazonalmente contrastando com outros estudos documentados na literatura. Estes estudos relataram um aumento da infecção durante a estação da chuva (Garnham, 1960). A variação temporal da ocorrência do *Plasmodium* é mais pronunciada na fauna das regiões temperadas do que nas regiões de zona tropical (Fallon et al., 2003). Assim, a relativa estabilidade do meio ambiente tropical pode explicar a falta de variação sazonal da ocorrência do parasito.

Um importante ponto a ser mencionado é o fato de aves mantidas em cativeiro serem frequentemente exportadas para outras localidades podendo ser considerado um fator de risco na disseminação de doenças entre aves não infectadas. Além disso, a introdução de aves infectadas em zoológicos pode colocar em risco a saúde de aves mantidas em cativeiro. A infecção por *Plasmodium* pode ter um forte impacto negativo no hospedeiro, especialmente quando uma espécie de ave é exposta ao parasito pela primeira vez (van Riper III et al., 1986) ou mesmo quando a ave é exposta a espécies de plasmódio que não são encontradas em seu ambiente natural, impedindo que a ave se torne refratária à espécie exótica introduzida e assim casos de infecção aguda de malária podem ocorrer. Por exemplo, pingüins *African black-footed* morreram após infecção com *Plasmodium elongatum*, *Plasmodium relictum*, e um *Plasmodium* sp. desconhecido que provavelmente veio abrigado de outra espécie de ave (Graczyk et al., 1994b). No Havaí, a introdução de um novo *Plasmodium* spp. que foi contraído por aves nativas as levou a extinção (Atkinson et al., 2000; Bensch et al., 2000). Isto implica que as aves mantidas em cativeiro podem servir como reservatório para parasitos do sangue como previamente foi sugerido (Waldenstrom et al., 2002). Este

fato é extremamente importante se considerarmos que a maioria das aves encontra-se assintomática e sem alterações comportamentais.

No Brasil, pouca atenção tem sido dada a infecções com parasitos sanguíneos em zoológicos e criatórios comerciais. É necessário reconhecer os hemoparasitas como importantes agentes etiológicos e dar mais atenção às infecções transmitidas por aves importadas para cativeiro, aves comercializadas e aves destinadas a reintrodução

7. CONCLUSÕES

Nas condições utilizadas no presente estudo foi possível concluir que:

- Aves da família Psittacidae mantidas em cativeiro apresentam alto índice de parasitismo por *Plasmodium* spp.
- A associação da microscopia óptica e a PCR garante maior precisão na detecção de infecções por *Plasmodium*.
- Diferentes espécies de *Plasmodium* podem circular entre aves mantidas em cativeiro.
- A sazonalidade não parece ser um fator importante para a determinação do parasitismo por plasmódio em aves mantidas em condições de cativeiro.
- Não há relação entre as características biológicas das aves mantidas em cativeiro e a ocorrência de *Plasmodium*.
- A espécie *Amazona aestiva* apresentou maior índice de parasitismo por *Plasmodium*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R. M.; MAY R. M. Population biology of infectious diseases. *Part I. Nature*, v. 280, p. 361-367, 1979.

