

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO MOLECULAR DA *Chlamydophila psittaci* EM
COLUMBIFORMES E GALLIFORMES DA REGIÃO CENTRO SUL
DO ESTADO DE GOIÁS**

Lídia Lopes Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

GOIÂNIA
2014



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Lídia Lopes Ferreira** E-mail: **lopesvet2@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: Detecção molecular de *Chlamydophila psittaci* em Columbiformes e Galliformes da Região Centro Sul do Estado de Goiás Palavras-chave: **Aves domésticas, clamidiose, frango de corte, galinhas caipiras, perus**

Título em outra língua: **Molecular Detection of *Chlamydophila psittaci* in Columbiformes and Galliformes Region Central South State Of Goiás**

Palavras-chave em outra língua: **Poultry, chlamydiosis, broilers, free-range chickens, turkeys**

Área de concentração: **Sanidade Animal e Tecnologia de Alimentos** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **02/09/2014**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Marcos Barcellos Café** E-mail: **mcafe@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **Nadja Mongyca Leandro** E-mail: **mogyca@vet.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 10 de dezembro de 2014

Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

LIDIA LOPES FERREIRA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Chlamydophila psittaci* EM
COLUMBIFORMES E GALLIFORMES DA REGIÃO CENTRO SUL
DO ESTADO DE GOIÁS**

Tese apresentada para a obtenção
do grau de Doutor em Ciência
Animal junto a Escola de Veterinária
e Zootecnia da Universidade Federal
de Goiás.

Área de concentração:

Sanidade Animal Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Barcellos Café

Comitê de orientação:

Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

Prof. Dra. Nadja Susana Mogyca Leandro

GOIÂNIA
2014

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

Ferreira, Lídia Lopes

Detecção molecular de *Chlamydophila psittaci* em Columbiformes e Galliformes da região centro sul do estado de Goiás [manuscrito] / Lídia Lopes Ferreira. - 2014.
xi, 45 f.

Orientador: Prof. Marcos Barcellos Café.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2014.

Bibliografia.

1. Aves domésticas. 2. Clamidiose. 3. Frango de corte. 4. Galinhas caipiras. 5. Perus. I. Café, Marcos Barcellos, orient. II. Título.

LÍDIA LOPES FERREIRA

Tese defendida e aprovada em 02/09/2014 pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Marcos Barcellos Café – EVZ/UFG
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Michele Laboissière (PUC-GO)



Profa. Dra. Karyne Oliveira Coelho (UEG)



Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme (memoria – EVZ/UFG)



Profa. Dra. Cláudia Peixoto Bueno (UEG)

Dedico este trabalho as minhas tias maternas
Jurandy Lopes Silveira e Maria das Graças Lopes,
que me apoiaram para a realização de mais este sonho.
Minha eterna gratidão.

Ao meu companheiro, melhor amigo, cúmplice,
Ulysses Meiwa Nakamura pelo amor, paciência e
dedicação durante esses quatro anos.
Vivemos momentos difíceis e soubemos
passar por tantos desafios juntos.

A minha eterna amiga, **Fernanda Mendes,**
pelo seu exemplo de força, amizade sincera e
conselhos ajudou a nunca desistir por
mais dificuldades que possam existir.
Eternamente no meu coração.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, porque sem ele, não seria ninguém, sempre iluminou meu caminho e mesmo nos momentos difíceis me fez ver o lado bom das coisas.

Aos meus amigos que tive o prazer de conhecê-los nessa Universidade:

Bruno Moreira dos Santos, irmão que Deus me permitiu escolher,

A querida **Juliana Bonifácio** pelos conselhos e amizade.

A **Hilari Hidasi** pela sugestão do tema da tese e auxílio.

A **Taís e Hérika Xavier** pela amizade, ajuda nos momentos de dificuldade.

Ao amigo **Alexsander Augusto** pela contribuição.

Winder por ter me ensinado toda a técnica de PCR convencional e ajudado muito na prática deste trabalho, minha eterna gratidão.

Ao meu estagiário **Whesley** pela disposição e ajuda.

Ao colega **Elton** que sempre me socorreu com os problemas no laboratório.

Ao meu orientador **Marcos Barcellos Café** pelo apoio e paciência.

As minhas coorientadoras **Maria Auxiliadora Andrade** e **Nadja Mongyca Leandro** pelos ensinamentos técnicos e orientações.

Ao professor **Guido Fontgalland Coelho Linhares** por toda disposição e ensinamentos.

A **Agrodefesa**, e todos os responsáveis e colegas de profissão que me deram apoio para conseguir, mesmo trabalhando em outro município, concluir este trabalho.

Ao proprietário da empresa Frango Heloysa, **José Primo Moreira e filha Heloysa Agostinho Moreira** por toda colaboração.

Minhas colegas de profissão, FEAs **Daniela, Alessandra** e **Fernando**.

A cada vida animal que foi amostrada nessa pesquisa, meu respeito.

Pela **Capes** disponibilizar o direito da bolsa de pós-graduação que foi essencial para conseguir concluir este estudo.

À **Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**, professores e colegas pela oportunidade.

Agradeço a todos os professores, orientador do mestrado Dr. **José Henrique Stringhini**, colaboradores, colegas desta Universidade Federal de Goiás e todas as oportunidades que contribuíram para ter alcançado mais esse degrau na minha carreira.

“Não há diferença fundamental entre o Homem e os animais nas suas faculdades mentais[...]. Os animais, como o Homem, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento.”

Charles Darwin

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Desenvolvimento, Transmissão e Sintomatologia	3
2.2 Aspectos epidemiológicos	5
2.3 Diagnóstico.....	6
2.4 Clamidiose e Saúde Pública.....	9
REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2- DETECÇÃO DE <i>Chlamydophila psittaci</i> EM POMBOS (<i>Columba livia domestica</i>) DE VIDA LIVRE DA REGIÃO CENTRO-SUL DO ESTADO DE GOIÁS.....	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Amostragem	19
2.2 Local das análises.....	19
2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	19
2.4 Análise estatística	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4 CONCLUSÕES	24
5 REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 3- DETECÇÃO DA <i>Chlamydophila psittaci</i> EM AMOSTRAS DE SUABES TRAQUEAIS E CLOCAIS EM GALLIFORMES DA REGIÃO CENTRO-SUL DO ESTADO DE GOIÁS.....	28
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Amostragem	32
2.2 Local das análises.....	32
2.2 Reação em cadeia da polimerase	32
2.3 Análise estatística	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4 CONCLUSÕES	38
5 REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

RESUMO

A clamidiose ou ornitose é uma das principais zoonoses de origem aviária e de importância para criações de aves domésticas. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de pesquisar a presença de *Chlamydophila psittaci* em pombos (*Columba livia*), perus (*Meleagris gallopavo domesticus*), frangos de corte, galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) e estimar a ocorrência desses animais infectados na região Centro-Sul do Estado de Goiás. Foram capturados 120 pombos nas proximidades de agroindústrias, realizados 120 suabes traqueiais e 120 cloacais, também foram coletadas em 300 frangos de corte, 300 amostras de suabes cloacais e 300 de traqueiais. Em 240 perus foram realizados 240 suabes traqueiais e 240 cloacais e 240 suabes cloacais e 240 traqueais de galinhas caipiras de pequenas propriedades e feiras livres, os quais foram analisados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Obteveram-se pela PCR, 6,7% (8/120) pombos positivos para traqueias e cloacas, 5,8% (7/120) apenas para suabes de traqueia, 17,5% (21/120) apenas para suabes de cloacas, totalizando 30% (36/120) de aves infectadas com *C. psittaci*. Nas amostras oriundas de frangos de corte e de perus não se detectou a bactéria. Foram encontrados 17,5% (42/240) de galinhas caipiras positivas, sendo 8,3% (20/240) amostras positivas para traqueias e cloacas, 6,7% (16/240) apenas para suabes de traqueias e 2,5% (6/240) somente para suabes de cloacas. Conclui-se que os pombos assim como as galinhas caipiras deste estudo são portadores de *C. psittaci*, enquanto aos frangos e perus avaliados, não estavam infectados.

Palavras-chave: Aves domésticas, clamidiose, frango de corte, galinhas caipiras, perus

ABSTRACT

The chlamydiosis or ornithosis is a major zoonosis of avian origin and it is important for poultry breeding. This study was carried out in order to investigate the presence of *Chlamydophila psittaci* in pigeons (*Columba livia*), turkeys (*Meleagris gallopavo domesticus*), broilers and free-range chickens (*Gallus gallus domesticus*) and to estimate the occurrence of infected animals in the Center-Souther region of the State of Goias. Cloacal and tracheal swabs were colleted from 120 pigeons captured near farms, 300 broiler chickens, 240 turkeys and 240 free-range chickens, analyzed by polymerase chain reaction (PCR). We obtained by the PCR, 6,7% (8/120) positive trachea and cloaca swabs in pigeons, 5,8% (7/120) positive tracheas swabs, and 17,5 % (21/120) positive cloacal swabs, totaling 30% (36/120) of birds infected with *C. psittaci*. We did not detect the bacterium in samples from broilers and turkeys. We found 17,5% (42/240) positive free-range chickens, being 8,3% (20/240) positive trachea and cloaca swabs, 6,7% (16/240) positive swabs and 2,5% (6/240) cloacal swabs. We concluded that the birds as well free- range chickens are carries of *C. psittaci* while broilers and turkeys were not infected.

Keywords: Poultry, chlamydiosis, broilers, free-range chickens, turkeys

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Chlamydophila psittaci é considerada o agente etiológico da clamidiose, sendo anteriormente denominada de psitacose, quando acometia os psitacídeos ou ornitose, quando ocorria em quaisquer outras espécies de aves (BIRCHARD, 1998; RASO, 2007). É cosmopolita e endêmica no Brasil, podendo causar doença clínica em aves, répteis e mamíferos, incluindo o homem (EVERETT et al., 1999; ANDERSEN & VANROMPAY, 2003; GRESPAN, 2009).

É uma bactéria intracelular obrigatória Gram-negativa, do gênero *Chlamydophila*, família *Chlamydiaceae* e da ordem *Chlamydiales*. Possui grande importância na medicina veterinária e humana, o que justifica as pesquisas aplicadas ao tema (ANDERSEN & VANROMPAY, 2003; KALETA & TADAI, 2003).

Nos Estados Unidos, a clamidiose está na lista de doenças notificáveis de animais terrestres ou aquáticos da Organização Mundial para a Saúde Animal. Sendo de notificação obrigatória dentro de 48 horas (BEECKMAN & VANROMPAY, 2009; PROENÇA et al., 2011). As informações sobre a ocorrência da doença em países da América do Sul como no Brasil são raras, assim como, na Argentina, Bolívia, Chile, Suriname, Uruguai e Venezuela; nos demais países, não existem informações oficiais (OIE, 2013).

No Brasil, essa doença possui prevalência subestimada, devido ao seu difícil diagnóstico e complexa fisiopatologia (RASO, 2004; PROENÇA et al., 2011). Segundo RASO et al. (2010), relatos de casos clínicos e estudos sobre clamidiose em aves são escassos devido aos poucos testes e reagentes comerciais padronizados.

