

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Chlamydophila psittaci E *Chlamydophila abortus* EM
AVES ASSINTOMÁTICAS**

Maria Amador Braz
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Chlamydophila psittaci E *Chlamydophila abortus* EM
AVES ASSINTOMÁTICAS**

**Aluna: Maria Amador Braz
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, *Campus* de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

ARAÇATUBA – SP
2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIA AMADOR BRAZ - nascida na cidade de Andradina-SP, em 28/02/1979, graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina - FCAA, SP, em 2006. Experiência profissional em clínica médica e cirúrgica de pequenos animais. Aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, São Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Araçatuba, por viabilizar a realização do curso de mestrado.

Ao Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP – Araçatuba, por ter me orientado e auxiliado em todos os momentos necessários. Pela determinação, respeito e paciência, e principalmente pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

Às professoras Valéria Marçal Félix de Lima, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP, Araçatuba e Cárís Maroni Nunes e Luzia Helena Queiroz, do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP, Araçatuba, pelas orientações e sugestões para realização deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida para realização do mestrado.

Ao professor Sérgio Diniz Garcia, à Maria Emília Bodini Santiado, Alex Akira Nakamura e Deuvânia Carvalho da Silva pelo auxílio na coleta das amostras.

Aos meus pais e ao meu esposo pelo incentivo e compreensão.

Aos meus amigos do laboratório:

Deuvânia, Alex, Camila, Milena, Guilherme e Eduardo.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Curva de dissociação observada na PCR em tempo real para <i>Chlamydophila psittaci</i>	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR, PCR em tempo real e hemi-nested PCR.....	29
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras positivas para <i>Chlamydophila</i> pela PCR.....	30
Tabela 2 – Determinação do genótipo de <i>Chlamydophila psittaci</i> por meio de hemi-nested PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados, em amostras fecais de aves positivas pela PCR em tempo real.....	31

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2. Revisão Bibliográfica.....	1
1.2.1 Agente etiológico	1
1.2.2 Transmissão.....	3
1.3 Sinais Clínicos.....	3
1.4 Alterações anatomopatológicas.....	4
1.5 Diagnóstico.....	4
1.6 Clamidiose no Brasil	6
1.7 Psitacose em Saúde Pública.....	6
1.8 Objetivos	7
Referências	7
CAPÍTULO 2- Detecção e caracterização molecular de <i>Chlamydophila psittaci</i> em aves assintomáticas.....	14
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	17
Amostras fecais e Extração de DNA.....	17
Reação em cadeia em polimerase em tempo real.....	18
Hemi- <i>nested</i> PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados.....	19
Resultados e Discussão.....	20
Referências.....	23

RESUMO – *Chlamydophila psittaci* é uma bactéria que causa doença respiratória ou sistêmica em aves e em seres humanos. Há ainda, alguns relatos de infecção em aves por *Chlamydophila abortus*, que é um agente etiológico de problemas reprodutivos em mamíferos. Em vista do risco de transmissão para humanos a partir de aves assintomáticas o objetivo deste estudo foi detectar a presença de *C. psittaci* e *C. abortus* 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, mantidas em cativeiro ou oriundas de apreensão. As amostras foram submetidas à PCR em tempo real para *C. psittaci* e *C. abortus*, 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 utilizada a hemi-nested PCR específica para o 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.

Palavras-Chave: Pneumonia bacteriana - Aves, psitacose, técnica de diagnóstico molecular, zoonoses

ABSTRACT: *Chlamydophila psittaci* is a bacterium that causes respiratory or systemic disease in birds and humans. In birds there is also some reports of infection by *Chlamydophila abortus* that is responsible for abortions in mammals. Owing to the risk of transmission of *Chlamydophila* from asymptomatic birds to humans, the objective of this study was to detect the presence of *C. psittaci* and *C. abortus* in asymptomatic birds. Four hundred and three fecal samples or cloacal swabs were collected from domestic, wild or exotic birds kept in captivity or from apprehension. 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, followed by sequencing of the amplified fragments were used 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.

KEYWORDS: Pneumonia bacterial – birds, psittacosis, molecular diagnostic techniques, zoonoses

1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

Chlamydomphila psittaci é uma bactéria que causa doença respiratória ou sistêmica em aproximadamente 465 espécies de aves, com incidência em vários países (KALETA; TADAY, 2003). As maiores taxas de infecção e de mortalidade são encontradas em psitacídeos (RASO et al., 2002).

A infecção em humanos é denominada como psitacose e pode resultar em casos graves de doença respiratória (VANROMPAY et al., 2007), após contato direto ou indireto com aves infectadas, particularmente psitacídeos, pombos, perus ou patos (HEDBERG et al., 1989; HINTON et al., 1993; NEWMAN et al., 1992). Surtos de clamidiose aviária podem causar prejuízos econômicos e representam um sério risco para as pessoas expostas ao agente (HEDDEMA et al., 2006; GAEDE et al., 2008; VANROMPAY et al., 2007).

O diagnóstico de clamidiose pode ser realizado por meio de testes sorológicos, detecção de antígenos, ou por meio de técnicas de biologia molecular (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2000).

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 Agente etiológico

O agente etiológico da clamidiose em aves e de psitacose em humanos é a *C. psittaci*, atualmente classificada como uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória. A família *Chlamydiaceae* foi reclassificada em dois gêneros, *Chlamydia* e *Chlamydomphila*, com três e seis espécies, respectivamente. Dentre as espécies do gênero *Chlamydomphila* está a *Chlamydomphila psittaci*, classificada anteriormente como *Chlamydia psittaci* (EVERETT et al., 1999).

