

Detecção e classificação molecular de *Chlamydophila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas

[*Detection and molecular characterization of Chlamydophila psittaci in asymptomatic birds*]

M.A. Braz, D.C. Silva, M.E.B. Santiago, S.D. Garcia, A.A. Nakamura, M.V. Meireles*

Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária – Araçatuba, SP

RESUMO

Chlamydophila psittaci é uma bactéria que causa doença respiratória ou sistêmica em aves e em seres humanos. Em vista do risco de transmissão para humanos, o objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Chlamydophila* spp. em amostras de fezes ou suabes cloacais de aves assintomáticas. Foram colhidas 403 amostras fecais ou suabes cloacais, provenientes de aves domésticas, selvagens ou exóticas. As amostras foram submetidas à PCR em tempo real para *C. psittaci*, para amplificação de fragmento parcial do gene da subunidade 16S do rRNA, utilizando o SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) e análise da curva de dissociação. Para determinação do genótipo de *C. psittaci*, foi usada a hemi-nested PCR visando à amplificação de fragmento parcial do gene OMP-A, realizada nas amostras positivas pela PCR em tempo real, seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados. A PCR em tempo real revelou positividade em 17 (4,21%) amostras. A hemi-nested foi positiva em 2 amostras positivas pela PCR em tempo real. O genótipo A de *C. psittaci* foi identificado pelo sequenciamento de uma amostra amplificada pela hemi-nested PCR. Os resultados deste experimento demonstram que a PCR em tempo real, visando à amplificação de fragmento parcial da subunidade 16S do rRNA, seguida da análise da curva de dissociação, pode ser utilizada para detecção de DNA de *Chlamydophila* sp. em amostras fecais de aves assintomáticas. A classificação da espécie de *Chlamydophila* e do genótipo de *C. psittaci* deve ser realizada por meio de PCR tendo como alvo o gene ompA e sequenciamento dos fragmentos amplificados.

Palavras-Chave: aves, psitacose, diagnóstico molecular, zoonoses

ABSTRACT

Chlamydophila psittaci is a bacterium that causes respiratory or systemic disease in birds and humans. Owing to the risk of transmission from asymptomatic birds to humans, the objective of this study was to detect the presence of *Chlamydophila* spp. in asymptomatic birds. Four hundred and three fecal samples or cloacal swabs were collected from domestic, wild or exotic birds. The 403 samples were examined by real time PCR specific for the 16S subunit of rRNA gene using SsoFastEvaGreen®Supermix™ (Bio-Rad) and melting curve analysis. Hemi-nested PCR specific for the OMP-A gene, accomplished in real-time PCR positive samples, was followed by sequencing of the amplified fragments to determine the genotype of *C. psittaci*. Real-time PCR was positive in 17 (4.21%) samples. Hemi-nested PCR revealed positivity in two samples previously positive by real-time PCR. Sequencing of the fragment amplified by hemi-nested PCR allowed for the identification of genotype A of *C. psittaci* in one sample. The results of this experiment show that the real-time PCR targeting the 16S rRNA gene followed by melting curve analysis can be used for diagnosis of *Chlamydophila* sp. in fecal samples of asymptomatic birds. The classification of the *Chlamydophila* species and the genotype of *C. psittaci* must be accomplished by PCR targeting the ompA gene and sequencing of the amplified fragments.

Keywords: birds, psittacosis, molecular diagnostic, zoonoses

Recebido em 31 de outubro de 2012

Aceito em 17 de julho de 2013

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: marcelo@fmva.unesp.br

INTRODUÇÃO

Considerada como uma das principais zoonoses aviárias (Proença *et al.*, 2011), a infecção por *Chlamydophila psittaci* é caracterizada por doença respiratória ou sistêmica em aproximadamente 465 espécies de aves (Kaleta e Taday, 2003). No homem, é responsável por infecção respiratória decorrente de contato direto ou indireto com aves infectadas, particularmente psitacídeos, pombos, perus ou patos (Hedberg *et al.*, 1989; Hinton *et al.*, 1993).

A transmissão da clamidiose ocorre por meio de inalação do agente em suspensão, após contato direto ou indireto com fezes, penas ou secreções respiratórias, embora a infecção oral seja uma rota alternativa e importante em aves (Shewen, 1980). Aves portadoras assintomáticas apresentam períodos intermitentes de excreção de pequena quantidade da bactéria; a reativação da eliminação é favorecida por fatores, como estresse, subnutrição, extremos de temperatura e cativeiro (Harkinezhad *et al.*, 2009).