- ADRIANO, A. E.; CORDEIRO, N. S. Prevalence and intensity of *Haemoproteus columbae* in three species of wild doves from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 175-178, 2001.
- ATKINSON, C. T.; VAN RIPER III, C. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leukocytozoon*, and *Haemoproteus*. In: Loye J.E. and Zuk M. (Eds.) *Blood-parasite interactions: Ecology, evolution, and behaviour*, Oxford University Press, Oxford, U.K., 1991, p. 19-47.
- ATKINSON, K. L.; WOODS, R. J.; DUSEK, L. S. et al. Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected liwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitol.*, v. 111, p. 59-69, 1995.
- ATKINSON, C. T.; DUSEK, R. J.; WOODS, K.L. et al. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *J. Wildl. Dis.*, v. 36, n. 2, p. 197-204, 2000.
- BAKER, J. R. Biology of the trypanosomes of birds. In: Lumsden W.H.R. and Evans D.A. *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, New York, 1976, p. 131-174.
- BARKER, Jr. R. H.; BANCHONGAKSORN, T.; COURVAL, J. M. et al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood sample using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trp. Med. Hyg.*, v. 46, p. 416-426, 1992.
- BEADELL, J.; GERING, E.; AUSTIN, J. et al. Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. *Mol. Ecol.*, v. 13, p. 3829-3844, 2004.
- BENNETT, G. F.; BORRERO, H. J. I. Blood parasite of some birds from Colombia. *J. Wildl. Dis.*, v. 12, p. 454-458, 1976.
- BENNETT, G. F.; SOUZA, O. Blood parasites of some birds from São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 75, p. 117-134, 1980.
- BENNETT, G. F.; WHITEWAY, M. A.; WOODWORTH-LYNAS, C. B. Host-parasite catalogue of the avian haematozoa. Memorial University of Newfoundland. *Occasional Papers in biology*, v. 5, p.243, 1982.
- BENNETT, G. F.; EARLE, R. A.; PIERCE, M. A. et al. Avian Leucocytozoidae: the leucocytozoids of the Phasianidae sensu lato. *J. Nat. Hist.*, v. 25, p. 1407-1428, 1991.
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D. et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, v. 267, p. 1583-1589, 2000.
- CASTLE, M. D.; CHRITENSEN, B. M. Hematozoa of wild turkeys from the midwestern United States. Translocation of wild turkey and its potential role in the introduction of *Plasmodium kempfi*. *J. Wildl. Dis.*, v. 26, p. 180-185, 1990.
- CONSOLI, R. A.; LOURENÇO, R. O. Classificação e principais espécies de importância sanitária. In: Consoli, R. A.; Lourenço-de-Oliveira, R. (Eds). *Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil*, Rio de Janeiro, Fiocruz: 1994, p. 17-92.
- CUBAS, Z. S. Natural diseases of free-ranging birds in South America. In: Fowler, M. E. (Ed.): *Zoo Wild Animal Med.*, 3 ed. Philadelphia: P.A., W.B. Saunders Co., 1992, p. 169-172.
- DEVICHE, P.; GREINER, E. C.; MANTECA, X. Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes). *J. Exp. Zool.*, v. 289, n. 1, p. 456-466, 2001.
- DOBSON, A. P.; MAY, R. M. Disease and Conservation. In: *Conservation Biology: the science of scarcity and diversity*. Massachusetts: 1986, p. 345-365.

- FALLON, S. M.; BERMINGHAM, E.; RICKLEFS, R. E. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. *Evolution.*, v.57, p. 606–615, 2003.
- FELDMAN, R. A.; FREED, L. A.; CANN, R. L. A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Mol. Ecol.*, v. 4, p. 663-673, 1995.
- GARNHAM, P. C. (Ed.). Malaria parasites and other Haemosporidia. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*, 1960, 1.114pp.
- GARVIN, M. C.; REMSEN, J. V.; BISHOP, M. A. et al. Hematozoa from passeriform birds in Louisiana. *J. Parasitol.*, v. 79, p. 318-321, 1993.
- GODFREY Jr, R. D.; FEDYNICH, A. M.; PENCE, D. B. Quantification of hematozoa in blood smears. *J. Wildl. Dis.*, v. 23, p. 558-565, 1987.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; MCCUTCHAN, T.F. et al. Characteristics of naturally acquired avian malaria infections in naive juvenile African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol. Res.*, v. 80, p. 634–637, 1994a.
- GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; SHAW, M.L.; et al. Maternal antibodies against *Plasmodium* spp. in African black-footed penguin (*Spheniscus demersus*) chicks. *J. Wildl. Dis.*, v. 30, p. 365-371, 1994b.
- GREINER, E. C.; BENNETT, G. F.; WHITE, E. F. et al. Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can. J. Zool.*, v. 53, p. 1762-1787, 1975.
- GRIM, C.K.; MERWE, V.E.; SULLIVAN, M. et al. *Plasmodium juxtannucleare* associated with mortality in black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) admitted to a rehabilitation center. *J. Zoo Wildl Med.*, v. 34, p. 250–255, 2003.
- GUNDERSON, J. H.; SOGIN, M. L.; WOLLETT, G. et al. Structurally distinct stage specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science*, v. 238, p. 933-937, 1987.
- GUTIERREZ, R. J. Hematozoa from the spotted owl. *J. Wildl. Dis.*, v. 25, p. 614-618, 1989.
- JARVI, S. L.; SCHULTZ, J. J.; ATKINSON, C. T. PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *J. Parasitol.*, v. 88, p. 153-158, 2002.
- JARVI, S. I.; TARR, C. L.; MCINTOSH, C. E. et al. Natural selection of the major histocompatibility complex (*MHC*) in Hawaiian honeycreepers (Drepanidinae). *Mol. Ecol.*, v. 13, p. 2157-2168, 2004.
- JULIAN, R. J.; GALT, D. E. Mortality In Muscovy Ducks (*Cairina moschata*) caused by *Haemoproteus* infection. *J. Wildl. Dis.*, v. 16, p. 39-44, 1980.
- HAMILTON, W. D.; ZUK, M. Heritable true fitness and bright birds. A role for parasites? *Science.*, v. 218, p. 384-387, 1982.
- HENNING, L.; FELGER, I.; BECK, H. P. Rapid DNA extraction for molecular epidemiological studies of malaria. *Acta Tropica*, v. 72, p. 149-155, 1999.
- HOLMSTAD, P. R.; ANWAR, A.; LEZHOVA, T. et al. Standard sampling techniques underestimate prevalence of avian hematozoa in Willow Ptarmigan (*Lagopus lagopus*). *J. Wildl. Dis.*, v. 39, n.2, p. 354-58, 2003.
- HOPINKS, B. A.; SKEELES, J. K.; HOUGHTEN, G. E. et al. A survey of infectious diseases in wild turkeys (*Meleagris gallopavo silvestris*) from Arkansas. *J. Wildl. Dis.*, v. 26, p. 468-472, 1990.