Infecção por *Chlamydophila abortus* é raramente relatada em aves, e a sintomatologia clínica da infecção não está definida (PANTCHEV et al., 2009). Em mamíferos, a infecção está associada a distúrbios reprodutivos principalmente em bovinos, caprinos e ovinos (SILVA et al., 2006). No homem, ainda não há definição sobre a importância da infecção por *C. abortus* (RHODE et al., 2010).

Até o momento são conhecidos nove genótipos de *C. psittaci*, sete dos quais são aviários e dois não aviários. O genótipo A é encontrado em psitacídeos, B em pombos, C em patos, gansos e perus, D em perus, E em pombos e patos, F em periquitos, WC em bovinos e M56 em roedores (HEDDEMA et al., 2006; GAEDE et al., 2008; VANROMPAY et al., 2007). Geens et al. (2005) sugeriram ainda a definição de genótipo E/B, isolado em patos, perus e pombos. De acordo com Andersen e Vanrompay (2003), todos os genótipos podem ser transmitidos para humanos.

Os genótipos de *C. psittaci* podem ser identificados por meio de análise da sequência de nucleotídeos do gene da proteína da membrana externa (ompA), usando a reação em cadeia de polimerase, seguida da análise do polimorfismo de fragmentos amplificados, digeridos por enzimas de restrição (PCR/RFLP) (VANROMPAY et al., 1997) ou seqüenciamento (BUSH; EVERETT, 2001; GEENS et al., 2005).

O ciclo biológico de *C. psittaci* tem início pela endocitose do corpo elementar pela célula hospedeira, onde se diferencia em corpo reticular. O corpo reticular se divide por fissão binária e forma microcolônias, denominadas corpúsculos de inclusão ou corpos de Levintal-Collie-Lilie (LCL), contendo de 100 a 500 bactérias por célula. Após maturação, os corpos reticulares diferenciam-se novamente em corpos elementares que, por meio de lise celular, são liberados ao meio ambiente, completando assim todo o ciclo de desenvolvimento, que tem duração de aproximadamente 48 horas (GUERLACH, 1994).

Os corpos elementares são sensíveis aos desinfetantes comuns, como o etanol a 70% e compostos de amônia quaternária, ao calor e à luz solar; no

entanto, podem permanecer viáveis por longo período em excreções secas das aves, ou por vários dias em água, em temperatura ambiente (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003).

1.2.2 Transmissão

A forma mais comum de transmissão da clamidiose entre as aves ocorre por inalação ou ingestão da bactéria e também pelo contato direto com secreções e/ou excreções contaminadas ou no ninho, quando os pais regurgitam alimentos contaminados para os filhotes; também pode ocorrer por meio de fômites ou vetores mecânicos, como ácaros e piolhos (SPICKER, 2012). Há relatos de transmissão vertical da bactéria pelo ovo e, com menos frequência, por picada de insetos (SCHEWEN, 1980).

O maior índice de eliminação do agente ocorre em aves clinicamente doentes, quando comparadas com aves portadoras assintomáticas. As aves mais jovens são mais susceptíveis à infecção, eliminando a bactéria com maior frequência e quantidade (FRIEND; FRANSON, 1999; SPICKER, 2012).

Em infecções naturais por *C. psittaci*, o período de excreção de corpúsculos elementares pode variar, na dependência da virulência da estirpe, carga infectante e estado imune do hospedeiro. Na dependência desses fatores, a ave pode eliminar a bactéria por vários meses (ANDERSEN; FRANSON, 2007; RODOLAKIS; MOHAMAD, 2009).

Os portadores assintomáticos apresentam períodos intermitentes de excreção da bactéria; a reativação da eliminação é favorecida por fatores como estresse, subnutrição, extremos de temperatura e cativeiro (BORIE et al., 2001).

1.3 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos, a morbidade e a mortalidade da clamidiose podem variar de acordo com a espécie acometida, idade e estado imunológico da ave,

o grau de infecção, a virulência do sorotipo envolvido e eventual presença de infecções concorrentes (CUBAS; GODOY, 2004; FRIEND; FRANSON, 1999; GUERLACH, 1994; SPICKER, 2012). São inespecíficos e se caracterizam por depressão, plumagem eriçada, tremores, letargia, anorexia, desidratação, blefarite, ceratoconjuntivite, e outros sinais relacionados aos sistemas respiratório, digestório, urinário e nervoso, até a presença de óbito. Em alguns casos, há somente a presença de conjuntivite (NASPHV, 2010).

Em um surto de clamidiose na cidade de São Paulo, Raso et al. (2002) descreveram os sinais clínicos de clamidiose em 95 filhotes de *Amazona aestiva*. Os papagaios eram provenientes de tráfico e apresentavam letargia, dispnéia, penas eriçadas, anorexia, diarreia verde-amarelada, poliúria, desidratação, emagrecimento e alta taxa de mortalidade (96,5%).

1.4 Alterações anatomopatológicas

As lesões macroscópicas podem ou não ser observadas em aves infectadas com *C. psittaci*; as alterações mais comuns são aerosaculite, hepatomegalia, esplenomegalia, enterite, peritonite, pericardite, broncopneumonia e sinusite (FRIEND; FRANSON, 1999).

Em *A. aestiva* com infecção por *C. psittaci*, as lesões macroscópicas observadas foram hepatomegalia e congestão esplênica (RASO et al., 2004).