Não foi encontrada na literatura consultada, qualquer informação sobre casos dessa doença em aves domesticadas e humanos no Estado de Goiás. No entanto, HIDASI (2010) pesquisou 300 psitacídeos provenientes do comércio ilegal de animais selvagens no Centro de Triagem de Animais Silvestres do

Estado de Goiás (CETAS/GO) quanto à presença de *C. psittaci* em suabes de traqueia e cloaca e encontrou 11/300 (3,66%) positivos na análise pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo que, apenas duas das aves apresentaram sinais clínicos compatíveis com clamidiose.

Também outras espécies de aves de vida livre são fontes em potencial de contaminação e transmissão de enfermidades para aves de produção e conseqüentemente aos seres humanos, por isso, o contato entre elas deve ser evitado (RASO, 2004; TELFER et al., 2005). Como exemplo, os columbiformes sinatrópicos podem ter um importante papel na epidemiologia de patógenos com potencial zoonótico ou de impacto econômico para a indústria avícola (FERREIRA, 2012).

A epidemiologia desta zoonose em aves domésticas no País e no Estado ainda é escassa, sendo necessários estudos complementares. O que torna este trabalho pioneiro no Estado de Goiás, a evidenciar a identificação desse patógeno em aves domésticas e em pombos, evitando possíveis surtos e comprometimento aos seres humanos.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho, foi detectar a presença de *Chlamydophila psittaci* em amostras de suabes traqueais e cloacais de pombos, frangos de corte, perus e galinhas caipiras, utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Desta forma, pretende-se contribuir para a epidemiologia regional desta doença e estimar sua ocorrência na região Centro-Sul do Estado de Goiás.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento, Transmissão e Sintomatologia

Quanto a sua forma de desenvolvimento, as clamidófilas são microrganismos que apresentam um ciclo bifásico característico. Na forma infecciosa, também denominada de corpo elementar (CE), o microrganismo é estável no meio ambiente (RASO, 2007). Após a fixação do CE em receptores específicos da célula do hospedeiro, ocorre uma endocitose, ficando este envolvido em um vacúolo dentro da célula infectada (Figura 1).

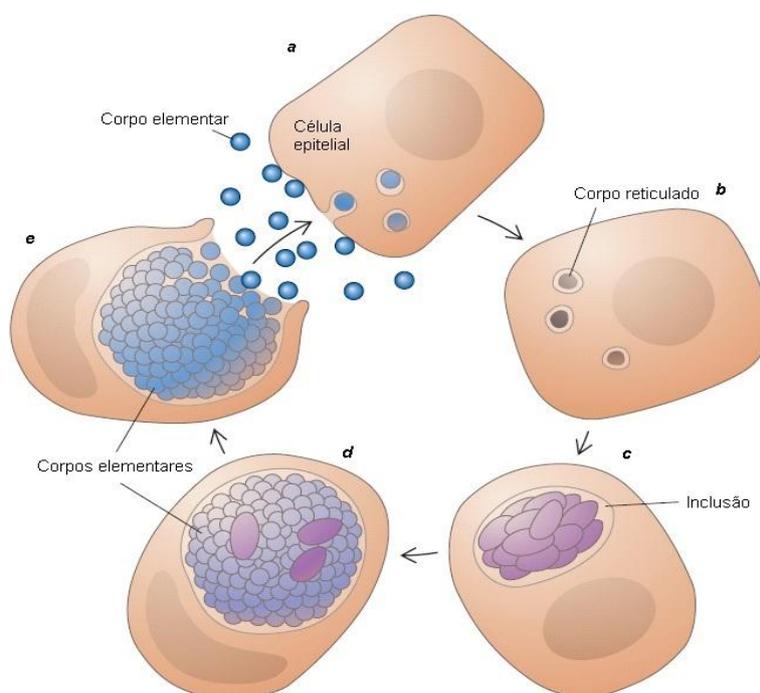


FIGURA 1- Ciclo de desenvolvimento da clamídia nas células hospedeiras. (a) CE adere e é fagocitado por célula epitelial hospedeira. (b) Transformação de CE em CR. (c) Divisões binárias (d) Transformação de CR em CE infectantes (e) Liberação de CE infecciosos.

Fonte: Adaptado de STAMM (2006).

Na fase seguinte, ainda dentro do vacúolo, o CE sofre divisão binária, sendo diferenciado em uma nova partícula, denominada de corpo reticular (CR).

Os CRs resultantes parasitam a mitocôndria da célula hospedeira, extraíndo a energia necessária para o seu crescimento e sua multiplicação (LONGBOTTON & COULTER, 2003).

Ocorre à síntese de DNA, RNA, proteínas e a multiplicação do CR por divisão binária, formando microcolônias contendo de 100 a 500 microrganismos por célula, os chamados corpúsculos de inclusão ou corpos de Levintal-Collie-Lilie (LCL). Após maturação, os CRs transformam-se novamente em CE, os quais são liberados por meio da lise da célula hospedeira (RASO, 2007).

Células infectadas podem transmitir o microrganismo para as células filhas durante seu processo de divisão, perpetuando assim a infecção, sem liberação sistêmica de corpos elementares imunogênicos (RASO, 2007). Tal ciclo tem a duração de 48 a 72 horas (MOULDER, 1991). Os CEs podem sobreviver por meses à dessecação ou à ação direta do sol, quando protegidos por matéria orgânica presente em fezes ou secreções, entretanto, são sensíveis ao calor e aos agentes que destroem os componentes lipídicos da parede celular (LONGBOTTON & COULTER, 2003).

Em infecções naturais por *C. psittaci*, o período de excreção de corpúsculos elementares pode variar, em relação a virulência da estirpe, carga infectante e estado imune do hospedeiro (ANDERSEN et al., 2003). *C. psittaci* pode causar infecções subclínicas, agudas, subagudas ou crônicas, com elevada mortalidade em aves silvestres e domésticas (GRESPLAN, 2009). Infecções bacterianas secundárias, principalmente, por *E. coli* e *Salmonella*, podem deprimir o sistema imune da ave, ativando os corpos elementares, contribuindo para a elevação da taxa de mortalidade (RASO, 2007). Esta bactéria infecta preferencialmente células epiteliais de mucosas e macrófagos mononucleares (GERLACH, 1994).

Considerada como uma das principais zoonoses aviárias, a infecção por *C. psittaci* é caracterizada por doença respiratória ou sistêmica em 465 espécies de aves de 30 ordens diferentes (DICKX et al., 2010; PROENÇA et al., 2011). Os sinais da doença nas aves são inespecíficos, pois incluem, sinais respiratórios, digestórios, urinários, neurológicos, entre outros, levando ao óbito. Conjuntivite, muitas vezes recorrente, pode ser, em alguns casos, o único sinal

clínico aparente (GERLACH, 1994). A doença clínica é induzida por fatores estressantes, associados ao manejo impróprio, como má nutrição, excesso populacional, transporte inadequado e remoção do habitat natural (NASPHV, 2010).

A forma mais comum de transmissão da clamidiose entre as aves ocorre por inalação ou ingestão da bactéria, pelo contato direto com secreções e/ou excreções contaminadas ou no ninho, quando os pais regurgitam alimentos contaminados para os filhotes (como ocorre com os *Columbiformes*), também pode ocorrer, por meio de fômites ou ectoparasitas sugadores de sangue (ácaros, piolhos, mosquitos) e ou menos comumente por meio de bicadas e feridas (SACHSE et al., 2009). QUINN et al. (2005) identificaram espécies de clamídias em invertebrados, embora seja mais comum a infecção em hospedeiros específicos, podendo ocorrer a transmissão interespecie.

2.2 Aspectos epidemiológicos

No Brasil, as principais espécies reconhecidas como portadoras de *Chlamydophila psittaci* pertencem às ordens *Columbiforme* e *Psittaciforme*, principalmente sob condições de cativeiro, no entanto, poucas pesquisas foram realizadas em aves de outras ordens (RASO et al., 2012).

Como o País possui o maior número de espécies de psitacídeos do mundo, são esperadas prevalências consideravelmente elevadas de casos dessa doença no território nacional (SICK, 1997). Segundo KALETA & TADAY (2003), a ordem *Psittaciforme* possui o maior percentual de espécies positivas (45%). Apesar da sua ocorrência em aves selvagens, poucos são os relatos de óbitos por *C. psittaci* em ambientes naturais, sendo descritos óbitos ocasionais em pombos, tordos e gaivotas. Essa presença de infecção sem sinais clínicos da doença em aves selvagens pode sugerir uma relação estável entre parasita e hospedeiro (RASO et al., 2006).

O primeiro relato dessa doença foi em 1893, em Paris, quando se notificou a transmissão de *C. psittaci* de papagaios (Latin; *psittacus* ou papagaio) para os seres humanos, causando sintomas semelhantes à gripe (MORANGE,

1895). Foi descrito em 1932, o primeiro caso de psitacose humana transmitida de *C. psittaci* de galinhas doentes. Até então, pensava-se que esta infecção ocorria apenas em psitacídeos (MEYER, 1965). Posteriormente, segundo BEER (1988), relatos da doença em pombos e patos domésticos foram descritos em 1940 e 1948, respectivamente.

No Brasil, em 2003, um pequeno surto foi observado em uma residência, onde sete pessoas apresentaram quadro clínico sugestivo de psitacose (RASO, 2007), como dor de cabeça, calafrios, mal-estar, mialgia e comprometimento pulmonar, febre, tosse não produtiva acompanhada de dificuldade respiratória (NASPHV, 2010). A investigação epidemiológica realizada indicou que as pessoas haviam adquirido três caturritas (*Myiopsitta monachus*) no comércio ilegal e que estas apresentaram sinais clínicos respiratórios sugestivos da enfermidade. As aves foram a óbito antes de qualquer avaliação médico veterinária, no entanto, foram incriminadas como fonte de infecção aos humanos (RASO, 2007).

O primeiro estudo soroepidemiológico para *C. psittaci* em humanos no Brasil foi realizado por RASO et al. (2010), evidenciando a importância dessa zoonose aos profissionais em contato com animais silvestres em cativeiro. A pesquisa contemplou 364 funcionários e veterinários, entre 15 e 64 anos, de 20 zoológicos no País. Foram demonstrados 4,7% (17/364) de indivíduos sororreagentes a *C. psittaci*, em sete zoológicos, com titulação entre 16 e 256, caracterizando a presença de infecção recente ou atuante.

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico de clamidiose em aves é dificultado pela ausência de sinais clínicos patognomônicos, os quais, associados aos exames complementares (radiológico, hematológico e bioquímico) são apenas sugestivos da doença, representando um desafio ao médico veterinário (RUPLEY, 1999; RASO, 2007, NASPHV, 2010). Apesar da dificuldade, é importante obter um diagnóstico rápido e definitivo devido ao potencial zoonótico da infecção (LONGBOTTOM & COULTER, 2003; PROENÇA et al., 2011).

Devido a apresentação clínica da clamidiose ser tão variável, deve-se efetuar um diagnóstico diferencial em relação às doenças hemospóridias (*Plasmodium* e *Leucocytozoon* spp), da aspergilose, micoplasmose e influenza aviária (BEER, 1988; FRIEND & FRANSON, 1999).