- KIRKPATRICK, M.; RYAN, M. J. The evolution of mating preferences and the paradox of the lek. *Nature*, v. 350, p. 33-38, 1991.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J.; HUMPHREY, P. S. Preliminary survey of blood-parasites of birds of the area de pesquisas ecologicas do Guamá, Belém, Pará, Brasil. *J. Parasitol.*, v. 56, p. 197-198, 1970.
- LEE, K. A.; MARTIN II, L. B.; HASSELQUIST, D. et al. Contrasting adaptive immune defenses and blood parasite prevalence in closely related Passer sparrows. *Oecologia*, p. 537- 46, 2006.
- LUCENA, D. T. Malaria aviária: Subsídios para sua sistemática e transmissão. Tese, Jornal do Commercio, Recife, 1939, 126 p.
- MACHADO, P. A. R. Disponível em: <www.animalworld.com.br> . Acesso em: 26 de outubro de 2006.
- MARZAL, A.; LOPE, F.; NAVARRO, C. et al. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia*, v. 142, p. 541–545, 2004.
- MATTA, N. E.; BASTO, N.; GUTIERREZ, R., et al. Prevalence of blood parasites in Tyrannidae (Flycatchers) in the Eastern Plains of Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n.3, p. 271-274, 2004.
- MCCALLUM, H.; DOBSON, A. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Tree.*, v. 10, p. 190-194, 1995.
- MCCUTCHAN, T. F.; KISSINGER, J. C.; TOURAY, M. G. et al. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 93, n. 21, p. 11889–11894, 1996.
- MURATTA, K. Prevalence of blood parasite in Japanese wild birds. *Parasitol.*, v. 64, n. 9, p. 785-790, 2002.
- PARAENSE, W. L. Sobre a evolução dos plasmódios no retículo-endotélio. *Méd. Cirúr. Farmácia*, v. 108, p. 1-26, 1945.
- PERKINS, S. L.; OSGOOD, S. M.; SCHALL, J. J. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria. Implications for epizootiology. *Mol. Ecol.*, v. 7, p. 1587-1590, 1998.
- REULLIER, J.; PÉREZ-TRIS, J.; BENSCH, S. et al. Diversity, distribution and exchange of blood parasites meeting at an avian moving contact zone. *Mol. Ecol.*, v. 15, p. 753-763, 2006.
- RIBEIRO, S. F.; SEBAIO, F.; BRANQUINHO, F. C. S. et al. Avian malaria in Brazilian passerine birds: parasitism detected by nested PCR using DNA from stained blood smears. *Parasitol.*, v. 130, p. 261-267, 2005.
- RICHARD, F. A.; SEHGAL, R. N. M.; JONES, H. I. et al. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *J. Parasitol.*, v. 88, p. 819-822, 2002.
- RICHNER, H.; CHRISTE, P.; OPPLIGER, A. Paternal investment affects prevalence of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p. 1192-1194, 1995.
- RICKLEFS, R. E. Embryonic development period and prevalence of avian blood parasites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v. 89, p. 4722-4725, 1992.
- RICKLEFS, R. E.; FALLON, S. M. Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proc. R. Soc. Lond.*, v. 269, p. 885–892, 2002.
- SANGUINETTI, C. J.; NETO, E. D.; SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, v. 17, p. 915-919, 1994.