1.5 Diagnóstico

A clamidiose aviária não possui sinais clínicos patognomônicos, e os resultados de exames radiológicos, hematológicos e bioquímicos são apenas sugestivos da enfermidade; dessa forma, se torna difícil a realização de diagnóstico clínico sem a detecção direta ou indireta de *C. psittaci* (RASO, 2004). No entanto, a presença de leucocitose, alterações na atividade de enzimas hepáticas, imagens radiográficas evidenciando hepatomegalia e

esplenomegalia e alterações em sacos aéreos são indicativos de infecção por *C. psittaci* (LONGBOTTOM; COULTER, 2003).

Para diagnóstico de infecção por *C. psittaci* por meio de métodos laboratoriais são utilizadas visualização direta do agente após utilização de colorações especiais em impressões de órgãos, isolamento do agente seguido de detecção de DNA ou de antígenos, detecção de DNA em amostras de órgãos, suabes ou amostras fecais e testes sorológicos (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003).

Os principais testes sorológicos para clamidiose incluem o teste de aglutinação, imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e o teste de fixação do complemento (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003; NASPHV, 2010; RASO, 2004; SACHSE et al., 2009). Dentre os métodos moleculares, os mais utilizados são a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR em tempo real (GEENS et al., 2005; ROBERTSON et al., 2009).

A PCR em tempo real pode ser realizada com o fluoróforo Sybr Green, para classificação da espécie. Se o objetivo for a determinação do genótipo de *C. psittaci*, a PCR em tempo real deve ser realizada com sondas específicas para cada genótipo ou então, deve ser realizada PCR para o gene *ompA*, seguida de sequenciamento dos fragmentos amplificados (GEENS et al., 2005).

A PCR em tempo real pode também ser utilizada para detecção e quantificação de *C. psittaci*, e pode fornecer informações sobre a distribuição de cada genótipo entre os hospedeiros específicos e fornecer dados epidemiológicos sobre a infecção em seres humanos, mamíferos e aves (BRANLEY et al., 2008; MITCHELL et al., 2009). Pode ainda ser associada à análise da curva de dissociação em alta resolução (HRM), para diferenciação entre as espécies de *Chlamydophila* (ROBERTSON et al., 2009).

O diagnóstico de *C. psittaci* por meio da PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade. O material a ser colhido dependerá da técnica utilizada, porém, as amostras mais utilizadas são provenientes de fezes e suabes de cloaca ou de orofaringe. Um fator a se considerar para o diagnóstico

é que há excreção intermitente do corpo elementar, particularmente em aves assintomáticas, o que favorece a ocorrência de resultados falso-negativos (GODOY, 2007).

1.6 Clamidiose no Brasil

No Brasil há poucos relatos de infecção por *C. psittaci*, e em nenhum dos relatos houve caracterização molecular para determinação do genótipo de *C. psittaci* (RASO et al., 2010). Em São Paulo, foi registrado um surto com 96,5% de mortalidade, em *A. aestiva*, provenientes de tráfico (RASO et al., 2004). Em outro estudo no Brasil, Raso et al. (2006) detectaram *C. psittaci* em 2/32 (6,3%) filhotes *A. aestiva* e em 12/45 (26,7%) filhotes de araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre, no Pantanal do Mato Grosso do Sul.

Raso et al. (2010) realizaram o primeiro estudo soro epidemiológico para *C. psittaci* em humanos e encontraram evidência de infecção em 4,7% (17/364) dos funcionários e veterinários de sete zoológicos brasileiros.

Moschioni e Faria (2001) descreveram um caso de clamidiose em humanos em que um rapaz de 16 anos, de Medina, MG, Brasil, proprietário de uma criação de pombos, apresentou pneumonia e progrediu para insuficiência respiratória aguda. O diagnóstico de psitacose foi realizado por meio de imunofluorescência com anticorpo monoclonal.

1.7 Psitacose em Saúde Pública

De acordo com Telfer et al. (2005), os proprietários de aves de companhia, pessoas que trabalham em lojas que comercializam aves, os médicos veterinários e todas as pessoas que tem contato com aves são considerados como grupos de risco para a doença.

A transmissão de *C. psittaci* ao homem ocorre principalmente pela inalação do corpo elementar presente em penas e fezes secas ou em

secreções respiratórias de aves infectadas (NASPHV, 2010). A enfermidade em humanos assemelha-se às infecções de vias aéreas superiores e é descrita como uma doença de início insidioso, com sintomas inespecíficos (MOSCHIONI; FARIA, 2001). Os sinais clínicos incluem febre, dor de cabeça, mialgia, mal estar, tosse e pneumonia (MOSCHIONI; FARIA, 2001; NASPHV, 2010). A transmissão entre pessoas tem sido considerada rara (OLSON; TREUTING, 1994).

O período de incubação da infecção por *C. psittaci* no homem é variável, podendo variar de uma a quatro semanas (EUGSTER, 1980).

A participação de aves na epidemiologia da clamidiose humana foi enfatizada por Vásquez et al. (2010), que encontraram alta prevalência de infecção por *C. psittaci* em pombos assintomáticos em parques e jardins públicos em Madri, Espanha, por meio de PCR.

1.8 Objetivos

Em vista do risco de transmissão para humanos a partir de aves assintomáticas, o objetivo deste trabalho foi detectar *C. psittaci* e *C. abortus* 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 para o gene *ompA*, seguida de sequenciamento do fragmento amplificado.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, A.A.; FRANSON, C.F. Avian Chlamidiosis. In: THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B.; ATKINSON, C.T. **Infectious diseases of wild birds**. Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 2007. p.303-316.