A infecção por *C. psittaci* em humanos pode ser assintomática ou apresentar sintomatologia inespecífica, principalmente relacionada ao trato respiratório (Stewardson e Grayson, 2010). Indivíduos com ocupações associadas às aves comerciais ou de companhia são considerados como grupo de risco para infecção por *C. psittaci* (Miller *et al.*, 1987).

A identificação de *Chlamydophila* spp. pode ser realizada utilizando-se testes sorológicos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), e métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida da análise do 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.*, 2005a).

C. psittaci atualmente é constituída por sete genótipos aviários (A, B, C, D, E, F e E/B) e dois genótipos não aviários (M56 e WC). A determinação do genótipo de *C. psittaci* é realizada por meio de análise da sequência de nucleotídeos do gene que codifica a proteína da parede externa (ompA) (Geens *et al.*, 2005b).

Tendo em vista o risco de transmissão para humanos a partir de aves assintomáticas, o objetivo deste trabalho foi detectar *C. psittaci* em amostras de fezes e de suabes cloacais de aves assintomáticas, por meio da PCR em tempo real e, posteriormente, nas amostras positivas, identificar o genótipo de *C. psittaci* por meio da *hemi-nested* PCR seguida de sequenciamento do fragmento amplificado.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – da FOA/UNESP em 17/11/2010, de acordo com o protocolo 2010-008742.

As amostras foram provenientes de aves assintomáticas de um criatório de psitacídeos (57) e de dois zoológicos municipais (183), no estado de São Paulo, e de aves selvagens apreendidas e encaminhadas ao Centro de Triagem e Recuperação de Animais Silvestres (CERETAS), da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba (163). As aves pertencem às ordens Accipitriformes, Anseriformes, Caprimulgiformes, Charadriiformes, Galiiformes, Gruiformes, Passeriformes, Piciformes, Psitaciformes e Strigiformes (Tab. 1).

Tabela 1. Amostras positivas para *Chlamydophila* sp. pela PCR em tempo real

| Ordem | Número de amostras | Amostra positivas |
|------------------|--------------------|-------------------|
| Psitaciformes | 348 | 16 |
| Piciformes | 18 | 1 |
| Gruiformes | 3 | - |
| Anseriformes | 12 | - |
| Passeriformes | 11 | - |
| Accipitriformes | 2 | - |
| Strigiformes | 3 | - |
| Galliformes | 2 | - |
| Charadriiformes | 3 | - |
| Caprimulgiformes | 1 | - |
| Total | 403 | 17 |

Foram colhidas 403 amostras, sendo que 199 correspondiam a suabes cloacais e 204 eram amostras fecais. As amostras fecais foram colhidas imediatamente após a defecação e, logo após a colheita, foram armazenadas em

Detecção e classificação...

temperatura ambiente, por no máximo uma semana, em microtubos de 2,0mL contendo o tampão L6 (Triton X100 1%, Tris-Cl pH 6,4 0,1 M, isotiocianato de guanidina 4 M); os swabes cloacais foram congelados a -20° C. A extração de DNA genômico de *Chlamydophila* foi realizada de acordo com Silva *et al.* (2010).

A PCR em tempo real para amplificação de um fragmento de 151 pb da subunidade 16S do rRNA de *C. psittaci* foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores CpPsSSfor e CpPsSSrev, descritos por Geens *et al.* (2005a) (Tab. 2). A reação foi padronizada por meio de determinação da curva de regressão padrão,

utilizando como DNA um fragmento de 818 pb da subunidade 16S do rRNA de *C. abortus* cepa S23/3 (gentilmente cedido pela Professora Tânia de Freitas Raso, da FMVZ-USP), amplificado por meio de PCR convencional com os oligonucleotídeos iniciadores 16SFor e 16SRew (Tab. 2), que foram elaborados com utilização do software *Primer Blast*. O DNA de *C. abortus* foi utilizado para determinação da curva padrão pelo fato de que não havia disponibilidade de DNA de *C. psittaci* e porque, em avaliação prévia, apresentou amplificação positiva pela PCR em tempo real com utilização dos oligonucleotídeos iniciadores CpPsSSfor e CpPsSSrev.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR convencional, na etapa de padronização da PCR em tempo real, e na PCR em tempo real e hemi-*nested* PCR, utilizadas para detecção ou classificação molecular de *Chlamydophila* em amostras fecais