O diagnóstico sorológico de clamidiose é um procedimento auxiliar aos testes de detecção de *Chlamydophila* em aves. São empregadas as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA indireto e reação de fixação de complemento (RFC). Entre as principais vantagens dos testes imunoenzimáticos, em relação à cultura de células e ovos embrionados, para diagnóstico de infecção por *C. psittaci* seria o tempo necessário para realizar o teste, a necessidade de amostras de alta qualidade, além do risco potencial para o pessoal do laboratório, outras técnicas têm sido mais usadas (OIE, 2012).

Essas técnicas podem apresentar desvantagens como baixa especificidade, ocorrência de reação cruzada com outras bactérias gram-negativas e falha na detecção dos anticorpos em infecção recente ou após tratamento com antibióticos (GERLACH, 1994). Além disso, não indicam uma infecção ativa, devido ao fato de títulos de IgG persistirem após um tratamento bem sucedido. Por essas razões, são testes mais utilizados quando associados com os sinais clínicos da doença e em inquéritos epidemiológicos (RASO, 2007).

O teste de ELISA foi primeiramente desenvolvido para a detecção de *Chlamydia trachomatis* em humanos. No entanto, como se baseia no antígeno LPS da membrana clamidial, em teoria é também aplicável à infecção em animais, pois detecta todas as espécies de *Chlamydiaceae* (OIE, 2012). Os resultados falsos-negativos ocorrem no teste de ELISA quando há um número insuficiente de partículas bacterianas na amostra (menos de 2,5 ng/600 corpos elementares), ou no caso de excreção intermitente da bactéria (PROENÇA et. al., 2011). O teste imuno-histoquímico (IHQ) é considerado a forma de diagnóstico *post mortem* mais acurada para a clamidiose e é amplamente utilizada como exame de rotina em laboratórios de patologia em países como os Estados Unidos (ELDER & BROWN 1999).

A sorologia é mais confiável quando associada ao histórico, sinais clínicos e exames complementares (RASO, 2004). Testes sorológicos com

resultado positivo evidenciam que em algum momento a ave foi infectada e desenvolveu uma resposta imune, mas não indicam que a mesma tenha infecção ativa (SMITH et al., 2006; SACHSE et al., 2009). Entretanto, resultados sorológicos falso-positivos podem ocorrer por reações cruzadas com outros agentes, já os resultados falso-negativos podem ocorrer em aves com infecção aguda quando amostras são coletadas na fase inicial da infecção (soroconversão não iniciada), na excreção intermitente em animais jovens ou imunossuprimidos ou em casos onde a quantidade de antígenos da amostra é insuficiente (NASPHV, 2010). Para confirmar um diagnóstico de clamidiose em aves por meio de teste sorológico é necessário que haja um aumento de quatro vezes no título de amostras pareadas, ou uma combinação de resultado sorológico positivo e identificação do antígeno (NASPHV, 2010). Portanto, o uso combinado de mais de uma técnica diagnóstica torna-se necessário, principalmente, no exame de um único indivíduo (RUPLEY, 1999; SMITH et. al., 2006; RASO, 2007).

Conforme SMITH et al. (2006), se um resultado for positivo em aves, sem a apresentação dos sinais clínicos da doença, deve-se tentar o isolamento do microrganismo, no entanto, em resultados negativos, a ave apresentando sintomatologia da doença, sugere-se utilizar outros meios como cultura, testes sorológicos ou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A PCR baseia-se na amplificação de DNA que funciona como uma molécula molde. Durante a reação, este DNA sofre desnaturação e liga-se de forma complementar a *primers* (sequências iniciadoras) pelo pareamento específico (A/T; C/G) por pontes de hidrogênio. Na presença de um DNA polimerase termoestável e dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), sob condições ideais de pH, salinidade, com a presença do cofator da enzima (íons de magnésio bivalentes, Mg^{2+}) e a síntese de novas fitas de DNA se inicia formando milhões de amplicons (UHLMANN, 1998). Esta característica explica a sensibilidade e especificidade da PCR, bem como a capacidade dos testes diagnósticos que usam esse método para detectar patógenos presentes em número (KONEMAN et al., 2006).

Como alternativa para o cultivo de clamídias os métodos moleculares têm sido adotados em muitos laboratórios nos últimos anos; em particular, vários protocolos de PCR. Os alvos genômicos para os ensaios de PCR incluem os

únicos genes *ompA* e *ompB*, e o gene de rRNA 16S (HEWINSON et al., 1997; SACHSE & HOTZEL, 2003). O gene 23S rRNA da família *Chlamydiaceae* permitiu a identificação da espécie (SACHSE et al., 2005), enquanto o outro foi especificamente desenvolvido para *ompA* baseado na genotipagem da *C. psittaci* (SACHSE et al., 2008).

Vários nested-PCRs baseados na detecção *ompA* têm sido descritos e são rotineiramente utilizados (VAN-LOOK et al., 2005). Além disso, o aparecimento de PCR em tempo real, o sequenciamento e micro-arranjos tem proporcionado a oportunidade de não só determinar a espécie (SACHSE et al., 2005), mas também o genótipo do agente causador (GEEN et al., 2005; SACHSE et al., 2008). Tanto a sensibilidade intrínseca e a eficiência da extração de DNA a partir da amostra clínica são de importância crucial para a sensibilidade do ensaio (HEDDEMA et al., 2006).

Devido à estabilidade relativamente alta do DNA, resultados positivos podem ser encontrados a partir de amostras contendo inclusive, bactérias não viáveis (HEWINSON et al., 1997). Esses testes são descritos como capazes de detectar DNA de *C. psittaci* em amostras de tecidos, fezes e suabes de orofaringe e cloaca (SAREYYUPOGLU et al., 2007).

O diagnóstico da clamidiose pela PCR, com sequências específicas para detecção do agente etiológico é o método comercial disponível mais utilizado para diagnóstico de *C. psittaci* no Brasil (GODOY, 2007). Este método é vantajoso por ser altamente específico e automatizado, apesar do elevado risco de contaminação dos manipuladores e dos laboratórios e também dos altos custos (RASO et al., 2010).

2.4 Clamidiose e Saúde Pública

A infecção em humanos pela *C. psittaci* pode resultar em casos graves de doença respiratória após contato direto ou indireto com aves infectadas (VANROMPAY et al., 2007). Sendo considerada uma importante doença ocupacional (RASO et al. 2010).

A transmissão de *C. psittaci* para seres humanos ocorre principalmente pela inalação do microrganismo presente em penas, fezes secas ou em secreção respiratória de aves ou portador assintomático ou manuseio da plumagem e tecidos de aves infectadas (NASPHV, 2010).

Dentre os principais fatores de risco da infecção por *C. psittaci* estão à introdução de aves importadas sem testes sorológicos prévios, criação e transporte inadequado de aves, favorecendo o aparecimento da sintomatologia clínica, e o diagnóstico tardio em aves e humanos (QUINN et al., 2005). O uso frequente de tetraciclinas para tratamento de aves de companhia ou prevenção de doenças respiratórias nestes animais aumenta o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana, como já foi reportado para *Chlamydia suis*, portanto, o uso regular de antimicrobianos deve ser evitado (VANROMPAY et al., 2007).

Devido ao potencial zoonótico da clamidiose, da existência de portadores assintomáticos, das dificuldades de diagnóstico, práticas adequadas de biosegurança são necessárias para controlar a introdução e propagação do agente etiológico numa população aviária (KHAN, 2006). Deve-se ter em mente medidas de biossegurança específicas tanto para o profissional quanto para os animais, ter cuidado com a introdução de animais não pertencentes à área em questão, falta de um programa de controle e sanidade eficiente são os principais fatores de risco para a transmissão de zoonoses, que podem vir a causar grandes consequências à população (QUINN et al., 2005).

Uma das principais maneiras de prevenir a transmissão de *C. psittaci* quando existe uma ave infectada no local, é a manutenção de uma boa qualidade sanitária nos recintos, pois, os CEs possuem baixa resistência a desinfetantes, calor e luz solar, mas são viáveis por um longo período em secreções secas de animais ou água a temperatura ambiente (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003).

3 REFERÊNCIAS

1. ANDERSEN, A. A.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). *In*: SAYF, Y.M. **Disease of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University. p. 863-879, 2003.
2. BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**, São Paulo: Roca, v.1, p. 390-398, 1998.
3. DICKX, V; GEENS, T; DESCHUYFFELEER, T; TYBERGHIEN, L; HARKINEZHAD, T; BEECKMAN, D. S. A; BRAECKMAN, L; VANROMPAY, D. *Chlamydomphila psittaci* Zoonotic Risk Assessment in a Chicken and Turkey Slaughterhouse. **Journal of Clinical Microbiology**, v.9, n.48, p.3244, 2010.
4. FRIEND, M.; FRANSON, J.; CHRISTIAN, E.D. **Field manual Wild life diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds**. Whashington: USGS, p. 111-114, 1999.
5. GAEDE, W.; RECKLING, K.F.; DRESENKAMP, B.; KENKLIES, S.; SCHUBERT, E.; NOACK, U.; IRMSCHER, H.M.; LUDWIG, C.; HOTZEL, H.; SACHSE, K. *Chlamydomphila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. **Zoonoses and Public Health**, v.55, p. 84–88, 2008.
6. GEENS, T.; DESPLANQUES, A.; VAN LOOCK, M.; BONNER, B. M.; KALETA, E. F.; MAGNINO, S.; ANDERSEN, A. A.; EVERETT, K. D. E.; VANROMPAY, D. Sequencing of the *Chlamydomphila psittaci* ompA gene reveals a newgenotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n. 5, p. 2456–2461, 2005.
7. GERLACH, H. *Chlamydia*. *In*: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. (Eds.), **Avian Medicine: Principles and Application**. Wingers, FL, p. 984–996, 1994.
8. GODOY, S. N. Psittaciformes (Araras, papagaios, periquito). *In*: CUBAS, Z.S. et al. **Tratado de animais selvagens. Medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p. 222-251, 2007.
9. GRESPAN, A. **Clamidiose em Calopsitas (*Nymphicus hollandicus*): perfil do proprietário e ensaio terapêutico**. 111f. São Paulo, 2009. Dissertação

- (mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, 2009.
10. HEDEMA, E. R.; VAN HANNEN, E. J.; DUIM, B.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; PANNEKOEK, Y. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.1989–1990, 2006.
 11. HEWINSON, G. L.; GRIFFITHS, P. C.; BEVAN, B. J.; KIRWAN, S. E. S.; FIELD, M. E.; WOODWARD, M. J.; DAWSON, M. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, n. 54, p. 155-156, 1997.
 12. KALETA, E. F.; TADAY, M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. **Avian Pathology**, v.32, n.5, p.435-462, 2003.
 13. KHAN, C. M. (Ed.) **The Merck Veterinary Manual**. 9th ed. Whitehouse Station: MERCK & Co., 2006.
 14. KONEMAN, E.W. **Microbiologia molecular**. In: KONEMAN, E.W., Diagnóstico
 15. LONGBOTTOM, D.; COULTER, L. J. Animal Chlamydiosis and zoonotic implications. **Journal of Comparative Pathology**, n.128, p.217-244, 2003.
 16. MEYER, K. F. Ornithosis, In H. E. Biester and L. H. Schwarte (ed.), **Diseases of poultry**. Iowa State University Press, Ames, IA., p. 675–770, 1965.
 - Microbiológico, ed.6. Rio de Janeiro, p. 139-154, 2006.
 17. MORANGE, A. 1895. De la psittacose, ou infection speciale determinee par des perruches. **Academie de Paris**, France, 1895.
 18. MOULDER, J. W. Interaction of *Chlamydia* and host cells in vitro. **Microbiological Reviews**, v.55, p.143-190, 1991.
 19. NASPHV – NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. **Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis)**. 2010. Disponível em: <<http://avma.org/pubhlth/psittacosis.asp>>Online. Acesso em: 20/jun./ 2013.
 20. OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2004**. Disponível em: < http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00105.htm>. Acesso em: 03 set. 2013.