ANDERSEN, A.A.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: SAYF, Y.M. **Disease of poultry**. Ames: Iowa State University, v.11, p.863-879, 2003.

BORIE, C.; MARTINEZ, M.A.; TORO, H. *Chlamydophila psittaci*: Detección de anticuerpos em palmas de vida libre (*Columba livia domestica*) en la ciudad de Santiago, Chile. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.35, p.471-474, 2001.

BRANLEY, J.M.; ROY, B.; DWYER, D.E.; SORRELL, T.C. Characterization of *Chlamydiaceae* species using PCR and high resolution melt curve analysis of the 16S rRNA gene. **Journal of Applied Microbiology**, v.6, p.2017-28, 2008.

BUSH, R.M.; EVERETT, K.D. Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.203–220, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). **MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.3–17, 2000.

CUBAS, Z.S.; GODOY, S.N. **Algumas doenças de aves ornamentais**. 2004. Disponível em: <<http://wonderfullglosterns.110mb.com/PDF/Dossierdedoenças.pdf>>. Acesso em 20 de abril 2011.

EUGSTER, A.K. Chlamydiosis. In: STEELE, J. H. (ED). **CRC handbook series in zoonoses**. Boca Raton: Editora, 1980. v.2, p.357-417.

EVERETT, K.D.; BUSH, R.M.; ANDERSEN, A.A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. Nov. and Simkania fam.nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **Science for a Changing World**, p.111-114, 1999.

FRIEND, M.; FRANSON, J.C. Field manual of wildlife diseases. In: GENERAL field procedures and diseases of wild birds. Madison, Wisconsin. US Department of the Interior, US Geological Survey, 1999. p.309–351.

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 and Public Health**, v.55, p. 84–88, 2008.

GEENS, T.; DEWITTE, A.; BOON, N.; VANROMPAY, D. Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. **Veterinary Research**, v.36, p.787–797, 2005.

GODOY, S.N. Psittaciformes (Araras, papagaios, periquito). In: CUBAS, Z.S. et al. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, p.222-251, 2007.

GUERLACH, H. *Chlamydia*. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers, 1994. p.984-996.

HEDBERG, K.; WHITE, K.E.; FORFANG, J.C.; KORLATH, J.A.; FRIENDSHUH, K.A.; HEDBERG, C.W.; MACDONALD, K.L.; OSTERHOLM, M.T. An outbreak of psittacosis in Minnesota turkey industry workers: implications for modes of

transmission and control. **American Journal of Epidemiology**, v.130, p.569–577, 1989.

HEDDEMA, 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.

HINTON D.G.; SHIPLEY, A.; GALVIN J.W.; HARKINJ.T.; BRUNTON R.A. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant, **Australian Veterinary Journal**, 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 Pathology**, v.32, p.435–461, 2003.

LANGBOTTOM, D.; COULTER, L.J. Animal Chlamydiosis and zoonotic implications. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p.217-244, 2003.

MITCHELL, S.L.; WOLFF, B.J.; THACKER, W.L.; CIEMBOR, P.G.; GREGORY, C.R.; EVERETT, K.D.E.; RITCHIE, B.W.; WINCHELL, J.M. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.175–181, 2009.

MOSCHIONI, C.; FARIA, H.P. Pneumonia due to *Chlamydia psittaci*. **Journal of Pneumology**, v.27, p. 219-222, 2001.

NASPHV – NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. **Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (Psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiosis)**, p. 1-17, 2010. Disponível em:

<<http://www.nasphv.org/Documents/Psittacosis.pdf>>. Acesso em 18 de abril 2012.

NEWMAN, C.P.; PALMER, S.R.; KIRBY, F.D.; CAUL, E.O. A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors. **Epidemiology and Infection**, v.108, p.203–210, 1992.

OLSON, B.J.; TREUTING, W.L. An epidemic of a severe pneumonitis in the Bayou Region of Louisiana. IV. A preliminary note on cytology. **Public Health Report**, v.59, p.1299-1311, 1994.

PETROVAY, F.; BALLA, E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.1296-1298, 2008.

PANTCHEV, A.; STING, R.; BAUERFEIND, R.; TYCZKA, J.; KONRAD, S. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. **Veterinary Journal**, v.181, p.145-150, 2009.

RASO, T.F. ***Chlamydophila psittaci* em psitacídeos de vida livre e cativoiro e suas implicações à saúde pública**. 79f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2004.

RASO, T.F.; BERCHIERI JR.; A., PINTO, A.A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrot in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.33, p.118–121, 2002.

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.

RASO, T.F.; CARRASCO, A.O. ; SILVA, J.C.; MARVULO, M.F.; PINTO, A.A. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo workers in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p.411-416, 2010.

RASO, T.F.; GODOY, S.N.; MILANELO, L.; SOUZA, C.A.I.; MATUSHIMA, E.R.; ARAÚJO, Junior., J.P.; PINTO, A.A. An outbreak of chlamydiosis in captive Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.35, p.94– 96, 2004.

ROBERTSON, T.; BIBBY, S.; O'ROURKE, D.; BELFIORE, T.; LAMBIE, H.; NOORMOHAMMADI, A.H. Characterization of Chlamydiaceae species using PCR and high resolution melt curve analysis of the 16S rRNA gene. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.2017-28, 2009.