| Reação | Oligonucleotídeos iniciadores | Sequência 5'-3' | Referência | Gene-alvo | Produto amplificado (pb) |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|--------------------------|
| PCR convencional | 16SFor | GACGGTTTGACTAGGTTGGGCAAGC | este experimento | 16S rRNA | 818 |
| | 16SRew | GGCACGCCGTCACCATGACT | | | |
| PCR em tempo real | CpPsSSfor | TTATTAAGAGCTATTGGTGGATGCC | Geens <i>et al.</i> (2005a) | 16S rRNA | 151 |
| | CpPsSSrev | AACGTATAATGGTAGATGATTAATCTACCG | | | |
| Hemi- <i>nested</i> PCR | CTU (reações primária e secundária) | ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG | Denamur <i>et al.</i> (1991) | ompA | 1097 (reação primária) |
| | Chla2 (reação primária) | CAAGCTTTTCTAGACTTCATTTTGT | este experimento | | 644 (reação secundária) |
| | Chla3a (reação secundária) | CCTAAAGTTGCACAACCACA | este experimento | | |

O fragmento amplificado pela PCR convencional foi submetido à eletroforese em gel de agarose, e o DNA foi purificado utilizando-se o QIAquick® *Gel Extraction Kit* (Qiagen) e diluído de forma seriada, na base 10, a partir de 22ng de DNA, para obtenção de seis pontos na curva de regressão. Cada diluição foi testada em triplicata.

Após padronização da curva padrão, a PCR em tempo real foi realizada em amostras de DNA proveniente de aves, nas seguintes condições: 6,4µl de água ultrapura, 10µl de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), 0,8µl de cada oligonucleotídeo iniciador (CpPsSSfor e CpPsSSrev) e 2µl de DNA-alvo. Foi utilizada desnaturação inicial de 98°C por 2 minutos, seguida de 44 ciclos de desnaturação a 95°C, por

5 segundos, e anelamento e extensão a 60°C, por 5 segundos. Após o término da amplificação, foi determinada a curva de dissociação do fragmento amplificado, com variação de temperatura de 65 a 95°C, com intervalo de 0,2°C e leitura por 10 segundos. A reação foi realizada no sistema para PCR em tempo real CFX-96 (Bio-Rad). Água ultrapura foi utilizada em lugar de DNA-molde, em reações controle negativas, e DNA de *C. abortus* foi utilizado como molde em reações-controle positivas.

Visando à identificação do genótipo de *C. psittaci*, em todas as amostras positivas pela PCR em tempo real foi realizada a amplificação de fragmentos do gene *OmpA*, utilizando a hemi-*nested* PCR com os oligonucleotídeos iniciadores

CTU (Denamur *et al.*, 1991), Chla2 e Chla3, que foram elaborados com utilização do software *Primer Blast* (Tab. 2), nas seguintes condições: volume final de 25µl de solução contendo 2,5µl de tampão para PCR 10x, 1,5mM MgCl₂, 5µg/microlitro de albumina sérica bovina não acetilada, 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5U de Taq DNA polimerase, 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo e 2,5µl de DNA-alvo. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial do DNA a 95°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 95°C por 30 segundos, 30 segundos de anelamento a 55°C e extensão a 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C, por 10 minutos. As condições foram as mesmas em ambas as reações. Como controles positivo e negativo, foram utilizadas amostras de DNA de *C. abortus* e água ultrapura, respectivamente.

O fragmento amplificado na reação secundária foi purificado utilizando-se o *kit* QIAquick® Gel Extraction (Qiagen) e sequenciado no Centro de

Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal, utilizando o “ABI Prism® DyeTerminator 3.1”, em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas duas vezes, nas duas direções, com os oligonucleotídeos iniciadores da reação secundária. Os fragmentos resultantes do sequenciamento foram comparados com sequências homólogas publicadas no *GenBank*, com auxílio do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva padrão obtida após padronização da PCR em tempo real resultou em eficiência de 95,4%, R^2 : 0,99 e *slope*: -3,4. A amostra de DNA de *C. abortus*, utilizada como controle positivo, apresentou temperatura de dissociação 83,0 a 83,2°C. A curva de dissociação do fragmento de DNA de *C. psittaci*, amplificado a partir das amostras fecais, apresentou temperatura de dissociação de 83,2 a 83,4°C (Fig. 1).