21. OIE. **OIE listed diseases**, 2013. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013/>. 2013. Acesso em 23 de abril de 2013.
22. PROENÇA, L. M. FAGLIARI, J. J.; RASO, T. F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p.841-847, 2011.
23. QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. São Paulo: Art. Med., p.512, 2005.
24. RASO, T. F. Clamidiose. *In*: CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R; CATÃO DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca. v. 47, p. 760-767, 2007.
25. RASO, T. F.; CARRASCO, A. O. T.; SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; PINTO, A. A. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo workers in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p.411-416, 2010.
26. RASO, T. F.; FERREIRA, V. L.; TEIXEIRA, R. H. F.; PINTO, A. A. Survey on *Chlamydophila psittaci* in captive rhamphastids in São Paulo State, Brazil. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1249-1252, 2012.
27. RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v.117, p. 235-241, 2006.
28. RUPLEY, A. E. **Diagnostic Techniques for Gastrointestinal Diseases of Psittacines** Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v. 8, n. 2 (April), p. 51-65, 1999.
29. SACHSE, K.; HOTZEL, H. **Detection and differentiation of Chlamydiae by nested PCR**. *In*: PCR Detection of Microbial Pathogens, Sachse K. & Frey J., eds. Humana Press., New Jersey, USA, p. 123 –136, 2003.
30. SACHSE, K.; VRETOU, E.; LIVINGSTONE, M.; BOREL, N.; POSPISCHIL, A.; LONGBOTTOM, D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. **Veterinary Microbiology**, v.135, p.2-21, 2009.

31. SAREYYUPOGLU, B.; CANTEKIN, Z.; BAS, B. *Chlamydophila psittaci* DNA Detection in the Faeces of Cage Birds. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, p. 237-242, 2007.
32. SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p. 912, 1997.
33. SMITH, K. A.; BRADLEY, K. K; STOBIERSKI, M. G; TENGELSEN, L. A. **Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis)**, 2006.
34. STAMM W E. Diseases due to Chlamydia. **ACP Medicine**, cap.1 p.10, 2006. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/4883/doencas_causadas_por_clamidia_%E2%80%933_walter_e_stamm.htm. Acessado em abril de 2014.
35. UHLMANN, V. In cell amplification. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v.51, p.119–130, 1998.
36. VAN LOOCK, M.; VERMINNEN, K.; MESSMER, T. O.; VOLCKAERT, G.; GODDEERISBM; VANROMPAY, D. Use of a nested PCR-enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydophila psittaci* in turkeys. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p.76, 2005.
37. VANROMPAY, D.; HARKINEZHAD, T.; VAN DE WALLE, M.; BEECKMAN, D.; VAN DROOGENBROECK, C.; VERMINNEN, K.; LETEN, R.; MARTEL, A.; CAUWERTS, K. *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1108–1110, 2007.
38. VERMINNEN, K., DUQUENNE, B., DE KEUKELEIRE, D., DUIM, B., PANNEKOEK, Y., BRAECKMAN, L., VANROMPAY, D. Evaluation of a *Chlamydophila psittaci* diagnostic platform for zoonotic risk assessment. **Journal of Clinical Microbiology**, cap.46, v.1, p. 281–285, 2008.

CAPÍTULO 2- DETECÇÃO DE *Chlamydophila psittaci* EM POMBOS (*Columba livia domestica*) DE VIDA LIVRE DA REGIÃO CENTRO-SUL DO ESTADO DE GOIÁS

RESUMO: Pombos (*Columba livia*) são aves sinatrópicas que podem ser infectados com a zoonótica *Chlamydophila psittaci*. Esta bactéria é o agente da clamidiose, também conhecida como psitacose em seres humanos. Com este estudo, visou-se detectar a presença de *Chlamydophila psittaci* em amostras coletadas de 120 pombos de vida livre. Foram colhidos 120 suabes traqueais e 120 cloacais destas aves, que foram analisados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Das 240 amostras analisadas, 6,7% (8/120) foram positivas para ambas as amostras, 5,8% (7/120) positivas apenas para suabes de traqueias e 17,5% (21/120) foram positivas apenas para suabes de cloacas, totalizando 30% (36/120) de aves positivas para esse agente etiológico. Pode-se concluir que a *C. psittaci* encontra-se circulante na região e que os pombos são portadores inaparentes.

Palavras chave: clamidiose, *Columba livia*, PCR, zoonose

***Chlamydophila psittaci* DETECTION IN FREE-LIVING PIGEONS (*Columba Livia Domestica*) FROM THE CENTRAL-SOUTHER REGION OF THE STATE OF GOIÁS**

Abstract: Pigeons (*Columba livia*) are synanthrope birds that may be infected with *Chlamydophila psittaci*. This bacterium is the agent of chlamydiosis, also known as psittacosis in humans. This study aimed to detect the presence of *Chlamydophila psittaci* in 120 free-living pigeon's samples. 120 cloacal and 120 tracheal swabs were harvested from these birds, and analyzed by Polymerase Chain Reaction (PCR). Of the 120 sampled birds, 6,7% (8/120) presented positive cloacal and tracheal swabs samples, 5,8% (7/120) positive trachea swabs only and 17,5% (21/120) positive cloacal swabs only, totaling 30% (36/120) of positive birds for this etiologic agent. In conclusion, *C. psittaci* is found circulating in the region and pigeons are unapparent carriers.

Keywords: chlamydiosis, *Columba livia*, PCR, zoonosis

1 INTRODUÇÃO

Pombos (*Columba livia domestica*), também conhecidos como “pombos da cidade ou urbanos”, são membros da família *Columbidae* e apontados como responsáveis pela transmissão de *Clamidophylla psittaci* aos seres humanos. Sua presença é permanente no ambiente urbano no Brasil, apesar de não serem nativas, pois são originárias da Europa, tendo sido introduzidas no País já domesticadas (CEO, 2005).

Endêmica em todo o mundo, a *C. psittaci* já foi detectada em 467 espécies aviárias de 30 ordens de aves (RASO, 2007). Em 1940, *C. psittaci* foi isolada a partir de pombos-correio pela primeira vez, desde então, vários inquéritos sorológicos foram realizados nesta espécie (PINKERTON & SWANK, 1940).

Essas aves são reservatórios de patógenos que os transmitem para o homem, através de partículas aerossolizadas de suas fezes ressecadas, por via respiratória e também por seus ectoparasitas (NUNES & MIRANDA, 2010). A ausência de predadores no ambiente urbano possibilita uma maior sobrevivência de animais fracos e doentes que se tornam reservatórios e disseminadores de doenças, sendo consideradas pragas urbanas (MAGNINO et al., 2009).

A eliminação do patógeno ocorre pelas fezes, bem como em secreções conjuntival e respiratórias, muitas vezes, de forma intermitente e sem sinais clínicos, o que dificulta avaliar o risco de transmissão para outros animais, incluindo seres humanos (ANDERSEN & VANROMPAY, 2003). Maior eliminação de clamídias pode ser desencadeada por fatores estressantes, tais como outras infecções ou infestações secundárias, falta de alimentação, reprodução e superlotação, virulência do genótipo, dose infectante e estado de imunidade do hospedeiro (HARKINEZHAD et al., 2009; NASPHV, 2010).

FERREIRA (2012) pesquisou a ocorrência sazonal desse patógeno em pombos-domésticos (*Columba livia*) em dois entrepostos no Estado de São Paulo. O DNA de *C. psittaci* foi detectado em 13,3% das amostras, sendo 10,8% provenientes de aves capturadas no período seco e 15,8% na estação chuvosa. Tais resultados são relevantes, pois demonstram que a *C. psittaci* ocorre em

pombos presentes em áreas públicas frequentadas por um grande número de pessoas.

Chlamydiae pode ser detectada principalmente nas fezes de pombos, cloaca ou na superfície de vísceras e tecidos, tais como fígado, baço, pulmões e traqueia (QUINN et al., 1994). O diagnóstico baseia-se na associação do exame clínico da ave, patologia clínica, radiologia e citologia, com a ajuda de cultura, sorologia e PCR (RUPLEY, 1999; EC, 2002; RASO, 2007).

Segundo ANDERSEN (1991), seis sorovares aviários (A a F) foram reconhecidos e pelo menos três deles (B, E e A) infectam pombos. O sorotipo B é considerado hospedeiro específico e o mais prevalente em todo o mundo em pombos (VANROMPAY et al., 1993; LAROUCAU et al., 2007).

Estudos realizados com amostras de suabes de fezes, traqueia, cloaca e tecidos demonstraram a aplicabilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (PCR *nested* e PCR *semi-nested*) no diagnóstico laboratorial de *Chlamydiaceae* (EC, 2002; RASO, 2007). A PCR oferece, claramente, vantagens sobre outros métodos de teste, por ser rápida e não requerer um grande número de microrganismos viáveis (TREVEJO, 1999).

Este estudo visou detectar pela PCR a presença da *C. psittaci* em amostras coletadas de pombos (*Columba livia domestica*) de vida livre, próximos a explorações comerciais avícolas do Centro-Sul do Estado de Goiás.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram capturados, com auxílio do órgão de defesa sanitária municipal, 120 pombos, aparentemente saudáveis, próximos de diferentes agroindústrias do Estado de Goiás. As aves foram capturadas em armadilhas e retiradas com a ajuda de um puçá e luvas de procedimento, posteriormente enviadas em gaiolas para o laboratório de necropsias de aves do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Cada ave foi contida manualmente, feita a eutanásia por deslocamento cervical, colocada com o ventre para cima e com o corpo levemente inclinado. Um suabe esterilizado foi introduzido na traqueia e outro na cloaca de cada pombo, totalizando 240 amostras. Foram acondicionadas em tubos plásticos esterizados (*Eppendorf*®, Alemanha) devidamente identificados e conservados a -20° C.

2.2 Local das análises

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário da Pós-Graduação de Ciência Animal e no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) de agosto a dezembro de 2013. O desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás de acordo com o protocolo de número 080/11.