ROHDE, G.; STRAUBE, E.; ESSIG, A.; RENHOLD, P., SACHSE, K. Chlamydial Zoonoses. **Deutsches Ärzteblatt International**. v. 107, p. 174–80, 2010.

RODOLAKIS, A.; MOHAMAD, K.Y. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.382-391, 2009.

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.90-97, 2009.

SCHEWEN, P.E. Chlamydial infection in animals: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.21, p.2-11, 1980.

SILVA, F.G.; FREITAS, J.C.; MÜLLER, E.E. *Chlamydophila abortus* em animais de produção. **Ciência Rural**, v. 36, p.342-348, 2006.

SPICKLER, A.R. **Chlamydiosis (avian)**. 2012. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=chlamydiosis-avian&lang=en>>. Acesso em 18 de abril 2012.

TELFER, B.L.; MOBERLEY, S.A.; HORT, K.P.; BRANLEY, J.M.; DWYER, D.F.; MUSCATELLO, D.J. Probable psittacosis outbreak linked to wild birds. **Emerging Infectious Diseases**, v.1, p.391, 2005.

VANROMPAY, D.; BUTAYE, P.; SAYADA, C.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. **Research in Microbiology**, v.148, p.327, 1997.

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.

VÁZQUEZ, B.; ESPERÓN, F.; NEVES E.; LÓPEZ J.; BALLESTEROS, C.; MUÑOZ, M. J. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, p.45, 2010.

CAPÍTULO 2 - DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Chlamydophila psittaci* E *Chlamydophila abortus* EM AVES ASSINTOMÁTICAS

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Chlamydophila psittaci* AND *Chlamydophila abortus* IN ASYMPTOMATIC BIRDS

Maria Amador Braz¹, Deuvânia Carvalho Silva¹, Maria Emília Bodini Santiago, Sérgio Diniz Garcia¹, Marcelo Vasconcelos Meireles¹

¹Unesp, Univ. Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Rua Clóvis Pestana, nº 793, CEP 16050-680, Bairro Dona Amélia, Araçatuba – SP.

RESUMO: *Chlamydophila psittaci* é uma bactéria que causa doença respiratória ou sistêmica em aves e em seres humanos. Há ainda, alguns relatos de infecção em aves por *Chlamydophila abortus*, que é um agente etiológico de problemas reprodutivos em mamíferos. Em vista do risco de transmissão para humanos a partir de aves assintomáticas o objetivo deste estudo foi detectar a presença de *C. psittaci* e *C. abortus* 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, mantidas em cativeiro ou oriundas de apreensão. As amostras foram submetidas à PCR em tempo real para *C. psittaci* e *C. abortus*, 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 utilizada a hemi-nested PCR específica para o 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.

Palavras-Chave: Pneumonia bacteriana - Aves, psitacose, técnica de diagnóstico molecular, zoonoses

ABSTRACT: *Chlamydophila psittaci* is a bacterium that causes respiratory or systemic disease in birds and humans. In birds there is also some reports of infection by *Chlamydophila abortus* that is responsible for abortions in mammals. Owing to the risk of transmission of *Chlamydophila* from asymptomatic birds to humans, the objective of this study was to detect the presence of *C. psittaci* and *C. abortus* in asymptomatic birds. Four hundred and three fecal samples or cloacal swabs were collected from domestic, wild or exotic birds kept in captivity or from apprehension. 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, followed by sequencing of the amplified fragments were used 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.

KEYWORDS: Pneumonia bacterial – birds, psittacosis, molecular diagnostic techniques, zoonoses

INTRODUÇÃO

Considerada como uma das principais zoonoses aviárias (RASO, 2004), a infecção por *Chlamydophila psittaci* é caracterizada por doença respiratória ou sistêmica em aproximadamente 465 espécies de aves (KALETA; TADAY, 2003). Em seres humanos, 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).

Infecção por *Chlamydophila abortus* é raramente relatada em aves, e a sintomatologia clínica da infecção não está definida (PANTCHEV et al., 2009). Em mamíferos, a infecção está associada a distúrbios reprodutivos principalmente em bovinos, caprinos e ovinos (SILVA et al., 2006). No homem, ainda não há definição sobre a importância da infecção por *C. abortus* (RHODE et al., 2010).

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 (BORIE et al., 2001).

A infecção em humanos pode ser assintomática ou apresentar sintomatologia inespecífica, principalmente relacionada ao trato respiratório (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003). 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).

Aves em cativeiro são mais sensíveis à infecção, portanto, alta taxa de mortalidade é observada ocasionalmente em aves selvagens capturadas e mantidas em cativeiro (RASO et al., 2004). A clamidiose aviária se caracteriza por letargia, hipertermia, secreções nasais e oculares e diminuição da produção de ovos. A mortalidade pode variar, de acordo com a patogenicidade do agente (ANDERSEN; FRANSON, 2007; RASO, 2009).

A identificação de *C. psittaci* 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 (GEENS et al., 2005a; SAYADA et al., 1995; VANROMPAY et al., 1997;).

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 de *Chlamydophila* para humanos, a partir de aves assintomáticas, o objetivo deste trabalho foi detectar *C. psittaci* e *C. abortus* 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 *heminested* PCR para o gene *ompA*, seguida de sequenciamento do fragmento amplificado.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais e Extração de DNA

As amostras foram provenientes de aves assintomáticas provenientes de um criatório de psitacídeos (57) e de dois zoológicos municipais (183), no estado de São Paulo, ou 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 (Tabela 1).