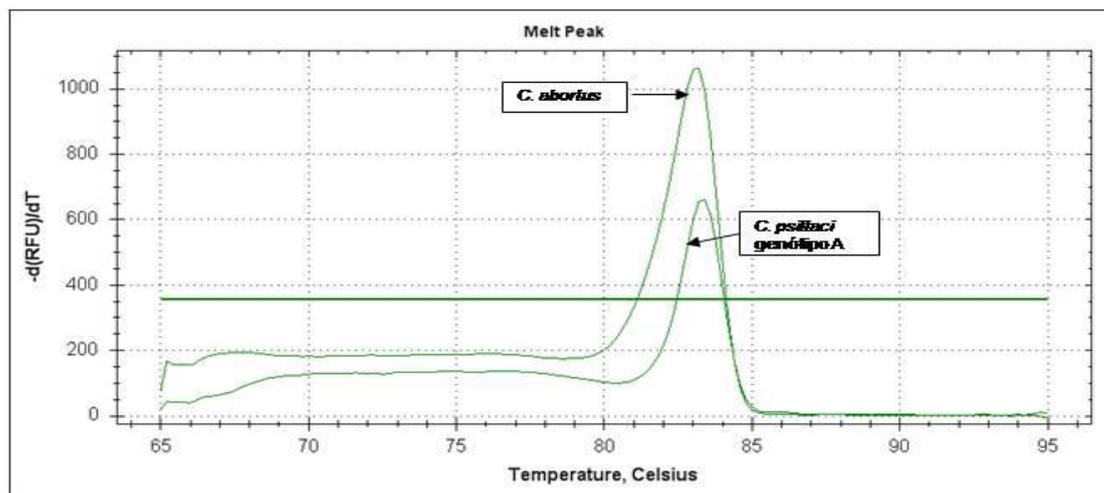


Figura 1. Curva de dissociação observada na PCR em tempo real para *Chlamydophila abortus* e *Chlamydophila psittaci*

Foi observada baixa prevalência de *Chlamydophila*, provavelmente pelo fato de que as aves não apresentavam sintomas da enfermidade e, também, porque foi possível a colheita de somente uma amostra por ave. Em infecções por *C. psittaci* há excreção intermitente do corpo elementar, particularmente em aves assintomáticas, o que favorece a ocorrência de

resultados falso-negativos (Harkinezhad *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2010).

Nas amostras positivas pela PCR em tempo real, observou-se ciclo limiar (*threshold cycle* - Ct) variando de 29,68 a 42,93. Foi observada positividade em 4,21% (17/403) das amostras, sendo 16 pertencentes a aves da ordem Psitaciformes: 12 *Nymphicus hollandicus*, duas

Tabela 4. Determinação do genótipo de *Chlamydophila psittaci* por meio de hemi-nested PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados, em amostras fecais de aves positivas pela PCR em tempo real

| Espécie | Amostras positivas pela PCR em tempo real | Amostras positivas pela hemi-nested PCR | Identificação do genótipo (número de amostras) |
|----------------------------------|---|---|--|
| <i>Amazona aestiva</i> | 2 | - | - |
| <i>Nymphicus hollandicus</i> | 12 | 2 | <i>C. psittaci</i> genótipo A (1) |
| <i>Ramphastus tucanus</i> | 1 | - | - |
| <i>Trichoglossus h. haemadus</i> | 2 | - | - |
| Total | 17 | 2 | 1 |

Geens *et al.* (2005a) relatam que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste experimento, para realização da PCR em tempo real, são específicos para *C. psittaci*, mas que também amplificam DNA de *C. caviae*, com ciclo limiar acima de 37, e não amplificam DNA de *C. abortus* ou de outras espécies de *Chlamydophila*. No entanto, neste experimento foi possível a amplificação de fragmentos de DNA de *C. abortus*, com ciclo limiar de aproximadamente 20, apesar de haver polimorfismo entre sequências de *C. abortus* e *C. psittaci*, na região de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real (Tab. 3). Dessa maneira, a possibilidade de amplificação inespecífica durante a utilização de diagnóstico molecular de infecção por *C. psittaci*, utilizando amplificação de sequências da subunidade 16S do gene rRNA, deve ser analisada com critério.

Infecção por *C. psittaci* já foi identificada em psitacídeos (Raso *et al.*, 2002; 2004; 2006) e pombos no Brasil (Lima *et al.*, 2011), sendo que algumas das amostras de psitacídeos foram identificadas como genótipo A de *C. psittaci* (Raso, 2012, FMVZ-USP, comunicação pessoal).