2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

2.3.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada segundo LAUERMAN (1998), em que as amostras foram extraídas de suabes traqueais e cloacais. Foi cortada a parte do algodão de cada suabe com lâminas de bisturi estéreis, uma por amostra, colocadas em um tubo de plástico de 1,5 mL com 600 µL de PBS e em seguida

foram agitados em vórtex por um minuto. Foram transferidos 240 µL da solução para cada tubo de plástico esterizado com 10 µL de dietiltreitol (DTT), a 50%, previamente preparado e armazenado a -70°C. As amostras foram em seguida aquecidas a 95°C por 10 minutos, depois, 100 µL desta solução foram transferidas para outro tubo plástico esterizado de 1,5 mL e logo após, adicionados 100 µL de clorofórmio, seguido novamente de agitação em vórtex por 30 segundos. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por dois minutos. A camada aquosa superior formada de cada amostra foi aliquoteada e armazenada em tubo plástico esterizado de 0,5 mL em freezer a -70°C para utilizar na PCR.

2.3.2 Amplificação do DNA

Para a amplificação do DNA foram utilizados as sequências de primers CPF-5´GCAAGACACTCCTCAAAGCC-3´ e CPR-5´CCTTCCCACATAGTGCCATC-3´ (GENEBANK), referente à região do gene MOMP (*major outer membrane protein*) de *Chlamydiaceae*, amplificando produto de 264 pares de bases (pb), conforme HEWISON et al. (1997). Seguindo o protocolo proposto destes mesmos autores para amplificação, foram preparados *mix* para PCR, com volume total de 50µL, correspondido a 35,75 µL de água ultrapura, 5 µL de solução tampão de reação 10 x (500 NmKCl; 15 Nm MgCL₂, 100 Nm Tris- HCL, pH 9,0), 2 µl de MgCL₂ (50 nM), 1 µl da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 0,5 µl de cada *primer* (10 pmol/µl), 0,25 µl de Taq DNA polimerase e 5 µl da amostra de DNA extraído.

Após a distribuição do *mix* e adição das amostras nos tubos plásticos esterilizados (*Eppendorf*®, Alemanha), estes foram transferidos ao termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*), programado para um ciclo de 94°C por três minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72° C por 45 segundos e um ciclo final de 72°C por 45 segundos para extensão.

Como controle positivo da reação, foi utilizado DNA extraído a partir de vacina comercial para gatos (Fel-O-Vax® Lv-K IV+Calicivax/owa, EUA), seguindo o mesmo protocolo das amostras. Como controle negativo utilizou-se água ultrapura.

2.3.3 Visualização dos fragmentos de DNA amplificados

Para a visualização dos produtos amplificados, as amostras foram inoculadas em gel de agarose a 1,2% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) (TRIS 1M; Ácido bórico 0,83M; EDTA 20 mM) e utilizado o marcador molecular de 100 pb. Foram submetidas à eletroforese sob 90V, por cerca de uma hora e 20 minutos e corados por 10 minutos com brometo de etídio.

A análise e visualização das bandas foram realizadas com auxílio do transiluminador (*Eletronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*). As bandas que apresentaram aproximadamente 264 pb quando comparado ao marcador de peso molecular DNA (Ladder 100bp, Gibco BRL, USA) e ao controle positivo, foram consideradas amostras positivas.

2.4 Análise estatística

Utilizou-se da análise de frequências relativas e absolutas dos dados obtidos. Foram utilizados o coeficiente Kappa para avaliação estatística da concordância entre os resultados obtidos de suabes de traqueia e cloaca, com nível de significância de 5% e utilizou-se o *Software R*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detectou-se uma frequência de 30% (36/120) de pombos infectados por *C. psittaci* pesquisados pela PCR, sendo que, 6,7% dos pombos foram positivos (8/120) para amostras de traqueia e cloaca, 5,8% (7/120) apenas para amostras de traqueia e 17,5% (21/120) apenas para amostras de cloacas (Figura 3).

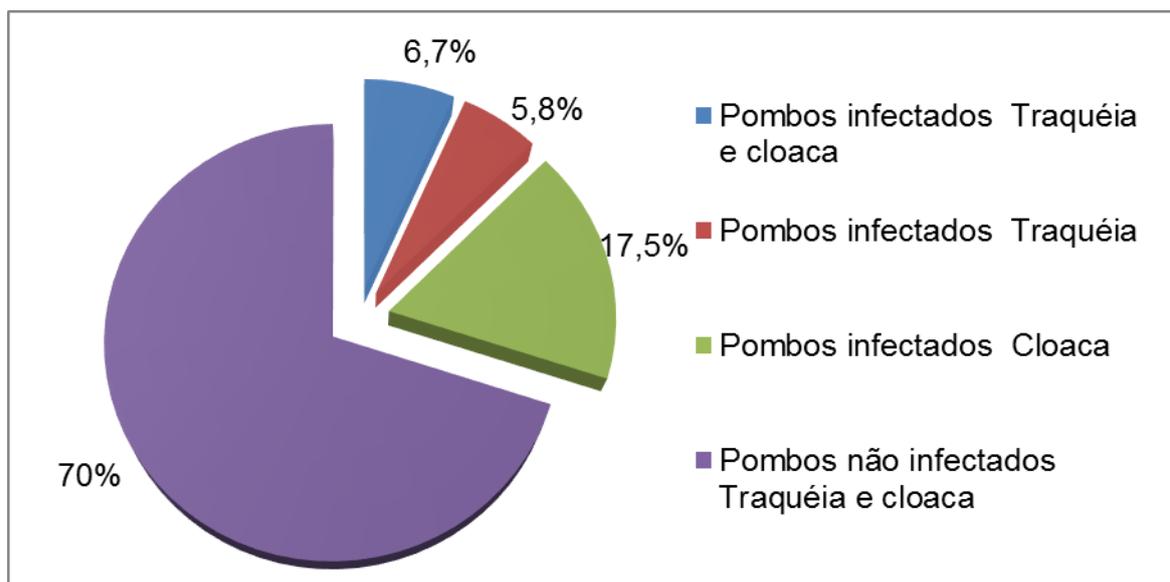


FIGURA 3- Percentual de achados de *C. psittaci* em pombos (*Columbia livia*).

Este resultado de 30% (36/120) de pombos positivos para *C. psittaci* foi encontrado em aves aparentemente saudáveis e difere de HIDASI (2010), que pesquisou o mesmo agente, com técnica semelhante, em amostras de psitacídeos provenientes do comércio ilegal de animais selvagens (CETAS/GO) e detectaram 3,7% (11/300) de amostras positivas. Como podem ser visualizadas as frequências são diferentes, assim como as espécies, mas as aves convivem no mesmo ecossistema o que sugere a circulação desse agente etiológico. Além disso, a detecção do agente em aves sintrópicas traz mais preocupações pelo caráter zoonótico da doença.

Este estudo, sugere que os pombos são portadores assintomáticos e potenciais disseminadores do agente etiológico, conforme também observado por RADOVČIĆ et al. (2005) com 15,83% (44/278) de pombos positivos para

clamidiose, TOMIĆ et al. (2013) com 12,9% (30/232) na Croácia e com VÁZQUEZ et al. (2010), que encontraram 52,6% (61/116) de pombos positivos para *C. psittaci* na Espanha. Estes achados são corroborados também por RASO (2007), que detectou a *C. psittaci* pela PCR em amostras de traqueia e cloaca de pombos de vida livre e sem sinais clínicos, que coabitavam um zoológico brasileiro.

Analisando o valor do coeficiente de Kappa calculado ($K=0,24$), para verificar o grau de concordância entre os resultados das amostras dos suabes de cloaca e traqueia, pode-se concluir que não houve concordância significativa entre os achados dos suabes de cloaca (21/120) em comparação aos suabes de traqueia positivos (7/120) conforme mostrado na Tabela 1.

TABELA 1- Valores estatísticos do coeficiente Kappa da pesquisa de *Chlamydophila psittaci* em suabes de traqueia e cloaca em pombos domésticos do Centro-Sul do Estado de Goiás.

Suabes de traqueias	Suabes de cloacas		Valor de kappa ¹	Valor de P ²
	positivos	negativos		
positivos	8	7	K=0,24	P=0,003
negativos	21	84		

¹Quanto menor o valor de Kappa, maior o comprometimento desta estatística ($K < 0$ sem concordância; $K = 0$ nula; $K = 0,0-0,39$ pouca; $K = 0,40-0,59$ moderada; $K = 0,60-0,79$ relevante; $K = 0,80-1,00$ perfeita concordância)

²Indica o valor máximo de estatística p em relação ao nível de significância estabelecido, $p = 0,05$.

A maior frequência 17,5% (21/120) de *C. psittaci* em suabes de cloacas em relação aos achados de traqueias 5,8% (7/120) provavelmente esteja relacionada com a patogênese da doença, pois, encontram-se na fase de excreção dos corpos elementares que são os elementos infectantes da *Clamidophylla*.

Essa diferença pode ser respaldada em RASO et al. (2006), que encontraram resultados positivos por *semi-nested* PCR em 8,9% de amostras traqueais e em 26,7% das cloacais, oriundas de araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no ninho, o que demonstra maior eliminação de *C. psittaci* por via cloacal. Por outro lado, diferem dos resultados de ANDERSEN (1991), que encontrou o agente com maior frequência em suabes da traqueia do que de esfregaços de cloaca, e de TRÁVNÍČEK et al. (2002), que não encontraram

diferença de frequência no local de coleta, nos resultados positivos de suabes de traqueias e de cloacas.

Neste estudo, os portadores inaparentes são aves de vida livre, que raramente manifestam a enfermidade, podem disseminar o agente para diversas locais, o que torna necessário maior vigilância epidemiológica e o monitoramento em humanos, por ser uma doença ocupacional.

4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que *C. psittaci* é um microrganismo circulante na região e os pombos domésticos analisados atuavam como portadores.

5 REFERÊNCIAS

1. ANDERSEN, A. A. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. **Journal Clinical Microbiology**, v.29, n.4, p. 707–711, 1991.
2. ANDERSEN, A. A.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). *In*: SAYF, Y.M. **Disease of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University. p. 863-879, 2003.
3. Centro de Estudos Ornitológicos (**CEO**): Problemas com pombos domésticos. 2005. Disponível em: <www.ib.usp.br/ceo/jardim/problemaspomb.htm>. Acesso em 29 ago. 2013.
4. EUROPEAN COMMISSION. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare adopted 16 April 2002. **Avian chlamydiosis as a zoonotic disease and risk reduction strategies**. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out73_en.pdf>. Acesso em: 28 Nov. 2013.
5. FERREIRA, V. L. **Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo**. 78f. São Paulo, 2012. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
6. HARKINEZHAD, T.; GEENS, T.; VANROMPAY, D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p.68-77, 2009.
7. HEWINSON, G. L.; GRIFFITHS, P. C.; BEVAN, B. J.; KIRWAN, S. E. S.; FIELD, M. E.; WOODWARD, M. J.; DAWSON, M. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 155-156, 1997.
8. HIDASI, I. W. **Deteccção de Enterobacteriaceae e *Chlamydophila* spp. em psitacídeos de animais selvagens de Goiás**. 62f. Goiânia, 2010. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2010.
9. LAROUCAU, K.; TRICHEREAU, A.; VORIMORE, F.; MAHE', A. M. A pmp genesbased PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis. **Veterinary Microbiology**, cap.121, v.1–2, p.150–157, 2007.