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 temperatura ambiente, por no máximo uma semana, em microtubos de 2,5

mL contendo o tampão L6 (Triton X100 1 %, Tris-Cl pH 6,4 0,1 M, isotiocianato de guanidina 6 M); os suabes cloacais foram congelados a -20° C. A extração de DNA genômico de *C. psittaci* foi realizada de acordo com Silva et al. (2010).

Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Para determinação da curva de regressão padrão e padronização da PCR em tempo real, foi utilizado um fragmento de 818 pb da subunidade 16S do rRNA, amplificado por meio de PCR convencional utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 16SFor e 16SRew (Quadro 1), que foram elaborados com utilização do software *Primer Blast* e são específicos para amplificação de DNA de *Chlamydophila* spp. Como não havia disponibilidade de DNA de *C. psittaci* para utilização como controle positivo, o fragmento foi amplificado a partir de DNA genômico de *C. abortus*, que apresenta similaridade genética de 99,5% com *C. psittaci* (AF481048), no gene da subunidade 16S do rRNA. As condições da PCR convencional para amplificação do fragmento de 818 pb foram as seguintes: 17,15µl de água ultra-pura, 2,5 µl de PCR buffer, 2,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo, 0,5U de Platinum Taq DNA polimerase® (Invitrogen), 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µl de DNA de *C. psittaci*. Foi utilizada desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C, por 45 segundos, e anelamento e extensão a 58°C, por 30 segundos. O fragmento amplificado pela PCR convencional foi submetido à eletroforese em gel de agarose e o DNA foi purificado utilizando-se o *kit* QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) e diluído de forma seriada, na base 10, a partir de 22 ng de DNA, para obtenção de seis pontos na curva de regressão. Cada diluição foi testada em triplicata.

Após padronização, a PCR em tempo real foi realizada em amostras de DNA proveniente de aves, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Geens et al. (2005a) (Quadro 1), para amplificação de um fragmento de 151 pb da subunidade 16S do rRNA, nas seguintes condições: 6,4µl de água

ultra-pura, 10µl de SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), 0,8µl de cada oligonucleotídeo iniciador, CpPsSSfor e CpPsSSrev (Quadro 1) 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). Como controles positivo e negativo foram utilizados DNA de *C. abortus* e água ultrapura, respectivamente.

Hemi- *nested* PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados

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) e Chla2 e Chla3, que foram elaborados com utilização do software *Primer Blast* (Quadro 1), nas seguintes condições: volume final de 25 µl de solução contendo 2,5 µl de tampão para PCR 10x, 1,5 mM MgCl₂, 5 pMol/microlitro de albumina sérica bovina não acetilada, 200 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo e 2,5 µl 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 utilizados 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® DyeTerminator3.1”, 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

Neste experimento foi observada baixa prevalência de *Chlamydophila*, provavelmente pelo fato de que as aves não apresentavam sintomas da enfermidade e, também, pelo fato de que 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 (GODOY, 2007; VÁZQUEZ et al., 2010).

A ocorrência de infecção por *C. psittaci* é variável em função de situações que predispoem as aves à infecção, presença de enfermidade clínica e ao teste diagnóstico utilizado (BRAND, 1989; OKUDA et al., 2011). Há relatos desde positividade de 6,3% (2/32) em papagaios-verdadeiros (*A. aestiva*) e de 26,7% (12/45) em araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*), procedentes de aves jovens do Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil, avaliadas por *hem-nested* PCR (RASO et al., 2006), até positividade de 92,2%, em amostras fecais e em suabes cloacais de papagaios e periquitos, examinados por meio de PCR em tempo real (PANTCHEV et al., 2009).

Pantchev et al. (2009) justificam a alta positividade (92,2%) encontrada pelo fato das aves apresentarem sinais clínicos de clamidiose e, provavelmente, apresentarem maior quantidade de DNA em fezes, já que aves clinicamente doentes apresentam maior chance de eliminação do agente se comparadas com aves portadoras assintomáticas (FRIEND; FRANSON, 1999).

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 (Figura 1). 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 (Figura 1). Essa variação na temperatura de dissociação, observada neste experimento, não possibilita a diferenciação entre ambas as espécies.

O sequenciamento do fragmento de 818 pb da subunidade 16S do rRNA, amplificado a partir do DNA de *C. abortus* utilizado como controle positivo, revelou polimorfismo de cinco nucleotídeos em relação às sequências de DNA de *C. psittaci* publicadas no *GenBank* (AF481051 e AF481052). Essa diferença resultou na pequena diferença na variação na temperatura de observada na curva de dissociação, entre a amostra de *C. abortus* e entre o isolado de *C. psittaci* genótipo A, identificado em amostra fecal de uma *N. hollandicus* (Figura 1).

Como não há diferença na temperatura de dissociação suficiente para permitir a diferenciação entre *C. abortus* e *C. psittaci*, não foi possível identificar a espécie de Chlamydophila presente nas amostras positivas pela PCR em tempo real, e que não foram identificadas pelo sequenciamento. Mesmo assim, a maior probabilidade é de que haja presença de *C. psittaci* nessas amostras, uma vez que a infecção por *C. abortus* raramente é relatada em aves (Pantchev et al., 2009).