- SCHEUERLEIN, A.; RICKLEFS, R. E. Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proc. R. Soc. Lond.*, v. 271, p. 1363–1370, 2004.
- SCHRENZEL, M. D.; MAALOUF, G. A.; KEENER, L. L. et al. Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. *J. Parasitol.*, v. 89, p. 1025-1033, 2003.
- SEBAIO, F. *Hemoparasitos em aves de Mata Atlântica no estado de Minas Gerais*. 2002, 56 f. (mestrado em ecologia) Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais.
- SCHUTLER, D.; ANKNEY, C. D.; MULLIE, A. Effects of the blood parasite *Leucocytozoon simondi* on growth rates of anadid duckling. *Com. J. Zool.*, v. 77, p. 1573-1578, 1995.
- SEGHAL, R. N. M.; JONES, H. I.; SMITH, T. B. Blood parasites of some West African rainforest birds. *Parasitol.*, v. 67, n. 3, p. 295-301, 2005.
- TELFORD, S. R., Jr. Haemoparasites of reptiles. In: HOFF, G. L.; FRYE, F. L.; JACOBSON, E. R. *Diseases of Amphibians and reptiles. Florida: plenum Publishing Corporation.*, 1984, p. 385-517.
- TELFORD, S. R., Jr. A contribution to the systematics of the reptilian malaria parasites, family Plasmodiidae (Apicomplexa: Haemosporina). *Bulletin of the Florida State Museum Biological Sciences.*, v. 34, p. 65-96, 1988.
- VALKIUNAS, G. Bird Haemosporida. *Acta Zoologica Lituonica.*, v. 3, p. 1–607. (In Russian), 1997.
- VALKIUNAS, G.; PIERCE, M. A. The status of *Plasmodium corradettii* Laird, 1998 (Haemosporinda: Plasmodidae): a malaria parasite of birds. *Syst. Parasitol.*, v. 45, p. 141-143, 2000.
- VALKIUNAS, G.; IEZHOVA, T. A.; BROOKS, D. R., et al. Additional observations on blood parasites of birds in Costa Rica. *J. Wildl. Dis.*, v. 40, n.3, p. 555–61, 2004.
- VAN RIPER III,, C.; VAN RIPER, S. G.; GOFF, M. L. et al. The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecol. Monogr.*, v. 56, p. 327–344, 1986.
- VAN RIPER III,, C.; ATKINSON, C. T.; SEED, T. M. Plasmodia of birds. In: Kreier, J. P. (ed.), *Parasitic protozoa* San Diego, CA: *Academic Press*, 1994, p. 73–140.
- WALDENSTROM, J.; BENSCH, S.; KIBOI, S. et al. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol. Ecol.*, v. 11, p. 1545-1554, 2002.
- WATERS, A. P.; HIGGINS, D. G.; McCUTCHAN, T. F. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.88, p. 3140-3144, 1991.
- WOODWORTH-LYNAS, C. B.; CAINES, J. R.; BENNETT, G. F. Prevalence of avian haematozoa in São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 84, p. 515-526, 1989.
- YOUNG, B. E.; GARVIN, M. C.; McDONALD, D. B. Blood parasites in birds from Monteverde, Costa Rica. *J. Wildl. Dis.*, v. 29, p. 555-560, 1993.
- ZIMAN, M.; SCHOUTEN, A. C.; GRIFFEY, S. et al. *Haemoproteus* spp. and *Leucocytozoon* spp. in captive raptor population. *J. Wildl. Dis.*, v. 40, n. 1, p. 137-140, 2004.