10. LAUERMAN, L. H. **Nucleic acid Amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Washington: Library of congress cataloging in publication data. p.152, 1998.
11. MAGNINO, S.; HAAG-WACKERNAGEL, D.; GEIGENFEIND, I.; HELMECKE, S.; DOVC, A., PRUKNER-RADOVIC´, E.; RESIDBEGOVIĆ, E.; ILIESKI, V.; LAROUCAU, K. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: review of data and focus on public health implications. **Veterinary Microbiology**, v.135, p.54–67, 2009.
12. NASPHV – NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. **Compendium of measures to control *Chlamydomphila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis)**. 2010. Disponível em: <<http://avma.org/pubhlth/psittacosis.asp>>Online. Acesso em: 20 jun. 2013.
13. NUNES; J. R. S & MIRANDA, D. B. Aspectos biológicos de *Columba livia domestica* (*Columbiformes, Columbidae*) no Campus da Universidade de Cuiabá-UNIC, Cuiabá-MT. **UNICiências**, v.14, n.1, 2010.
14. PINKERTON, H. & SWANK, R. L. Recovery of virus morphologically identical with psittacosis from thiamin-deficient pigeons. *Proc Soc Exp Biology Medical*, v. 45, p.704–706, 1940.
15. QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby-Year Book Europe Limited, London, UK., 1994.
16. R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://R-project.org.2008>>. Acesso em 19 nov. 2013.
17. RADOVČIĆ, P. E; D. HORVATEK, D.; GOTTSTEIN, Z.; GROZDANIĆ, I. C.; MAZIJA, H. Epidemiological investigation of *Chlamydomphila psittaci* in pigeons and free-living birds in Croatia. **Veterinary Research Communications**, v. 29, Issue 1 Supplement, p. 17-21, 2005.
18. RASO, T. F. Clamidiose. In: CUBAS, Z. S; SILVA, J. C. R; CATÃO DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**, São Paulo: Roca, cap. 47, p. 760-767, 2007.

19. RASO, T. F.; SEIXAS, G. H.; GUEDES, N. M.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, n.2-4, p. 235-241, 2006.
20. RUPLEY, A. E. **Manual de Clínica Aviária**. São Paulo: Roca, p. 598, 1999.
21. SACHSE, K., HOTZEL, H. Detection and differentiation of chlamydiae by nested PCR. **Methods Molecular Biology**, v.216, p. 123–136, 2003.
22. TOMIĆ, H. D.; LAROUCAU, K.; RADOVČIĆ, P. E. Detection *Chlamydophila psittaci* of genotypes in fecal samples of homing pigeons in Croatia, **Veterinarski Arhiv**, v.83, p. 201-209, 2013.
23. TRAVNICEK, M.; CISLAKOVA, L.; DEPTULA, W.; STOSIK, M.; BHIDE, M. R. Wild pigeons and pheasants, a source of *Chlamydophila psittaci* for human and animals. **Annual Agricultural Environmental Medicine**, v. 9, p. 253-255, 2002.
24. TREVEJO, R. T.; CHOMEL, B. B.; KASS, P. H. Evaluation of the polymerase chain reaction in comparison with other diagnostic methods for the detection of *Chlamydia psittaci*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 491-496, 1999.
25. VANROMPAY, D.; ANDERSEN, A.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Serotyping of European isolates of *Chlamydia psittaci* from poultry and other birds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31. p.134–137, 1993.
26. VÁZQUEZ, B.; ESPERÓN, F.; NEVES, E.; LOPEZ, J.; BALLESTROS, C.; MUNOZ, M. J. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, p.1-6, 2010.

CAPÍTULO 3- DETECÇÃO DA *Chlamydophila psittaci* EM AMOSTRAS DE SUABES TRAQUEAIS E CLOACAIS EM GALLIFORMES DA REGIÃO CENTRO-SUL DO ESTADO DE GOIÁS

RESUMO: O presente estudo foi desenvolvido com os objetivos de avaliar a frequência de *Chlamydophila psittaci* em 300 amostras de suabes traqueais e cloacais de frangos de corte, em 240 amostras de perus e 240 amostras de galinhas caipiras da região centro-sul do Estado de Goiás. As amostras foram analisadas por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Nenhuma das 300 amostras analisadas dos frangos de corte e 240 amostras dos perus foi positiva. Das 240 amostras de galinhas caipiras, 17,5% (42/240) foram positivas para *C. psittaci*, sendo que, 8,3% (20/240) foram positivas tanto para suabes de traqueias quanto para suabes de cloacas, 6,7% (16/240) das aves positivas apenas para suabes de traqueias e 2,5% (6/240) das aves positivas apenas para suabes de cloacas. Conclui-se que dentre as espécies de aves que compuseram este estudo, somente as galinhas caipiras podem ser apontadas como portadoras inaparentes de clamidiose.

Palavras chave: Frango de corte, galinhas caipiras, perus, PCR, zoonose

CHAPTER 3 – MOLECULAR DETECTION OF *Chlamydophila psittaci* IN TRACHEAL AND CLOACAL SWABS FROM GALLIFORMES FROM THE CENTRAL-SOUTHERN REGION OF STATE OF GOIÁS

ABSTRACT: This study was developed in order to assess the frequency of *Chlamydophila psittaci* in 300 samples of tracheal and cloacal swabs from broilers, 240 samples from turkeys and 240 samples from free-range chickens from the center-southern region of the state of Goiás. The samples were analyzed by polymerase chain reaction (PCR). None of the 300 samples analyzed from broilers and 240 samples from turkeys was positive. Of the 240 samples from free-range chickens, 17,5% (42/240) were positive for *C. psittaci*, being 8,3% (20/240) positive trachea and cloacal swabs, 6,7% (16/240) positive trachea swabs only and 2,5% (6/240) positive cloaca swabs only. In conclusion, among the bird species that composed this study, only free-range chickens can be identified as unapparent carriers of chlamydiosis.

Keywords: Broiler, free-range chickens, turkeys, PCR, zoonosis

1 INTRODUÇÃO

A clamidiose aviária é de grande importância para saúde animal e humana. É causada pela *Chlamydophila psittaci*, oriunda de aves silvestres e acomete as aves domésticas como galinhas e perus (GAEDE et al., 2008). Portanto, o acesso de aves silvestres em criações avícolas comerciais deve ser evitado (RASO, 2004). No homem, pode causar infecção respiratória decorrente de contato direto ou indireto com aves infectadas, particularmente psitacídeos, pombos, perus ou patos (HINTON et al., 1993).

Poucos são os estudos em relação a criações de subsistência, de acordo com o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), são realizadas apenas controles eventuais nos estabelecimentos avícolas produtores de ovos comerciais, de galinhas de subsistência, de exploração de outras espécies de aves e de criação de aves exóticas e selvagens (BRASIL, 1994).

Relatos sobre surtos de *C. psittaci* em granjas ou relatórios sobre transmissões zoonóticas ligadas ao contato com galinhas infectadas por este agente etiológico também são raros (GAEDE et al., 2008). No estado de Goiás não foi encontrada na literatura consultada nenhuma pesquisa sobre este tema em galinhas e perus.

Surtos de clamidiose já foram relatados em criações industriais de aves na América do Norte (GRIMMS et al., 1991, NEWMAN et al., 1992) e Europa, bem como na China (NI et al., 1996), Índia (CHAHOTA, et al., 2000), e Austrália (TIONG, et al., 2007). Já foram constatadas evidências de infecções humanas por clamidiose associadas às criações de perus e patos comerciais na Bélgica (BEECKMAN et al., 2009; LAROUCAU, et al., 2009). A prevalência desse agente zoonótico no Brasil é subestimada em animais e humanos, principalmente pela ausência de testes e reagentes comerciais padronizados. Conforme RASO (2004) poucos são os relatos de casos clínicos e estudos de clamidiose em aves no País.

O contágio desse agente ocorre quando o indivíduo entra em contato com animais portadores, secreções, dejetos ou produtos derivados contaminados, como ocorre em aviários, granjas e abatedouros, com presença de penas ou outros produtos de aves (NASPHV, 2010). O estresse causado por

superpopulação, higiene precária, alimentação deficiente, alterações ambientais, transporte ou infecções concomitantes pode ativar uma infecção latente, resultando na manifestação clínica da doença e eliminação de corpos elementares infectantes (RASO, 2007).

A identificação de *Chlamydophila* spp. pode ser realizada utilizando-se testes sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e para o diagnóstico da clamidiose animal a partir de amostras de campo pode ser realizado por métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida da análise de polimorfismo de fragmentos amplificados, submetidos à digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP), PCR e sequenciamento e PCR em tempo real (VANROMPAY et al., 1997; GEENS et al., 2005).

Com base no exposto, objetivou-se estimar, por meio de PCR, a frequência de *C. psittaci* em amostras de suabes traqueais e cloacais de frangos de corte, perus e em galinhas caipiras domésticas da região centro-sul do Estado de Goiás.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram coletados no total, 300 amostras de suabes traqueias e cloacais de frangos de corte oriundos de 18 municípios, em três abatedouros diferentes de inspeção estadual de Goiás. Complementando a pesquisa, foram coletados 240 suabes de traqueias e 240 suabes cloacais de perus e, os 120 suabes de traqueias e cloacas em galinhas caipiras de pequenos proprietários e feiras da região Centro-Sul do Estado de Goiás.

As aves foram contidas manualmente, feitos os suabes de cloaca e suabes de traqueia que eram armazenados em embalagens separadas, lacradas, devidamente identificadas e armazenadas em caixa térmica com gelo em gel e encaminhadas ao Laboratório de Pós-Graduação da EVZ/UFG, para imediato processamento.

2.2 Local das análises

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário da Pós-Graduação e no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG), entre os meses de fevereiro a junho de 2014.

2.2 Reação em cadeia da polimerase

2.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA dos suabes traqueais e cloacais foi realizada segundo LAUERMAN (1998). Cortou-se parte do algodão de cada suabe com lâminas de bisturi estéreis, colocou-se em um tubo plástico estéril de 1,5 mL com 600 µL de PBS e em seguida foram agitados em vórtex por um minuto. Foram

transferidos 240 µL desta solução para cada tubo de plástico esterizado com 10 µL de dietiltreitol (DTT) a 50%, previamente preparado e armazenado a -70°C. Em seguida, as amostras foram submetidas a 95°C por 10 minutos, posteriormente 100 µL desta solução foram passados para outro tubo plástico esterizado de 1,5 mL, sendo adicionados 100 µL de clorofórmio, seguido novamente de agitação em vórtex por 30 segundos. Seguidamente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por dois minutos. A solução superior de cada amostra foi aliquoteada e armazenada em tubo plástico esterizado de 0,5 mL em freezer a 70°C para utilizar na PCR.