A classificação molecular de *C. psittaci* ainda apresenta alguns desafios, particularmente pela existência de similaridade genética com *C. abortus* (VAN LOOK et al., 2003). Essa similaridade genética deve ser considerada no diagnóstico de *C. psittaci* utilizando PCR em tempo real seguida de análise da curva de dissociação. Neste experimento, mesmo utilizando oligonucleotídeos iniciadores considerados como específicos para *C. psittaci* (Geens et al., 2005a), foi possível amplificação de fragmentos de DNA de *C. abortus*. Essa amplificação foi possível mesmo havendo polimorfismo no fragmento do gene

16S rRNA amplificado a partir do DNA genômico de *C. abortus*, na região de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real (um nucleotídeo no oligonucleotídeo iniciador senso e quatro nucleotídeos no oligonucleotídeo iniciador anti-senso).

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*, 2 *Amazona aestiva*, 2 *Trichoglossus h. haemadus* e 1 da ave ordem Piciformes: *Ramphastos tucanus* (Tabela 2). Doze amostras foram provenientes de um criatório de psitacídeos, 3 de um zoológico e 2 de aves provenientes de apreensão.

A hemi-nested PCR revelou amplificação de DNA de *Chlamydophila* em 2 amostras de *Nymphicus hollandicus* (Tabela 2), entre aquelas positivas pela PCR em tempo real. As duas foram provenientes do mesmo criatório. Foi possível o sequenciamento de uma das amostras positivas pela hemi-nested PCR, o que permitiu a identificação do genótipo A de *C. psittaci*. Em um estudo realizado por Mitchell et al. (2009), 70% das amostras positivas para *Chlamydophila* spp. foram identificadas como genótipo A de *C. psittaci*, que é comumente identificado em amostras de psitacídeos (GEENS et al., 2005a), o que corrobora com nossos resultados.

Infecção por *C. psittaci* já foi identificada em psitacídeos (RASO et al., 2002; 2004; 2006) e pombos no Brasil (LIMA et al., 2011). No entanto, ainda não há estudos no Brasil sobre quais genótipos infectam aves ou o homem.

Os resultados encontrados demonstram que a PCR em tempo real com o fluoróforo Eva Green® seguida da análise da curva de dissociação pode ser utilizada para detecção de DNA de *C. psittaci* e *C. abortus* em amostras fecais de aves assintomáticas. Pelo fato de apresentar alta sensibilidade, esse método de diagnóstico representa um auxílio valioso para detecção de infecção em aves que apresentam eliminação do agente em pequena quantidade em amostras fecais, como verificado por Okuda et al. (2011), que relatam que a

PCR em tempo real apresentou sensibilidade 1.000 vezes maior que a *nested* PCR, para detecção de DNA de *C. psittaci* em cultivo celular.

É importante salientar que este é o primeiro trabalho realizado no Brasil utilizando a PCR em tempo real para diagnóstico de clamidiose em aves, e a primeira identificação molecular do genótipo A de *C. psittaci*, no Brasil.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, A.A.; FRANSON, C.F. Avian Chlamydiosis. In: THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B.; ATKINSON, C.T. **Infectious diseases of wild birds**. Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 2007. p.303-316.

ANDERSEN, A.A.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: SAYF, Y.M. **Disease of poultry**. Ames: Iowa State University, 2003. v.11, p.863-879.

BRAND, C.S. Chlamydial infections in free-living birds. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.195, p.1531-1535, 1989.

CUBAS, Z.S.; GODOY, S.N. Medicina e patologia de aves de companhia. In: AGUIAR, Roberto; Sonia M. HERNÁNDEZ-DIVERS; Stephen. **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos**. São Caetano do Sul, SP: Interbook, 2006. p. 213-64.

DENAMUR, E.; SAYADA, C.; SOURIAU, A.; ORFILA, J.; RODOLOAKIS, A.; ELION, J. Restriction pattern of the major outer membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.2525–2530, 1991.

FRIEND, M.; FRANSON, J.C. Field manual of wildlife diseases. In: GENERAL field procedures and diseases of wild birds. Madison, Wisconsin. US Department of the Interior, US Geological Survey, 1999. p.309–351.

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 and Public Health** v.55, p.184–188, 2008.

GEENS, T.; DEWITTE, A.; BOON, N.; VANROMPAY, D. Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. **Veterinary Research**, v.36, p.787–797, 2005a.

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*, v.43, p.2456-2461, 2005b.

HEDBERG, K.; WHITE, K.E.; FORFANG, J.C.; KORLATH, J.A.; FRIENDSHUH K.A.; HEDBERG C.W.; MACDONALD K.L.; OSTERHOLM M.T. An outbreak of psittacosis in Minnesota turkey industry workers: implications for modes of transmission and control, **American Journal of Epidemiology**, v.130, p.569–577, 1989.

HEDDEMA, 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.

HINTON D.G.; SHIPLEY A.; GALVIN J.W.; HARKIN J.T.; BRUNTON R.A. Chlamydiosis in workers at a duck farm and processing plant, **Australian Veterinary Journal**, 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 Pathology**, v.32, p.435–461, 2003.

LIMA, V.Y.; LANGONI, H.; SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B. CASTRO, A.P.B.; SILVA, R.C.; ARAÚJO JR., J.P. *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 9–14, 2011.

MAGNINO, S.; HAAG-WACKERNAGEL, D.; GEIGENFEIND, I.; HELMECKE, S.; DOVC, A.; PRUKNER-RADOVIC E.; RESIDBEGOVIC, E.; ILIESKI, V.; LAROUCAU, K.; DONAT, M. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. **Veterinary Microbiology**, v.135, p.54-67, 2009.

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. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v.48, p.271–275, 1987.

MITCHELL, S.L.; WOLFF, B.J.; THACKER, W.L.; CIEMBOR, P.G.; GREGORY, C. R.; EVERETT, K.D.E.; RITCHIE, B.W.; WINCHELL, J.M. Genotyping of *Chlamydophila psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.175–181, 2009.

OKUDA, H.; OHYA, K., SHIOTA, Y.; KATO, H.; FUKUSHI, H. Detection of *Chlamydophila psittaci* by using SYBR green real-time PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.73, p. 249–254, 2011.

PANTCHEV, A.; STING, R.; BAUERFEIND, R.; TYCZKA, J.; KONRAD, S. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. **Veterinary Journal**, v.181, p.145-150, 2009.

RASO, T.F. ***Chlamydophila psittaci* em psitacídeos de vida livre e cativo e suas implicações à saúde pública**. 79f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2004.

RASO, T.F. Clamidiose aviária in: **Patologia aviária**. Barueri: Manole, p.367-374. 2009.

RASO, T.F.; BERCHIERI, Junior, A.; PINTO, A. A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrot in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.33, p.118–121, 2002.

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.

RASO, T.F.; CARRASCO, A.O. ; SILVA, J.C.; MARVULO, M.F.; PINTO, A.A. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo workers in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p.411-416, 2010.

RASO, T.F.; GODOY, S.N.; MILANELO, L.; SOUZA, C.A.I.; MATUSHIMA, E.R.; ARAÚJO, JR., J.P.; PINTO, A.A. An outbreak of chlamydiosis in captive Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.35, p.94–96, 2004.

ROHDE, G.; STRAUBE, E.; ESSIG, A.; RENHOLD, P.; SACHSE, K. Chlamydial Zoonoses. **Deutsches Ärzteblatt International**. v. 107, p. 174–80, 2010.

SAYADA, C.; ANDERSEN, A.A.; STOREY, C.; MILON, A,E,F.; HASHIMOTO, N.; HIRAI, K.; ELION, J.; DENAMUR, E. Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation. **Research in Microbiology**, v.146, p.155–165, 1995.

SCHEWEN P.E. Chlamydial infection in animals: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.21, p.2-11, 1980.

SILVA, F.G.; FREITAS, J.C.; MÜLLER , E.E. *Chlamydophila abortus* em animais de produção. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 342-348, 2006.

SILVA, C.D.; HOMEM, C.G.; NAKAMURA, A.N.; TEIXEIRA, W.F.; PERRI, S.H. V.; MEIRELES, M.V. Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. **Parasitology Research**, v.107, p.271–277, 2010.

VAN LOOCK, M.; VANROMPAY, D.; HERRMANN, B.; VANDER, J. Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p. 761–770, 2003.

VANROMPAY, D.; BUTAYE, P.; SAYADA, C.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using *omp1* restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. **Research in Microbiology**, v.148, p.327, 1997.

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.

VÁZQUEZ, B.; ESPERÓN, F.; NEVES, E.; LÓPEZ, J.; BALLESTEROS, C.; MUÑOZ, M.J. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, p.45, 2010.

Quadro 1- 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 *Chlamydomophila* 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	GGCACGCCGTC AACCCATGACT			
PCR em tempo real	CpPsSSfor	TTATTAAGAGCTATTGGTGGATGCC	Geens et. al. (2005a)	16S rRNA	151
	CpPsSSrev	AACGTATAATGGTAGATGATTAATCTACCG			
Hemi-nested PCR	CTU (reações primária e secundária)	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG	Denamur et al. (1991)	ompA	1097 (reação primária) 644 (reação secundária)
	Chla2 (reação primária)	CAAGCTTTTCTAGCTTCATTTTGTT	este experimento		
	Chla3a (reação secundária)	CCTAAAAGTTGCACAACCACA	este experimento		

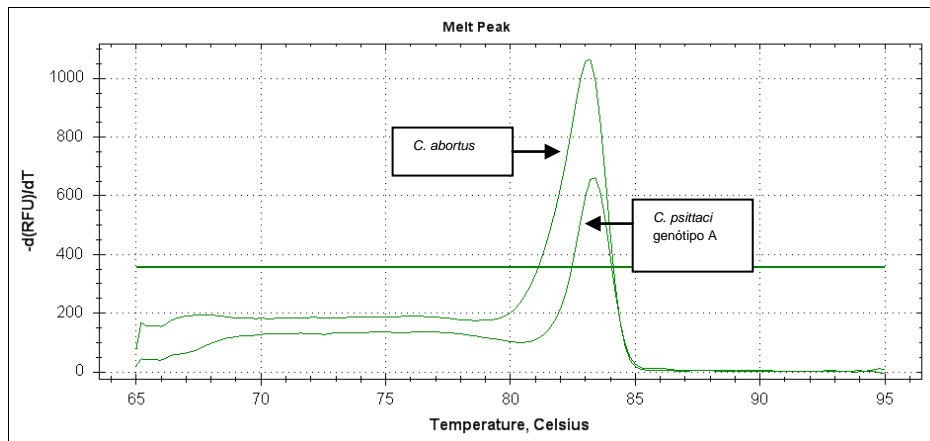


FIGURA 1 - Curva de dissociação observada na PCR em tempo real para *Chlamydomonas abortus* e *Chlamydomonas psittaci*.

Tabela 1 – Amostras positivas para *Chlamydomonas* 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	-
Charadiiformes	3	-
Caprimulgiformes	1	-
Total	403	17

Tabela 2 – 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	C. psittaci genótipo A (1)
<i>Ramphastus tucanus</i>	1	-	-
<i>Trichoglossus h. haemadus</i>	2	-	-
Total	17	2	1