CONCLUSÕES

Os resultados deste experimento demonstram que a PCR em tempo real, visando à amplificação de fragmento parcial da subunidade 16S do rRNA seguida da análise da curva de dissociação, pode ser utilizada para detecção de DNA de *Chlamydophila* sp. em amostras fecais

de aves assintomáticas. A classificação da espécie de *Chlamydophila* e do genótipo de *C. psittaci* deve ser realizada por meio de PCR, tendo como alvo o gene *ompA* e sequenciamento dos fragmentos amplificados.

REFERÊNCIAS

- CHAHOTA, R.; OGAWA, H.; MITSUHASHI, Y. *et al.* Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene. *Microbiol. Immunol.*, v.50, p.663-678, 2006.
- DENAMUR, E.; SAYADA, C.; SOURIAU, A. *et al.* Restriction pattern of the major outer membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J. Gen. Microbiol.*, v.137, p.2525-2530, 1991.
- GEENS, T.; DEWITTE, A.; BOON, N. *et al.* Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet. Res.*, v.36, p.787-797, 2005a.
- GEENS, T.; DESPLANQUES, A.; VAN LOOCK, M. *et al.* Sequencing of the *Chlamydophila psittaci ompA* gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.2456-2461, 2005b.
- HARKINEZHAD, T.; GEENS, T.; VANROMPAY, D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet. Microbiol.*, v.135, p.68-77, 2009.

- HEDBERG K.; WHITE K.E.; FORFANG J.C. *et al.* An outbreak of psittacosis in Minnesota turkey industry workers: implications for modes of transmission and control. *Am. J. Epidemiol.*, v.130, p.569-577, 1989.
- HINTON, D.G.; SHIPLEY, A.; GALVIN, J.W. *et al.* Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant. *Aust. Vet. J.*, v.70, p.174-176, 1993.
- KALETA, E.F.; TADAY, E.M. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.*, v.32, p.435-461, 2003.
- LIMA, V.Y.; LANGONI, H.; SILVA, A.V. *et al.* *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.175, p.9-14, 2011.
- MILLER, C.D.; SONGER, J.R.; SULLIVAN, J.F. A twenty-five year review of laboratory-acquired human infections at the National Animal Disease Center. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, v.48, p.271-275, 1987.
- MITCHELL, S.L.; WOLFF, B.J.; THACKER, W.L. *et al.* Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v.47, p.175-181, 2009.
- OKUDA, H.; OHYA, K.; SHIOTA, Y. *et al.* Detection of *Chlamydophila psittaci* by using SYBR green real-time PCR. *J. Vet. Med. Sci.* v.73, p.249-254, 2011.
- PANTCHEV, A.; STING, R.; BAUERFEIND, R. *et al.* New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet. J.*, v.181, p.145-150, 2009.
- PROENÇA, L.M.; FAGLIARI, J.J.; RASO, T.F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Cienc. Rural*, v.41, p.841-847, 2011.
- RASO, T.F.; BERCHIERI, JR.A.; PINTO, A.A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrots in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.33, p.118-121, 2002.
- RASO, T.F.; GODOY, S.N.; MILANELO, L. *et al.* An outbreak of chlamydiosis in captive Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.*, v.35, p.94-96, 2004.
- RASO, T.F.; SEIXAS, G.H.F.; GUEDES, N.M.R. *et al.* *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. *Vet. Microbiol.*, v.117, p.235-241, 2006.
- SAREYYUPOGLU, B.; CANTEKIN, Z.; BAS, B. *Chlamydophila psittaci* DNA detection in the faeces of cage birds. *Zoon. Pub. Health*, v.54, p.237-242, 2007.
- SHEWEN, P.E. Chlamydial infection in animals: a review. *Can. Vet. J.*, v.21, p.2-11, 1980.
- SILVA, C.D.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.N. *et al.* Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. *Parasitol. Res.*, v.107, p.271-277, 2010.
- STEWARDSON, A.J.; GRAYSON, M.L. Psittacosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, v.24, p. 7-25, 2010.
- VANROMPAY, D.; BUTAYE, P.; SAYADA *et al.* Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res. Microbiol.*, v.148, p.327-333, 1997.
- VÁZQUEZ, B.; ESPERÓN, F.; NEVES, E. *et al.* Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Vet. Scand.*, v.52, p.1-6, 2010.