2.2.2 Amplificação do DNA

Foram utilizadas as sequências de *primers* CPF- 5´GCAAGACACTCCTCAAAGCC-3´ e CPR 5´CCTTCCCACATAGTGCCA TC-3´ (GENEBANK) para a amplificação do DNA, referente à região do gene MOMP de *Chlamydiaceae*, amplificando produto de 264 pares de bases (pb), conforme HEWISON et al. (1997). Seguindo o protocolo proposto, para amplificação, foram preparados *mix* para PCR, com volume total de 50 µL, correspondido a 35,75 µL de água ultrapura, 5 µL de solução tampão de reação 10 x (500 Nmkl; 15 Nm MgCL2, 100 Nm Tris- HCL, pH 9,0), 2 µL de MgCL2 (50 nM), 1 µL da mistura de dNTPs (200 µM de cada nucleotídeo [dCTP, dATP, dGTP, dTTP]), 0,5 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 0,25 µL de Taq DNA polimerase e 5 µL da amostra de DNA extraído.

Após a distribuição do *mix* e adição das amostras nos tubos plásticos esterilizados (*Eppendorf*[®], Alemanha), estes foram transferidos ao termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*), programado para um ciclo de 94°C por três minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e um ciclo final de 72°C por 45 segundos para extensão.

Como controle positivo da reação, foi utilizado DNA extraído, seguindo o mesmo protocolo das amostras, a partir de vacina comercial para gatos (Fel-O-Vax[®]Lv-K IV+Calicivax/owa, EUA. Como controle negativo utilizou-se água ultrapura.

2.2.3 Evidenciação dos produtos amplificados

Para a evidenciação dos produtos amplificados, as amostras foram inoculadas em gel de agarose a 1,2% em tampão tris-borato-EDTA (TBE) (TRIS 1M; Ácido bórico 0,83 M; EDTA 20 mM) e utilizado o marcador molecular de 100 pb. Foram submetidas à eletroforese sobre 90V, por cerca de uma hora e 20 minutos e corados por 10 minutos com brometo de etídio.

A análise e visualização das bandas foram feitas com auxílio do transiluminador (*Eletronic UV Transilluminator, Ultra-Lum*). As bandas que apresentaram aproximadamente 264 pb quando comparado ao marcador de peso molecular DNA (Ladder 100bp, Gibco BRL, USA) e ao controle positivo, foram consideradas positivas.

2.3 Análise estatística

Utilizou-se da análise de frequências relativas e absolutas para avaliar os resultados obtidos. Foram utilizados o coeficiente Kappa para avaliação estatística da concordância dos resultados de suabes de traqueias e cloacas positivos. Adotou-se nível de significância de 5% e utilizou-se o *Software R*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto as amostras de suabes traqueais como cloacais de frangos de corte e perus apresentaram resultados negativos para *Chlamydophila psittaci*. Tais resultados diferem dos dados de DICKX et al. (2010), que encontraram 85% (11/13) de frangos de corte positivos e taxas de infecção nos perus de 57% (4/7) positivos antes do abate na Bélgica e de VAN LOOCK et al. (2005) que também encontraram 37% de perus positivos, apesar do presente estudo ter uma amostragem mais consistente, não foi encontrado nenhuma amostra positiva.

Esses achados em frangos e perus não indicam que a monitoria em aves de produção, principalmente ao abate, não deva ser incrementada, já que o patógeno apresenta excreção intermitente (VANROMPAY et al., 2007). Também há a presença de portadores inaparentes de aves de vida livre na região, que dividem o mesmo ecossistema (HIDASI, 2010). Além disso, os manipuladores de aves, principalmente em abatedouros são os indivíduos de maior contato, o que pode ser respaldado por DICKX et al. (2010) os quais, afirmaram que os funcionários da área de recepção de frangos de corte, são os mais expostos a essa infecção, devido à maior excreção de corpos elementares de *C. psittaci* pelo estresse do transporte. Outro importante fator seria durante evisceração, já que os sacos aéreos e os pulmões infectados são expostos para o ambiente. Também foi observado por TIONG et al. (2007) em análise de um surto de clamidiose em um abatedouro de aves.

Em relação às galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*), foram encontradas 17,5% (42/240) de aves positivas (Figura1). As aves não apresentavam sintomas clínicos da enfermidade, também, nas condições experimentais a campo, foi possível apenas uma coleta por galinha e segundo RASO (2004) deve-se coletar amostras durante dois ou três dias consecutivos para garantir que a ave estará ou não eliminando o agente infeccioso naquele período. Outros motivos podem colaborar com os resultados falso-negativos, como citado, em infecções por *C. psittaci* há excreção intermitente do corpo elementar, particularmente em aves assintomáticas (HARKINEZHAD et al., 2009; VÁZQUEZ et al., 2010), também as amostras podem sofrer inibição devido ao tratamento das aves com antibióticos (GAEDE et al., 2008). As amostras fecais ou

suabes cloacais, as fezes contêm também grande quantidade de compostos metabólicos e fenólicos, tais como fenol, metil, ácidos fenólicos, uréia, bilirrubina, ácidos biliares e polissacarídeos que podem ser inibidores para a PCR (SAREYYUPOGLU et al., 2007).

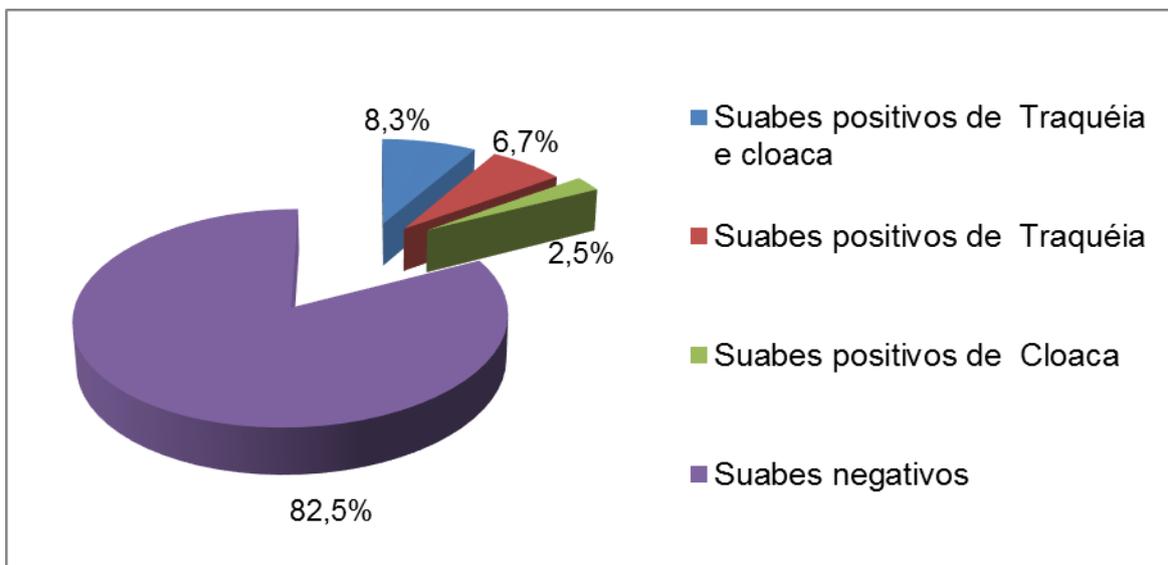


FIGURA 1 - Percentual de amostras positivas de *C. psittaci* em galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*).

Foi encontrado 8,3% (20/240) galinhas positivas para suabes de traqueias e cloacas, o que sugere que estas aves estavam na fase infectante da doença. Sendo 6,7% (16/240) de aves positivas apenas nas amostras de traqueias. Nas infecções primárias iniciais, a *C. psittaci* é a mais facilmente detectada em amostras provenientes da traqueia e/ou orofaringe, visto que o sistema respiratório superior é o local de instalação primária do agente (BEER, 1988; RASO, 2007). A detecção da maior frequência em suabes de traqueia pode ser respaldado em HARKINEZHAD et al., (2009) os quais relataram que amostras coletadas na orofaringe/traqueia são mais indicadas para o diagnóstico de *C. psittaci* em relação ao suabe fecal, particularmente durante estágios iniciais da infecção.

A porcentagem de 2,5% (6/240) de amostras positivas de suabes cloacais pode ser explicada pelo fato da maioria das aves não estarem eliminando o agente no momento da coleta, pois, a eliminação pelas fezes ocorre após a

replicação bacteriana primária no trato respiratório e septicemia. É comum estas aves serem tratadas com antibiótico de amplo espectro para prevenirem doenças respiratórias nas explorações avícolas, também pode interferir na detecção da clamídia como destacado por GUERLACH (1994). Devido à excreção intermitente do corpo elementar, animais assintomáticos podem não eliminar o agente por mais de um ano por essa via (VANROMPAY et al., 2007), que é característica de aves cronicamente infectadas (VÁZQUEZ et al., 2010).

Comparando o valor do coeficiente de Kappa calculado ($K=0,59$), para verificar o grau de concordância entre os resultados dos suabes de cloaca e traqueia, pode-se concluir que houve moderada concordância significativa entre os achados dos suabes de traqueia (16/240), em comparação aos suabes de cloacas positivos (6/240), conforme mostrado na Tabela 1.

TABELA 1- Valores estatísticos do coeficiente Kappa da pesquisa de *Chlamydophila psittaci* em suabes de traqueia e cloaca em galinhas caipiras da região Centro-Sul do Estado de Goiás.

Suabes de traqueias	Suabes de cloacas		Valor de kappa ¹	Valor de P ²
	positivos	negativos		
positivos	20	16	K=0,59	P< 0,001
negativos	6	198		

¹Quanto menor o valor de Kappa, maior o comprometimento desta estatística (K<0 sem concordância; K=0 nula; K=0-0,39 pouca; K=0,40-0,59 moderada; K=0,60-0,79 relevante; K=0,80-1,00 perfeita concordância)

²Indica o valor máximo de estatística p em relação ao nível de significância estabelecido, p=0,05.

Esses dados confirmam a importância de associar as coletas tanto de amostras de traqueias como de cloacas na mesma ave para que aumente a possibilidade de diagnóstico da clamidiose, pois o animal pode estar na fase subaguda ou crônica da doença. Assim, saber o local de eliminação desse agente etiológico se faz importante em relação ao sítio de coleta preferencial de acordo com o tempo pós-exposição (ANDERSEN, 1996) e da existência de casos assintomáticos (GERLACH, 1994; RASO et al., 2006).

O monitoramento preciso de diagnóstico e notificações de infecções tanto em aves como em profissionais da área devem ser promovidos.

Adicionalmente, medidas preventivas de saúde pública e campanhas de conscientização para que tanto profissionais da saúde como a população tenham conhecimentos básicos sobre a doença, sua prevenção e formas de tratamento (DICKX et.al., 2010). Pois de forma geral, indivíduos com ocupações associadas a aves de produção comercial ou aquele com contato de rotina com aves silvestres ou criações domésticas têm maiores riscos de contraírem a infecção além dos profissionais de laboratórios de diagnósticos moleculares.

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que os frangos de corte e os perus estudados na região Centro-Sul do Estado de Goiás encontram-se livres de infecção por *Chlamydophila psittaci*. Galinhas caipiras comercializadas em feiras livres e criadas soltas são portadoras do patógeno.

5 REFERÊNCIAS

1. ANDERSEN, A.A. Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p.448-450, 1996.
2. BEECKMAN, D. S.; VANROMPAY, D. C. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. **Clinical Microbiology Infection**, cap. 15, p.11–17, 2009.
3. BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**, v. 1. São Paulo: Roca, p. 390-398, 1988.
4. BRASIL. PROGRAMA NACIONAL DE SANIDADE AVÍCOLA. Atos legais. Portaria Ministerial 193. **Diário oficial da república Federativa do Brasil**, Poder executive, Brasília, DF, 19 de setembro de 1994.
5. CALNEK, B.W.; JOHN, B.H.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YODER, H.W. **Diseases of Poultry**, ninth edition, *Chlamydiosis* (Ornithosis), cap. 14, p.311-25, 1991.
6. CHAHOTA, R.; KATOCH, R. C; SINGH, S. P; VERMA, S; MAHAJAN, A. Concurrent outbreak of chlamydiosis and aflatoxicosis among chickens in Himachal Pradesh, India. **Veterinarski Arhiv**, cap.70, p.207–213, 2000.
7. DICKX, V; GEENS, T; DESCHUYFFELEER, T; TYBERGHIEN, L; HARKINEZHAD, T; BEECKMAN, D. S. A; BRAECKMAN, L; VANROMPAY, D. *Chlamydophila psittaci* Zoonotic Risk Assessment in a Chicken and Turkey Slaughterhouse. **Journal of Clinical Microbiology**, cap.48, v.9, p.3244, 2010.
8. GAEDE, W.; RECKLING, K. F.; DRESENKAMP, B.; KENKLIES, S.; SCHUBERT, E.; NOACK, U.; IRMSCHER, H.M.; LUDWIG, C.; HOTZEL, H.; SACHSE, K. *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. **Zoonoses Public Health**, v.55, n.4, p. 184–188, 2008.
9. GEENS, T.; DESPLANQUES, A.; VAN LOOCK, M.; BONNER, B. M.; KALETA, E. F.; MAGNINO, S.; ANDERSEN, A. A.; EVERETT, K. D. E.; VANROMPAY,

- D. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. **Journal of Clinical Microbiology**, p.43, n. 5, p. 2456–2461, 2005.
10. GERLACH, H. **Chlamydia**. In: RICHIE, B.W. **Avian medicine: principles and application**. Florida: Wingers, p. 984-996, 1994.
 11. GRIMES, J. E., AND P. B. WYRICK. CHLAMYDIOSIS (ORNITHOSIS), IN B. V. V. CLENK, H. J. BARNES, C. W. BEARD, W. M. REID; H. W. YODER (ed.), **Diseases of poultry**. Iowa State University Press, Ames, IA, p. 311–325, 1991.
 12. HARKINEZHAD, T.; GEENS, T.; VANROMPAY, D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p.68-77, 2009.
 13. HEWINSON, G. L.; GRIFFITHS, P. C.; BEVAN, B. J.; KIRWAN, S. E. S.; FIELD, M. E.; WOODWARD, M. J.; DAWSON, M. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 155–156, 1997.
 14. HIDASI, I. W. **Detecção de Enterobacteriaceae e Chlamydophila spp. em psitacídeos de animais selvagens de Goiás**. 62f. Goiânia, 2010. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2010.
 15. HINTON, D. G.; SHIPLEY, A.; GALVIN, J. W. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. **Aust. Veterinary Journal**, v.70, p.174-176, 1993.
 16. LAROUCAU, K.; VORIMORE, F.; AAZIZ, R.; BERNDT, A.; SCHUBERT, E; SACHSE, K. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. **Infection, Genetics and Evolution**, cap.9, p.1240–1247, 2009.
 17. LAUERMAN, L. H. **Nucleic acid Amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Washington: Library of congress cataloging in publication data. p.152, 1998.
 18. NASPHV – NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. **Compendium of measures to control Chlamydophila psittaci infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian**

- chlamydiosis**). 2010. Disponível em: <<http://avma.org/pubhlth/psittacosis.asp>>. Online. Acesso em: 10 dez. 2013.
19. NEWMAN, C.P.ST.J.; PALMER, S. R.; KIRBY, F. D.; CAUL, E. O. A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. **Epidemiology and Infection**, cap.108, p.203-210, 1992.
20. Ni, A. P., G. Y. Lin, L. Yang, H. Y. He, C. W. Huang, Z. J. Liu, R. S. Wang, J. S. Zhang, J. Y. Yu, N. Li, J. B. Wang; H. Y. Yang. A seroepidemiologic study of *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* in different populations on the mainland of China. **Scand. Journal of Infectious Diseases**, cap.28, p.553–557, 1996.
21. R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://R-project.org.2008>>. Acesso em 19 nov. 2013.
22. RASO, T. F. ***Chlamydophila psittaci* em psitacídeos de vida livre e cativo e suas implicações à saúde pública**. 2004. Tese (Doutorado). Área de concentração: Patologia animal. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, São Paulo-SP.
23. RASO, T. F.; SEIXAS, G. H.; GUEDES, N. M.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, n.2-4, p. 235-241, 2006.
24. RASO, T. F. Clamidiose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, cap. 47, p. 760-767, 2007.
25. RASO, T. F. Clamidiose. In: CUBAS, Zalmir S.; SILVA, Jean C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (org.). **Tratado de animais selvagens**, São Paulo: Roca, cap. 47, p. 760-767, 2007.
26. SAREYYUPOGLU, B; CANTEKIN, Z.; BAS, B. *Chlamydophila psittaci* DNA Detection in the Faeces of Cage Birds. **Zoonoses and Public Health**, v. 54, p. 237-242, 2007.

27. TIONG, A. T. VU.; COUNAHAN, M.; LEYDON, J.; TALLIS, G.; LAMBERT, S. Multiple sites of exposure in an outbreak of ornithosis in workers at a poultry abattoir and farm. **Epidemiology and Infection**, cap.135, p.1184–1191, 2007.
28. VAN LOOCK, M.; VERMINNEN, K.; MESSMER, T. O.; VOLCKAERT, G.; GODDEERISBM; VANROMPAY, D. Use of a nested PCR-enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydophila psittaci* in turkeys. **BMC Infectious Diseases**, cap.5, p.76, 2005.
29. VANROMPAY, D.; BUTAYE, P.; VAN NEROM, A.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poults. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.85–93, 1997.
30. VANROMPAY, D.; HARKINEZHAD, T.; WALLE, M. V.; BEECKMAN, D.; DROOGENBROECK, C. V.; VERMINNEN, K.; LETEN, R.; MARTEL, A.; KATTY CAUWERTS, K. *Chlamydophila psittaci* transmission from Pet Birds to Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1108-1110, 2007.
31. VAZQUEZ, B.; ESPERON, F.; NEVES, E.; LOPEZ, J., BALLESTEROS, C.; MUNOZ, M. J. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica** v.52, p.45, 2010.

CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

C. psittaci é ainda subestimada pelos profissionais da saúde, observa-se, portanto, que a eficácia das medidas no controle da doença é prejudicada pela extensa variedade de espécies hospedeiras, elevada incidência de infecções persistentes e portadores inaparentes.

Os principais grupos de risco para a clamidiose são indivíduos com contato próximos de aves, como proprietários de aves de companhia, trabalhadores em criação de aves comerciais e/ou em linhas de processamento de carne, indivíduos que trabalham em lojas que comercializam aves e médicos veterinários, ou seja, é uma doença ocupacional de grande importância para saúde pública.

Frente à escassez de pesquisas realizadas em *Columbiformes* no País e no Estado de Goiás, este foi o primeiro estudo neste Estado, sobre clamidiose em *Galliformes*, porém, novos estudos são necessários para determinar o real risco que pombos domésticos podem representar quanto à transmissão de patógenos para outras espécies, como os frangos de corte, perus e galinhas caipiras, pois, podem ser portadores inaparentes desta doença.

C. psittaci foi detectada em pombos domésticos e galinhas caipiras na região Centro-Sul do Estado de Goiás, sendo preocupante os riscos que podem representar para saúde desta população. O fato de não ser detectada a presença deste agente nas amostras de suabes cloacais e traqueais de frangos de corte e perus, não isenta de continuar a manter o rigor no controle sanitário nas criações destas espécies na região. Portanto, estudos epidemiológicos são necessários para elucidação do real risco que os *Columbiformes* sinatrópicos representam quanto a disseminação deste agente. É muito importante não subestimar esta doença nas aves e nos humanos, pois caracteriza-se uma zoonose de alto poder de infecção em várias espécies animais, dificultando assim, o seu diagnóstico e controle.

Utilizar o teste molecular (PCR) pode ser indicado para o diagnóstico deste agente, pois, proporciona uma alternativa mais rápida, específica e sensível para identificação de infecção por *C.psittaci* em amostras a campo. Outra vantagem é que não necessita do agente vivo ou em grande quantidade. A

escolha das amostras em aves também é relevante, por isso, obter suabes tanto de traqueia como de cloaca é de extrema importância para contribuir no diagnóstico deste agente, pois, aumenta a possibilidade de investigação não apenas para saber em que fase de infecção o animal se encontra, como também para prevenir falsos diagnósticos.

A ausência de monitoria constante e de medidas de biossegurança nos sistemas de produção de galinhas de subsistência e de outras espécies de aves de produção, bem como aves exóticas ou selvagens, pode representar uma ameaça a sanidade avícola industrial, uma vez que, esses animais servem como reservatórios de patógenos, mantendo-os no meio ambiente. Por isso, observa-se a importância da fiscalização na produção animal, controle do acesso de outras aves nas granjas e a necessidade de implantação de programas de vigilância sanitária nesses sistemas de produção. Quanto às produções domésticas de galinhas, comercializadas nas feiras livres do Estado de Goiás, isenta de qualquer controle sanitário, podem oferecer um risco para a saúde de outras espécies animais e aos humanos, por serem também, possíveis portadoras da clamidiose aviária.

ANEXO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Goiânia, 31/10/2011

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA,
PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O Nº: 080/11

I – Identificação

- **Título do projeto:** *Salmonella* Sp. e *Mycoplasma* Spp. em Cathartiformes e Columbiformes de vida livre próximos a explorações comerciais avícolas.
- **Pesquisador Responsável:** Hilari Wanderley Hidasí
- **Pesquisadores participantes:** Valéria de Sá Jayme, Maria Auxiliadora Andrade, Guido Fontgalland Coelho Linhares
- **Instituição onde será realizado o estudo:** EVZ / UFG
- **Data de apresentação ao CEP/UFG:** 14/03/2011

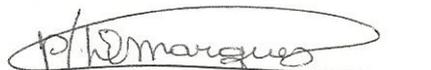
II – Parecer do CEP

- Tendo sido esclarecidas todas as solicitações quanto ao destino das aves capturas, tempo de permanência junto ao Núcleo Experimental de Doenças de Aves / EVZ / UFG, assim como seu destino ao término do período experimental, considero o projeto APROVADO, s.m.j. deste comitê.

III – Data da reunião: 31 / 10 / 2011

Assinatura do(a) relator(a):

Assinatura do(a) Coordenador(a)/ CEP/UFG:


Prof. João Batista de Souza
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFG