



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

DÉBORA BARBOSA BRUNO

**DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE *CHLAMYDIA* SPP.
EM AVES SELVAGENS DE VIDA LIVRE**

Araçatuba

2022

DÉBORA BARBOSA BRUNO

**DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE *CHLAMYDIA* SPP.
EM AVES SELVAGENS DE VIDA LIVRE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

Araçatuba

2022

B898d Bruno, Débora Barbosa
Detecção e classificação molecular de Chlamydia spp. em
aves selvagens de vida livre / Débora Barbosa Bruno. --
Araçatuba, 2022
39 p. : tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientador: Marcelo Vasconcelos Meireles

1. zoonoses. 2. aves. 3. wild birds. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: *DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE CHLAMYDIA SPP. EM AVES SILVAGENS DE VIDA LIVRE*

AUTORA: DÉBORA BARBOSA BRUNO

ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

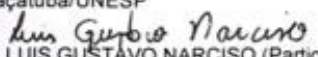
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP



Prof. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP



Dr. LUIS GUSTAVO NARCISO (Participação Presencial)
Doutor em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Araçatuba, 15 de setembro de 2022.

*À minha avó, Leomar Gomes (in memoriam), por todo o cuidado, companheirismo,
doação, carinho e amor, por ter sido base para construção da minha vida profissional e
por moldar e inspirar a minha vida pessoal.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade de realizar esse sonho de concluir o mestrado, por todas as alegrias que esse tempo trouxe à minha vida, pelo sustento nos momentos difíceis e força para superar as dificuldades.

Agradeço à minha família, ao meu pai Donizete e à minha mãe Roseli, por não terem medido esforços para que eu conseguisse chegar até aqui, pela dedicação, paciência, conselhos e amor. Aos meus irmãos Douglas e Danilo, pela amizade, pela compreensão e pelas conversas. Ao meu noivo Bruno, por todo o apoio nos momentos difíceis, por toda a alegria compartilhada nas superações e pela torcida e companheirismo em todo o processo, por todo incentivo e amor.

Agradeço a todos os amigos que estiveram juntos comigo nessa caminhada, em especial às amigas de apartamento (vulgo Ap das Meninas) Mayara, Lara e Laura, pelo companheirismo, respeito, amizade, risadas, pela irmandade, e por terem se tornado minha família durante tantos anos.

Agradeço a todos os animais; independentemente de classe, ordem, família, gênero e espécie, silvestres ou exóticos, que teve a oportunidade de cruzar meu caminho, e o privilégio de contribuir de alguma forma em suas vidas.

Agradeço à Associação Mata Ciliar, em especial a todas as médicas veterinárias que estiveram à frente dos atendimentos e me auxiliaram durante o período de coleta das amostras; sem essa contribuição este trabalho não seria possível.

Agradeço aos professores Sérgio Diniz Garcia e Suely Regina Mogami Bomfim, pela participação em minha banca de qualificação, por todas as sugestões e contribuições para este trabalho e por todos os anos de ensinamentos e amizade.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Marcelo Vasconcelos Meireles, por acreditar em meu desempenho ao longo do mestrado, por todo o conhecimento compartilhado e dedicação ao projeto. Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Ornitopatologia, por toda a contribuição e ajuda oferecida ao longo da pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba FMV – UNESP e ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), pela oportunidade de concretizar este sonho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado (código de financiamento 001) no período de 01/03/2020 a 26/02/2021 e 01/04/2022 a 31/07/2022.

A todos vocês, os meus **SINCEROS AGRADECIMENTOS!**

*“Então mire as estrelas e salte o mais alto que der,
tome distância, e faça o melhor que puder”.*

BRUNO, D. B. **DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE CHLAMYDIA SPP. EM AVES SELVAGENS DE VIDA LIVRE.** 2022. 14f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A clamidiose aviária é uma importante doença causada por bactérias da família *Chlamydiaceae*. Acomete várias espécies de aves em diversos países, incluindo o Brasil, no entanto ainda há escassez de informações relacionadas à epidemiologia da infecção por *Chlamydiaceae* em aves. Além das aves, *Chlamydia* spp. pode infectar outros animais e o homem. Comumente, a clamidiose é causada por *Chlamydia psittaci*, porém, recentemente, foram reconhecidas novas espécies acometendo aves. Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de bactérias do gênero *Chlamydia* em aves de vida livre da cidade de Araçatuba e região. Foram analisados suabes cloacais de 150 aves de diversas ordens, que foram enviadas para atendimento na Associação Mata Ciliar – Centro Recuperação de Animais Silvestres (CRAS), vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, campus de Araçatuba. Todas as 150 amostras foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real, para amplificação específica de um fragmento parcial do gene OMPa de *C. psittaci*, e à PCR para amplificação específica de um fragmento parcial do gene 16S rRNA de bactérias da família *Chlamydiaceae*, seguida de sequenciamento genético. Todas as amostras submetidas à PCR em tempo real para *C. psittaci* foram negativas. A PCR específica para a família *Chlamydiaceae* foi positiva em 20 amostras. Os fragmentos amplificados pela PCR foram submetidos ao sequenciamento genético e uma de pomba-de-asa-branca (*Patagioenas picazuro*) foi positiva para *Chlamydia avium*. A análise dos demais fragmentos enviados para sequenciamento foi inconclusiva para identificação da espécie, porém, em sete amostras referentes a três maritacas (*Psittacara leucophthalmus*), uma arara canindé (*Ararauna*), um gavião carijó (*Rupornis magnirostris*), um carcará (*Caracara Plancus*) e um periquito do encontro amarelo (*Brotogeris chiriri*), a análise foi indicativa de que elas podem estar relacionadas à família *Chlamydiaceae*. Este é o primeiro relato de detecção de *C. avium* no Brasil.

Palavras-chave: Zoonoses, aves, wild birds.

BRUNO, D. B. MOLECULAR DETECTION AND CLASSIFICATION OF CHLAMYDIA SPP. IN FREE-LIVING WILD BIRDS. 2022. 14f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Avian chlamydiosis is caused by bacteria of the *Chlamydiaceae* family. It is an important disease of several species of birds with worldwide occurrence, including Brazil, however there are limited knowledge related to epidemiological data of avian chlamydiosis. In addition to the birds, *Chlamydia* spp. infect other animals and humans. Chlamydiosis is commonly caused by *Chlamydia psittaci*, but recently new species infecting birds have been recognized. This study aimed to evaluate the occurrence of *Chlamydia* spp. in wild birds from the city of Araçatuba. Cloacal swabs of 150 birds of different orders were analyzed. Birds have been sent for assistance at the Mata Ciliar Association – Wild Animal Recovery Center (CRAS), linked to the Faculty of Veterinary Medicine of UNESP, Araçatuba campus. All 150 samples were examined using two molecular detection and characterization protocols: 1) specific amplification of a partial fragment of the OMPa gene of *C. psittaci* by real-time polymerase chain reaction (PCR); 2) PCR for specific amplification of a partial fragment of the 16S rRNA gene from bacteria of the *Chlamydiaceae* family, followed by genetic sequencing. All samples submitted to real-time PCR for *C. psittaci* were negative. Specific PCR for the *Chlamydiaceae* family was positive in 20 samples. Genetic sequencing identified *Chlamydia avium* in one sample from a white-winged dove (*Patagioenas picazuro*). The analysis of the other fragments sent for sequencing was inconclusive for the identification of the bacteria species, however, in seven samples from three parrots (*Psittacara leucophthalmus*), a blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*), a carijó hawk (*Rupornis magnirostris*), a caracara (*Caracara plancus*) and a yellow-tailed parakeet (*Brotogeris chiriri*), genetic sequencing was indicative that they may be related to the *Chlamydiaceae* family. This is the first report of *C. avium* in Brazil.

Keywords: Zoonosis, bird, wild birds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição do número de amostras analisadas, de acordo com a ordem das aves.....	21
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Brasil, com destaque ao estado de São Paulo, e mapa do estado de São Paulo, destacando todas as cidades às quais pertencem as amostras utilizadas na pesquisa e a quantidade de amostras referente a cada cidade.....	22
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2 CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>CHLAMYDIA</i> SPP. EM AVES SELVAGENS DE VIDA LIVRE .	17
2.1 Resumo	17
2.2 Abstract.....	18
2.3 Introdução	19
2.4 Material e Métodos.....	20
2.4.1 Amostras fecais	20
2.4.2 Pesquisa e classificação molecular de <i>Chlamydia</i> spp.....	21
2.5 Resultados	22
2.6 Discussão	24
2.7 Conclusão	27
2.8 Agradecimentos	27
2.9 Referências.....	28
APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	31
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	33
ANEXO B – NORMAS DE SUBMISSÃO	34

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país rico em biomas e contém uma grande biodiversidade de fauna e flora. O Cerrado possui diversa variedade de aves, onde é possível encontrar 935 espécies, das quais 148 são exclusivas desse ecossistema (LIMA, 2018).

De acordo com o Comitê Brasileiro de Registro Ornitológicos, no último levantamento realizado, foi determinada a ocorrência de 1.919 espécies de aves no Brasil (PIACENTIN, 2015).

A clamidiose, uma doença infecciosa de aves, mamíferos e répteis, e a psitacose, denominação usada quando a doença ocorre em humanos, é causada por bactérias do gênero *Chlamydia*, que apresentam o formato de um cocobacilo e coloração Gram-negativa. O envoltório celular de *Chlamydia* spp. é semelhante à parede celular de outras bactérias Gram-negativas, exceto por não possuírem peptidoglicano. Não possuem capacidade de obter energia mediante atividades metabólicas, por esse motivo, são classificadas como intracelulares obrigatórias (PROENÇA et al., 2011; BRAZ, 2014).

Ao longo dos últimos anos, os microrganismos da família *Chlamydiaceae* foram classificados e reclassificados quanto ao seu gênero, devido a indefinições sobre as diferenças de replicação, aspectos morfológicos e pelos métodos necessários para identificação de cada espécie (PICOLLI et al., 2021). Uma padronização em um único gênero, *Chlamydia*, foi proposta por Sachse et al. (2015), tornando-se o padrão utilizado atualmente.

Inicialmente, *Chlamydia* spp. foi classificada como sendo um vírus e, posteriormente, como *Rickettsia*. Pertence à família *Chlamydiaceae*, que é composta pelo gênero *Chlamydia*, que contém 17 espécies (PROENÇA et al., 2011; LAROUCAU et al., 2019; CHAIWATTANARUNGRUENGPAN et al., 2021).

Chlamydia psittaci é uma bactéria que causa doença respiratória ou sistêmica em aproximadamente 465 espécies de aves, com ocorrência em vários

países (KALETA E TADAY, 2003). As maiores taxas de infecção e de mortalidade são encontradas em psitacídeos (STOKES et al., 2021).

Existem diversos relatos de infecção por *C. avium* em pombos na Europa (SARIYA 2015, BURTA 2018, KIK 2020, GOLESTANI 2020, POPELIN-WEDLARSKI 2020); apesar de *C. avium* ser uma espécie de *Chlamydia* com descrição relativamente recente, ela deve ser considerada em pesquisas de doenças aviárias, pois os dados epidemiológicos e potencial zoonótico dessa espécie não foram bem estabelecidos. *Chlamydia avium* pode ainda estar associada a casos de clamidiose humana, assim como a infecções em planteis relacionados à conservação de espécies em extinção e em aviários comerciais.

As informações sobre a ocorrência da clamidiose em aves no Brasil, assim como nos demais países da América do sul, como Argentina, Uruguai, Bolívia e Chile, são escassas. Nos Estados Unidos, a clamidiose está na lista da Organização Mundial de Saúde Animal, sendo uma doença de notificação obrigatória para animais terrestres ou aquáticos; a notificação deve ocorrer em um prazo de 48 horas (FERREIRA, 2014).

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 todos os indivíduos que têm contato com aves são considerados como grupos de risco para a doença. O período de incubação da infecção por *C. psittaci* no homem é variável, podendo oscilar de uma a quatro semanas (EUGSTER, 1980). Indivíduos imunossuprimidos, com problemas respiratórios graves e crônicos ou idosos, tem o maior risco de desenvolver a doença (RASO, 2014).

O diagnóstico precoce em humanos é fundamental para a resposta terapêutica satisfatória e deve ser considerado, especialmente em casos de pneumonia que evoluem de modo insatisfatório, que não respondem à terapia antimicrobiana e cujo histórico sugere a exposição a aves. Casos graves e fatais da doença estão relacionados a diagnósticos tardios (MOSCHIONI et al., 2001). Casos fatais em humanos positivos para clamidiose ocorrem em até 25% dos

pacientes não tratados e em menos de 1% quando tratados corretamente (PROENÇA et al., 2011).

A transmissão da clamidiose entre as aves ocorre por meio de inalação ou ingestão do microrganismo em suspensão e por contato direto ou indireto com as penas, fezes e secreções respiratórias contaminadas. Também há evidências de transmissão vertical pelo ovo, e com menor probabilidade, por picada de insetos. A infecção ocorre inicialmente quando os corpos elementares presentes nos restos de penas e excreções se dispersam no ambiente pela circulação do ar, infectando dessa maneira as células epiteliais dos indivíduos suscetíveis (BRAZ, 2014).

Chlamydia spp. possui duas formas metabólicas distintas: o corpo reticular (CR) e o corpo elementar (CE). O CR é intracelular, com metabolismo ativo. O CE é a forma infecciosa do microrganismo, metabolicamente inerte, e pode ser encontrado no meio externo (PICCOLLI et al., 2021).

O ciclo biológico tem início pela endocitose do corpo elementar pela célula hospedeira, onde há diferenciação em corpo reticular, que se divide por divisão binária e forma microcolônias, denominadas corpúsculos de inclusão ou corpos de Levintal-Collie-Lilie (LCL), contendo de 100 a 500 bactérias por célula. Após a maturação, que varia de 24 a 48 horas, os corpos reticulares diferenciam-se novamente em corpos elementares que, por meio de lise celular, são liberados no meio ambiente, completando assim todo o ciclo de desenvolvimento (GUERLACH, 1994; PROENÇA et al., 2011).

Chlamydia spp. penetra no organismo e tem disseminação pela corrente sanguínea, podendo ser encontrada no parênquima pulmonar e nas células retículo-endoteliais do baço e do fígado (BORGES et al., 2020).

O período de incubação da clamidiose pode variar de dias a semanas e tem relação com a virulência do agente, com a espécie acometida e condição de saúde da ave. A doença clínica se manifesta após a exposição a fatores predisponentes, como manejo inadequado, má-nutrição, transporte errôneo, excesso populacional e remoção do habitat natural (PROENÇA et al., 2011).

Chlamydia spp. tem sensibilidade ao calor, mas os CEs, quando protegidos por debrís orgânicos presentes, como nas fezes ou em secreções,

são resistentes por bastante tempo e podem sobreviver por até um mês no meio ambiente (RASO, 2014).

Os CEs não possuem resistência a desinfetantes de uso comum, como compostos de amônia quaternária e etanol 70%, calor e incidência de luz solar direta, porém podem permanecer viáveis em excreções secas de animais por longos períodos ou por vários dias em água em temperatura ambiente (PROENÇA et al., 2011).

Os sinais clínicos da clamidiose podem ser manifestados de maneira aguda, subaguda, crônica ou assintomática (PROENÇA et al., 2011). Uma ave infectada pode ser portadora assintomática por longos períodos, representando o risco de uma importante fonte de infecção para outras aves e os humanos (ARAUJO et al., 2019).

A clamidiose não possui sinais clínicos patognomônicos em aves, o que resulta em dificuldade para obtenção de um diagnóstico definitivo e em uma taxa de prevalência subestimada. Apesar disso, um diagnóstico acurado e rápido é necessário devido à alta mortalidade que pode ocorrer aves e ao seu potencial zoonótico (CASAGRANDE, 2014).

As formas subaguda ou crônica da clamidiose são frequentes em espécies de aves com baixa suscetibilidade à infecção ou após infecção com cepas de virulência baixa a moderada (PROENÇA et al., 2011). Os casos de desenvolvimento da forma clínica estão ligados a uma diversidade de fatores, como a espécie afetada, sorotipo, virulência, grau de exposição à bactéria, porta de entrada, idade da ave, status imunológico do hospedeiro e presença de doenças concomitantes (PROENÇA et al., 2011; ARAUJO et al., 2019).

Nas manifestações aguda e subaguda da clamidiose, as aves podem apresentar anorexia, letargia, plumagem eriçada, desidratação, diarreia verde amarelada, blefarite e conjuntivite; também podem apresentar coriza, espirros e dispneia, devido à pneumonia e aerossaculite, ou podem vir a óbito de modo repentino. Na forma crônica da doença os sinais são mais discretos; as aves demonstram apatia, conjuntivite, emagrecimento progressivo e alterações respiratórias discretas. Como o fígado geralmente é afetado, a coloração das

penas pode ser alterada em aves cronicamente infectadas. Na forma inaparente, as aves não manifestam sinais clínicos, mas permanecem como portadoras e são capazes de eliminar o agente por longos períodos (PROENÇA et al., 2011; BRAZ, 2014).

A técnica de isolamento e identificação de *Chlamydia* é pouco utilizada, por se tratar de uma bactéria intracelular obrigatória e que necessita ser cultivada em linhagens celulares ou ovos embrionados, em laboratórios com alto nível de biossegurança, o que dificulta a utilização desse meio de diagnóstico na rotina de atendimentos. As principais técnicas utilizadas são as moleculares e exames sorológicos (PROENÇA et al., 2011; CASAGRANDE et al., 2014). A confirmação do diagnóstico da infecção por *Chlamydia* por testes sorológicos requer um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos, após coletas de duas amostras com intervalo de no mínimo duas semanas (RASO, 2014).

O diagnóstico de infecção por *Chlamydia* pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) é utilizado para diagnóstico da infecção em humanos, aves e em outras espécies de animais, pelo fato de a PCR apresentar alta sensibilidade e especificidade. As amostras mais utilizadas para o diagnóstico são provenientes de fezes e suabes cloacal 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; por esse motivo, há a recomendação de colheita seriada do material a ser analisado (GODOY, 2007; ARAUJO et al., 2019).

O tratamento preconizado para a clamidiose aviária é a administração de antibióticos da classe das tetraciclina, sendo a doxicilina, que atua principalmente durante a fase de replicação da bactéria, uma droga de eleição. O tratamento administrado na ave deve ter duração de 45 dias, com a dose de 25-50 mg/kg, para a maioria das espécies, por via oral, a cada 24 horas. Tratamentos alternativos têm sido descritos, como protocolos baseados no uso de macrolídeos e quinolonas, com destaque aos antibióticos azitromicina e enrofloxacina (PROENÇA et al., 2011; BORGES et al., 2020).

Os corpos elementares não possuem sensibilidade à antibioticoterapia, devido ao fato de não possuírem metabolismo ativo, o que pode influenciar na eficácia do tratamento (BORGES et al., 2020). Por essa razão, mesmo a ave recebendo o tratamento adequado, ela pode continuar como portadora de *Chlamydia* (RASO, 2014).

De acordo com Araújo et al. (2019), a implementação de limpeza e medidas de desinfecção deve ser rigorosa em locais de atendimento e tratamento de aves, locais de reprodução comercial e de quarentena e em locais que possuem movimentação de aves migratórias, a fim de evitar e controlar a disseminação de *C. psittaci* no ambiente e para outros animais e humanos.

Como medidas de controle e prevenção, se destacam a importância de evitar aproximar aves de diferentes origens e recém-adquiridas, sem antes realizar período de quarentena, e isolar possíveis aves doentes do restante do plantel. O descarte de materiais que não possibilitam uma adequada desinfecção deve ser realizado, como por exemplo, poleiros de madeira presentes nos recintos (BORGES et al., 2020).

O uso do avental, máscara, luvas e óculos é recomendado durante o manejo e manuseio das aves, para evitar a inalação de partículas infecciosas pelos tutores e funcionários que lidam com os animais doentes. Essas recomendações se estendem tanto a aos médicos veterinários, quanto aos tratadores de aves que trabalham com a alimentação das mesmas e até mesmo aos humanos com hábitos de cortar grama sem o coletor adequado, onde pode ser favorecido a dispersão de corpos elementares e a ocorrência da zoonose (STOKES, 2021).

Pesquisas relacionadas às bactérias da família *Chlamydiaceae* vêm sendo desenvolvidas em todo o mundo. No Brasil, já foram desenvolvidos alguns estudos, porém ainda são escassas as informações relacionadas à infecção por *Chlamydia* spp. em aves de vida livre. Visto que a clamidiose aviária pode ser uma doença de importância na conservação e manutenção das espécies aviárias, além de sua relevância em saúde pública, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de *Chlamydia* spp. em aves de vida livre da região noroeste do estado de São Paulo.

2 CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE *CHLAMYDIA* SPP. EM AVES SELVAGENS DE VIDA LIVRE

BRUNO, D. B. DETECÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE *CHLAMYDIA* SPP. EM AVES SELVAGENS DE VIDA LIVRE. 2022. 14f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

2.1 Resumo

A clamidiose aviária é uma importante doença causada por bactérias da família *Chlamydiaceae*. Acomete várias espécies de aves em diversos países, incluindo o Brasil, no entanto ainda há escassez de informações relacionadas à epidemiologia da infecção por *Chlamydiaceae* em aves. Além das aves, *Chlamydia* spp. pode infectar outros animais e o homem. Comumente, a clamidiose é causada por *Chlamydia psittaci*, porém, recentemente, foram reconhecidas novas espécies acometendo aves. Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de bactérias do gênero *Chlamydia* em aves de vida livre da cidade de Araçatuba e região. Foram analisados suabes cloacais de 150 aves de diversas ordens, que foram enviadas para atendimento na Associação Mata Ciliar – Centro Recuperação de Animais Silvestres (CRAS), vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, campus de Araçatuba. Todas as 150 amostras foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real, para amplificação específica de um fragmento parcial do gene OMPa de *C. psittaci*, e à PCR para amplificação específica de um fragmento parcial do gene 16S rRNA de bactérias da família *Chlamydiaceae*, seguida de sequenciamento genético. Todas as amostras submetidas à PCR em tempo real para *C. psittaci* foram negativas. A PCR específica para a família *Chlamydiaceae* foi positiva em 20 amostras. Os fragmentos amplificados pela PCR foram submetidos ao sequenciamento genético e uma de pomba-de-asa-branca (*Patagioenas picazuro*) foi positiva para *Chlamydia avium*. A análise dos demais fragmentos enviados para sequenciamento foi inconclusiva para identificação da espécie, porém, em sete amostras referentes a três maritacas (*Psittacara leucophthalmus*), uma arara canindé (*Ara ararauna*), um gavião carijó (*Rupornis magnirostris*), um carcará (*Caracara Plancus*) e um periquito do encontro amarelo (*Brotogeris chiriri*), a análise foi indicativa de que elas podem estar relacionadas à família *Chlamydiaceae*. Este é o primeiro relato de detecção de *C. avium* no Brasil.

Palavras-chave: Clamidiose, Pombos, *Chlamydia avium*, Zoonose.

2.2 Abstract

Avian chlamydiosis is caused by bacteria of the *Chlamydiaceae* family. It is an important disease of several species of birds with worldwide occurrence, including Brazil, however there are limited knowledge related to epidemiological data of avian chlamydiosis. In addition to the birds, *Chlamydia* spp. infect other animals and humans. Chlamydiosis is commonly caused by *Chlamydia psittaci*, but recently new species infecting birds have been recognized. This study aimed to evaluate the occurrence of *Chlamydia* spp. in wild birds from the city of Araçatuba. Cloacal swabs of 150 birds of different orders were analyzed. Birds have been sent for assistance at the Mata Ciliar Association – Wild Animal Recovery Center (CRAS), linked to the Faculty of Veterinary Medicine of UNESP, Araçatuba campus. All 150 samples were examined using two molecular detection and characterization protocols: 1) specific amplification of a partial fragment of the OMPa gene of *C. psittaci* by real-time polymerase chain reaction (PCR); 2) PCR for specific amplification of a partial fragment of the 16S rRNA gene from bacteria of the *Chlamydiaceae* family, followed by genetic sequencing. All samples submitted to real-time PCR for *C. psittaci* were negative. Specific PCR for the *Chlamydiaceae* family was positive in 20 samples. Genetic sequencing identified *Chlamydia avium* in one sample from a white-winged dove (*Patagioenas picazuro*). The analysis of the other fragments sent for sequencing was inconclusive for the identification of the bacteria species, however, in seven samples from three parrots (*Psittacara leucophthalmus*), a blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*), a carijó hawk (*Rupornis magnirostris*), a caracara (*Caracara plancus*) and a yellow-tailed parakeet (*Brotogeris chiriri*), genetic sequencing was indicative that they may be related to the *Chlamydiaceae* family. This is the first report of *C. avium* in Brazil.

Keywords: Chlamydiosis, Pigeons, *Chlamydia avium*, Zoonosis.

2.3 Introdução

¹O Brasil possui uma grande biodiversidade relacionada à avifauna, sendo que na Amazônia é encontrado o maior número de espécies, seguida pela Mata Atlântica e Cerrado. Entre as regiões com espécies ameaçadas de extinção, o Cerrado possui o segundo maior número (Marini, 2005). Devido à sua alta popularidade, a Classe Aves é a que apresenta o maior número de espécies mantidas como animais de estimação, sendo procedentes, em grande parte, de tráfico e comércio ilegal (Castro et al., 2013).

Ao longo dos anos, as aves vêm sendo mantidas em maior frequência como animais de estimação e, por consequência, em contato próximo aos seres humanos, o que leva a uma maior probabilidade de transmissão de patógenos bacterianos zoonóticos. Dentre as possíveis zoonoses aviárias, a clamidiose é uma doença que se destaca, com impacto significativo em saúde pública (Scherer et al., 2021).

A família *Chlamydiaceae* é constituída pelo gênero *Chlamydia*, que se caracteriza por organismos intracelulares obrigatórios distinguidos por um ciclo de desenvolvimento bifásico, composto pelas fases de replicação e infecção, nas quais são originados o corpo reticular (CR) e o corpo elementar (CE), respectivamente (Cheong et al., 2019; Laroucau et al., 2019).

Chlamydia spp. são bactérias gram-negativas que causam infecções em humanos e animais, com diferentes manifestações clínicas, conforme a espécie e suscetibilidade do hospedeiro. O gênero *Chlamydia* compreende 17 espécies, que foram propostas ou formalmente classificadas: *Chlamydia abortus*, *Chlamydia avium*, *Chlamydia buteonis*, *Chlamydia caviae*, *Chlamydia crocodili*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia gallinacea*, *Chlamydia ibidis*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia poikilothermis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia serpentis*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia testudinis* e *Chlamydia trachomatis* (Laroucau et al., 2019; Chaiwattananarungruengpaisan et al., 2021).

Nas aves, o termo clamidiose ou ornitose se refere à doença causada por espécies de *Chlamydia*; em humanos, a denominação mais comum, relacionada às infecções por espécies zoonóticas, é psitacose, que faz referência às aves da ordem *Psitaciformes* e à espécie *C. psittaci*, ambas frequentemente relacionadas a infecções em humanos (Laroucau et al., 2019). A maior prevalência da clamidiose é em aves jovens ou imunossuprimidas. A transmissão tem caráter horizontal, tendo como porta de entrada os tratos digestório e respiratório. Alta prevalência tem sido observada em aves portadoras, em pesquisas desenvolvidas em criadouros brasileiros (Freitas et al., 2011).

Dentre as espécies descritas, *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* estão comumente relacionadas a infecções em humanos, sendo a *C. psittaci* frequentemente observada em casos de zoonoses relacionadas às aves (Sachse et al., 2014; Laroucau 2019). As espécies que infectam aves são *C. psittaci*, *C. ibidis*, *C. avium*, *C. gallinacea*, *C. pecorum* e *C. muridarum*, que já foram identificadas em mais de 70 espécies de aves (Cheong et al., 2019; Stokes, 2021).

Apesar de a infecção em aves ser mais frequentemente relacionada a *C. psittaci*, recentemente, foram reportados casos de clamidiose aviária causada por três espécies de

Chlamydia: *C. gallinacea*, *C. avium* e *C. buteonis*. Em relação a essas três espécies, há escassez de dados relacionados à sua variedade de hospedeiros aviários e potencial zoonótico (Sachse et al., 2014; Laroucau et al., 2019; Popelin-Wedlarski et al., 2020).

Não há sinais clínicos patognomônicos da clamidiose e é difícil definir um diagnóstico definitivo sem a realização de exames laboratoriais, o que resulta em taxas de prevalência subestimadas. Apesar disso, um diagnóstico acurado da infecção por *Chlamydia* spp. é necessário devido à alta mortalidade que pode ocorrer em aves e ao seu potencial zoonótico (Casagrande et al., 2014).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é utilizada para diagnosticar a infecção por *Chlamydia* spp. em humanos, aves e em outras espécies de animais, por apresentar alta sensibilidade e especificidade. As amostras mais utilizadas para diagnóstico são constituídas por fezes e suabes cloacais 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; por esse motivo, é recomendável a colheita seriada do material a ser analisado (Godoy, 2007; Araújo et al., 2019).

Pesquisas relacionadas às bactérias da família *Chlamydiaceae* vêm sendo desenvolvidas em todo o mundo. No Brasil, já foram desenvolvidos alguns estudos, porém ainda são escassas as informações relacionadas à infecção por *Chlamydia* spp. em aves de vida livre. Visto que a clamidiose aviária pode ser uma doença de importância na conservação e manutenção das espécies aviárias, além de sua relevância em saúde pública, o presente estudo objetivou avaliar a ocorrência de *Chlamydia* spp. em aves de vida livre da região de Araçatuba, São Paulo.

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Amostras fecais

Todos os procedimentos foram realizados conforme os critérios éticos exigidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), recebendo aprovação no Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araçatuba (Processo FOA nº 00273-2020).

As aves deste estudo são provenientes de atendimentos realizados na Associação Mata Ciliar — Centro Recuperação de Animais Silvestres (CRAS) — vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, campus de Araçatuba. O registro de cada ave foi feito de maneira individual, em ficha contendo a espécie, nome científico e estimativa de idade. Foram registrados também os dados sobre a origem e o órgão competente que realizou a entrega para atendimento.

Foi utilizada uma técnica de amostragem por conveniência. As amostras foram constituídas por 150 suabes cloacais colhidos de 150 aves de diversas ordens, no período de abril de 2020 a outubro de 2021. A colheita foi realizada no momento da chegada das aves para o atendimento, independentemente da apresentação de sinais clínicos. Os

suabes foram armazenados secos, sem conservantes, em um microtubo, a -20° C, até a extração do DNA genômico.

2.4.2 Pesquisa e classificação molecular de *Chlamydia* spp.

Os suabes foram agitados em vórtex em um microtubo contendo 350 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e centrifugadas a 10.000 X g por 5 min. O suabe foi removido do tubo e o DNA foi extraído de aproximadamente 200 µl do tampão TE contendo o sedimento, utilizando o DNeasy *Blood & Tissue kit* (Qiagen).

Foi realizada a PCR em tempo real específica para detecção e identificação de *C. psittaci*, de acordo com o protocolo definido por Heddemma et al. (2015), para amplificação de um fragmento de 174 a 183 pb do gene *ompA*, usando os primers CPVDF 5'-GTC AAG AGC AAC TTT TGA TGC-3' e CPVDR 5'-ATT TTG TTG ATC TGA ATC GAA GC-3', o SYBR Green JumpStart® Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich), 500 nM de cada primer e 2,5 µl de DNA alvo, em um volume total de 25 µl. Como controles negativo e positivo, foram utilizados água ultrapura e um fragmento de DNA sintético contendo uma sequência do gene *ompA* de *C. psittaci* (GenScript), respectivamente. As reações foram realizadas no sistema para PCR em tempo real CFX96® (Bio-Rad), em microtubos para PCR em tempo real de 0,1 ml (Scientific Specialties), em um total de 40 ciclos, com desnaturação inicial a 94° C por 30 s, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94° C por cinco segundos, anelamento e extensão simultâneas a 60° C por 60 segundos, seguindo-se a análise da curva de dissociação do fragmento amplificado, com temperatura variando de 65° C a 95° C, incremento de 0,5° C e leitura por cinco segundos. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo.

A PCR específica para detecção de bactérias da família *Chlamydiaceae* foi realizada para a amplificação de um fragmento de 194 pb do gene 16S rRNA, com os primers 16SIGF 5' CGGCGTGGATGAGGCAT-3' e 16SIGR 5'-TCAGTCCCAGTGTTGGC-3' (EVERETT et al., 1999), usando o JumpStart® Taq ReadyMix® (Sigma Aldrich), 200 nM de cada primer e 2,5 µl de DNA alvo, em um volume total de 25 µl. As reações foram realizadas no termociclador SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific), em microtubos para PCR de 0,2 ml, em um total de 40 ciclos, com desnaturação inicial a 94° C por 30 s seguida de 40 ciclos com desnaturação a 94° C por 30 s, anelamento a 51° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 45 segundos. Como controle positivo foi utilizado um fragmento de DNA sintético contendo uma sequência do gene 16S rRNA de *C. psittaci* (GenScript). Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. Todas as amostras foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado pelo GelRed® (Biotium). Os amplicons foram purificados usando o ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific) e sequenciados nas duas direções usando o ABI Prism® Dye Terminator 3.1, no sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems), no Centro de Sequenciamento e Genômica Funcional da UNESP, Campus de Jaboticabal. As sequências foram analisadas utilizando o CodonCode Aligner versão 7.1.1 (CodonCode Corporation).

As sequências obtidas por sequenciamento genético foram comparadas com sequências homólogas publicadas no *GenBank*, com auxílio do BioEdit *Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e do *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

2.5 Resultados

Foram realizadas análises de 150 amostras de aves de diversas ordens, sendo mais frequentes as espécies pertencentes às ordens *Columbiformes*, *Psittaciformes*, *Falconiformes* e *Strigiformes* (Tab.1).

As amostras utilizadas nesta pesquisa são resultantes de aves oriundas de diversas cidades pertencentes à região administrativa de Araçatuba, no estado de São Paulo, Brasil, que é constituída pelas cidades de Araçatuba, Birigui, Penápolis, Guararapes, Valparaíso, Buritama, Clementina, Santo Antônio do Aracanguá e Turiúba (Fig.1).

Todas as amostras deste trabalho foram analisadas por PCR em tempo real específica para *C. psittaci* e o resultado encontrado em todas as análises foi negativo.

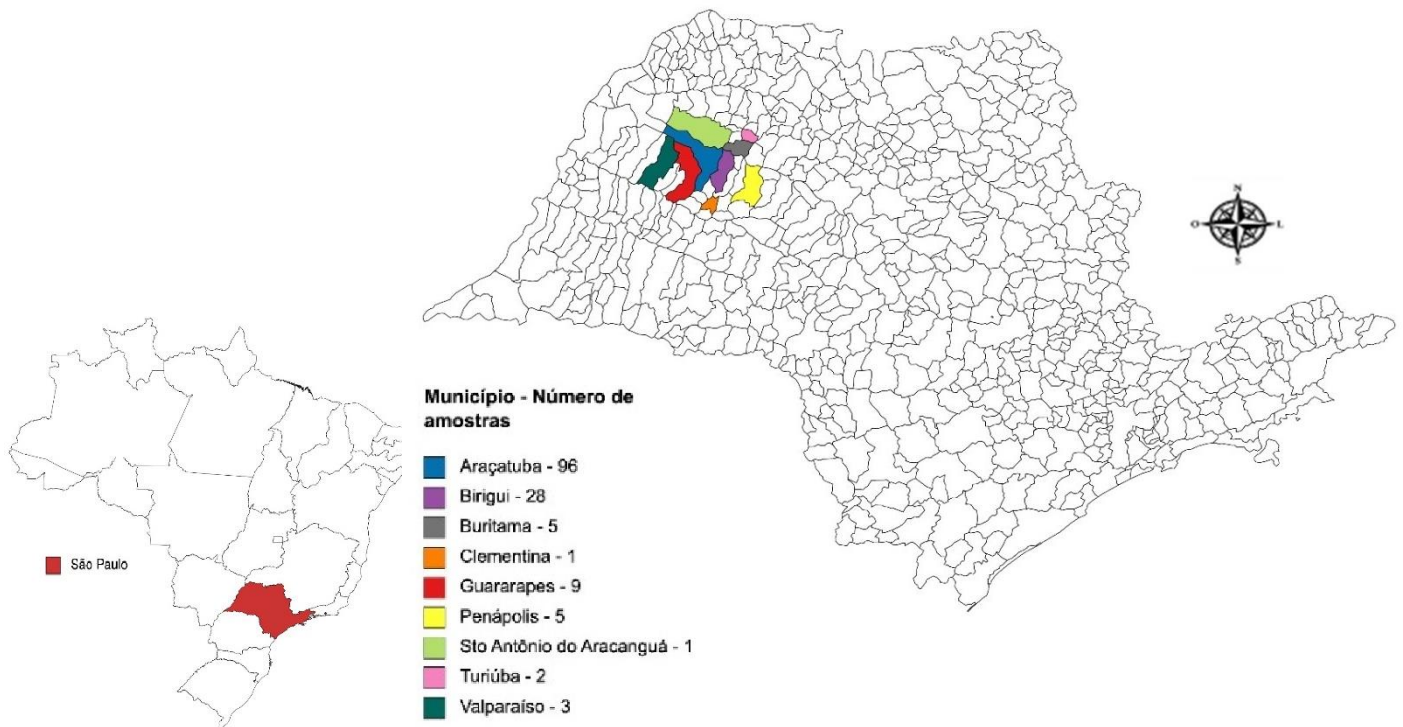
A PCR específica para a família *Chlamydiaceae* identificou 13,3% (20/150; IC: 9–20%) de amostras positivas. Os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento e uma de pomba-de-asa-branca (*Patagioenas picazuro*) foi positiva para *C. avium* (0,7%; 1/150; IC: 0–4%). A análise dos demais fragmentos enviados para o sequenciamento genético foi inconclusiva para identificação da espécie, porém, em sete amostras referentes a três maritacas (*Psitacara leucopthalmus*), uma arara canindé (*Ara ararauna*), um gavião carijó (*Rupornis magnirostris*), um carcará (*Caracara Plancus*) e um periquito do encontro amarelo (*Brotogeris chiriri*), as sequências apresentaram similaridade genética com microrganismos pertencentes à família *Chlamydiaceae* ou a outros microrganismos geneticamente relacionados.

Tabela 1. Distribuição do número de amostras analisadas de acordo com a ordem das aves.

Ordem	Quantidade de amostras
<i>Accipitriformes</i>	1
<i>Caprimulgiformes</i>	1
<i>Cathartiformes</i>	3
<i>Columbiformes</i>	11
<i>Falconiformes</i>	13
<i>Gruiformes</i>	3
<i>Nyctibiiformes</i>	4
<i>Passeriformes</i>	10
<i>Pelecaniformes</i>	2
<i>Piciformes</i>	9
<i>Psittaciformes</i>	81
<i>Strigiformes</i>	12
Total	150

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 – Mapa do Brasil, com destaque ao estado de São Paulo e mapa do estado de São Paulo, com destaque as cidades que pertencem as amostras utilizadas na pesquisa e a quantidade de amostras referente a cada cidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O pombo (*Patagioenas picazuro*) positivo para *C. avium* foi entregue para atendimento pela polícia ambiental no dia 5 de março de 2021, após ser encontrado caído no chão, em via pública, na cidade de Birigui - SP. Após o exame clínico, foi constatada incapacidade de voo; no dia 6 de março, optou-se pela eutanásia, por ele não estar apto para soltura. Durante a necropsia, não foram observadas alterações macroscópicas dignas de nota.

2.6 Discussão

Nossos resultados demonstram a presença de infecção por *C. avium* na região de Araçatuba, estado de São Paulo. Braz et al. (2014) realizaram a pesquisa de *Chlamydia* spp. em aves de diversas ordens da mesma região pesquisada neste estudo e relataram positividade de 4,2% (17/403), somente para *C. psittaci*. A diferença entre os resultados desses dois trabalhos pode ser decorrente da maior variedade relacionada à origem das amostras colhidas por Braz et al. (2014).

Assim como foi identificada uma amostra positiva pertencente à uma ave da ordem *Columbiformes* neste trabalho, existem relatos de diferentes espécies de pombos diagnosticadas com clamidiose aviária, em ampla distribuição geográfica (Laroucau et al., 2019; Piccolli et al., 2021). Em parte significativa desses relatos, *C. psittaci* é a espécie detectada, porém, nos últimos anos, foi descrita a identificação de outras espécies de *Chlamydia* acometendo pombos, como em um estudo realizado na Alemanha no ano de 2012, com pombos de vida livre, usando suabes cloacais de 570 aves, dos quais 9,3% correspondiam a amostras positivas para *Chlamydia* spp., sendo *C. psittaci* a espécie predominante (75% das amostras positivas); porém, dentre as amostras, foram evidenciadas três amostras de *C. abortus*, uma amostra de *C. pecorum* e uma amostra de *C. trachomatis* genótipo E.

De forma semelhante à identificação de sete amostras identificadas neste trabalho como prováveis bactérias da família *Chlamydiaceae*, Sachse et al. (2012) relataram a detecção de 19,5% (25/128) de amostras de pombos positivas pela PCR específica para a família *Chlamydiaceae*, cujas espécies não puderam ser identificadas pelo sequenciamento genético, e propuseram que essas amostras podem estar relacionadas à família *Chlamydiaceae* ou a algum outro microrganismo geneticamente relacionado.

A PCR em tempo real realizada em todas as amostras desta pesquisa não evidenciou positividade para *C. psittaci*, mesmo em aves das ordens *Psittaciformes* e *Columbiformes*, que já foram identificadas como espécies suscetíveis à infecção por *C. psittaci* (Stokes et al., 2021). No entanto, Raso et al. (2006), em pesquisa desenvolvida com filhotes de psitacídeos no estado do Mato Grosso do Sul, relataram positividade de 26% (12/45) e 6% (2/32) em filhotes de araras azul e em filhotes de papagaio, respectivamente. Vaz et al. (2021) relataram positividade de 3,4% (5/147) para *C. psittaci* em filhotes de papagaios provenientes de quatro estados brasileiros. Em ambas as pesquisas citadas, os animais são filhotes que ainda estavam no ninho, o que pode ter contribuído para uma maior prevalência, pela faixa etária a que pertenciam. Porém, em pesquisa com filhotes de papagaio da Amazônia, realizada no Paraná (Vaz et al., 2017), usando amostras colhidas de filhotes que também estavam no ninho, todas as 74 amostras foram negativas, o que sugere a hipótese de que, apesar de a infecção por *C. psittaci* ser amplamente identificada em psitacídeos, sua prevalência em aves de vida livre pode ser variável em função do período reprodutivo e da idade e espécie de ave.

Apesar de *C. avium* ser uma espécie com descrição relativamente recente, essa espécie deve ser considerada em pesquisas de doenças aviárias, pois as informações sobre a epidemiologia e o potencial zoonótico da infecção por *C. avium* são escassas. Um surto de clamidiose em pombos (*Patagioenas picazuro*) cativos sintomáticos, infectados por *C. avium*, foi descrito na Holanda (Kik et al., 2020). Nesse episódio, todas os 11 pombos apresentavam penas eriçadas, anorexia e emagrecimento, e a evolução dos casos, mesmo

com protocolo de tratamento estabelecido, não foi favorável, resultando em óbito ou eutanásia de todos os indivíduos. Evidenciou-se que a infecção por *C. avium* pode ser diagnosticada em aves com sinais clínicos diversos (Zardo et al., 2014). A amostra positiva deste estudo é pertencente a um pombo de vida livre, que foi encontrado com sinais de apatia, em perímetro urbano. Apatia é um sinal clínico comum da psitacose, porém não é patognomônico (Araújo et al., 2019). Além disso, animais de vida livre são expostos a diversas ocorrências, como acidentes automobilísticos, predação por outras aves e escassez de alimentos (Lima et al., 2018), que também podem resultar em apatia. Ainda deve se considerar a possibilidade de infecção assintomática nos pombos de vida livre, como observado no trabalho desenvolvido em Belém, estado do Pará (Albuquerque et al., 2021), no qual foram analisadas amostras de pombos em um parque em região urbana, resultando em 22,2% (10/45) de positividade para *Chlamydia* spp., sendo que nenhuma das aves positivas apresentava sinais clínicos.

A positividade encontrada em nossa pesquisa foi de uma ave de vida livre que, devido ao seu quadro clínico desfavorável, foi submetida à eutanásia, sem a realização de exames complementares, portanto não foi possível determinar se havia coinfeção ou lesões traumáticas que pudessem resultar em imunossupressão e favorecer a infecção por *C. avium*, conforme sugerido por Popelin-Wedlarski et al. (2020) em seu relato de caso em um aviário na França, onde quatro araras (*Ara militaris boliviana*) da mesma família foram diagnosticadas com infecção por *C. avium*. De acordo com os autores, infecções primárias virais e parasitárias nas aves eventualmente podem resultar em imunossupressão e maior suscetibilidade das aves a infecções por *C. avium*.

Existem diversos relatos de infecção por *C. avium* em pombos em diversos países na Europa (Sariya et al., 2015; Burta et al., 2018; Kik et al., 2020; Golestani et al., 2020; Popelin-Wedlarski et al., 2020) e no Irã (Golestani et al., 2020). As taxas de prevalência de *C. avium* em aves não estão bem estabelecidas; a positividade de 9,1% (1/11) encontrada nos pombos desta pesquisa é maior que a positividade relatada por outros pesquisadores em aves de vida livre em perímetro urbano, visto que estudos realizados na França e Alemanha, também a partir de coleta de suabes cloacais de pombos urbanos, para pesquisa de *Chlamydia* spp., indicaram a presença de *C. avium* em 3% (4/128) e 8% (10/125), respectivamente, dos indivíduos positivos para *Chlamydiaceae* (Sachse et al., 2015), e em 6% (1/16) em suabes orotraqueais colhidos de pombos no Irã (Golestani et al., 2020).

Em uma pesquisa com pombos de vida livre (28,4%; 23/81) realizada na Holanda (Burta et al., 2018), foi encontrada maior positividade para *C. avium*, quando comparada com a deste trabalho; porém essa pesquisa difere dos demais estudos citados anteriormente, devido ao método de coleta: cada amostra correspondia a um *pool* de fezes frescas de três pombos, o que aumenta a probabilidade de detecção devido à maior variedade de indivíduos. Ainda como discutido pelos autores, a coleta foi realizada em época de nidificação, período que resulta em estresse nas aves e favorece a eliminação de *Chlamydia*. Em nosso trabalho, as coletas foram realizadas durante todo o ano, não havendo sazonalidade definida ou associação com época de reprodução e desenvolvimento das aves.

Este trabalho apresenta algumas limitações: a imprevisibilidade da frequência de aves que seriam enviadas para atendimento durante o período da realização do estudo e, por fim, a grande variedade de espécies de aves, o que levou a um número representativamente pequeno de cada ordem. Além disso, a heterogeneidade das amostras

analisadas neste estudo, relacionada à idade, espécie e família das aves, e ao fato de as aves em sua maioria serem assintomáticas, pode ter influenciado a taxa de positividade. Por outro lado, devido à ocorrência de eliminação intermitente de *C. psittaci* via fezes (Piccolli et al., 2021), o ideal seria a realização de coletas seriadas de amostras fecais, o que não foi possível, pois as condições de alojamento e manejo de aves no CRAS impossibilitavam o isolamento das aves visando a coleta seriada de amostras.

2.7 Conclusão

Diante dos resultados, concluímos que a infecção por *C. psittaci* não foi encontrada nas amostras examinadas neste estudo. *C. avium* está presente em pombos (*Patagioenas picazuro*) de vida livre da cidade de Araçatuba. Este é o primeiro relato da infecção por *C. avium* no Brasil.

2.8 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida ao primeiro autor, e ao CRAS - Associação Mata Ciliar pelo fornecimento das amostras utilizadas neste estudo.

2.9 Referências

- ALBUQUERQUE, K. C. G. P.; RAMOS, B. A.; CRUZ, A. V. et al. *Chlamydia* spp. in free-living domestic pigeons. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, 2021.
- ARAÚJO, S.A.A.; PEREIRA, W.L.A.; SILVA, S.P. et al. Clinical and molecular diagnosis of *Chlamydophila* in captive parrots in Pará State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, p. 2603-2612, 2019.
- BORGES, A. A., GONTIJO, D. A., AMORIN, A. C. A. M. C., & NAVES, K. S. C. Investigation of *Chlamydia psittaci* in pet birds of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*. v. 42., p. 1-7, 2020.
- BRAZ, M.A.; SILVA, D.C.; SANTIAGO, M.E.B. et al. Detecção e classificação molecular de *Chlamydophila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, p. 161-167, 2014.
- BURTA, S. A., RORING, E. R., HEIJNEB, M. *Chlamydia psittaci* and *C. avium* in feral pigeon (*Columba livia domestica*) droppings in two cities in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, v. 38, p.63–66, 2018.
- CASAGRANDE, R.A.; MACHADO, V.R.; SOUZA, S.O. et al. Diagnóstico imunohistoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, p. 885-890. 2014.
- CASTRO, P.F.; FANTONI, D.T.; MATERA, J.M. Estudo retrospectivo de afecções cirúrgicas em aves. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p. 662-668, 2013.
- CHAIWATTANARUNGRUENGPASAN, S., THONGDEE, M., ANUNTAKARUN, S. et al. A new species of *Chlamydia* isolated from Siamese crocodiles (*Crocodylus siamensis*), *PLOS ONE*, v. 16, e0252081, 2021.
- CHEONG, H. C., LEE, C. Y. Q., CHEOK, Y. Y. et al. *Chlamydiaceae*: Diseases in primary hosts and zoonosis. *Microorganisms*, v. 7, p. 2-17, 2019.
- EVERETT, K. D. E; BUSH, R. M.; ANDERSEN, A.A. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 415-440, 1999.
- FREITAS, A.I.A. Tratamento de uma ave doméstica calopsita apresentando quadro clínico de clamidiose - Relato de caso. *PUBVET, Londrina*, v. 5, n. 30, ed. 177, Art. 1195, 2011.
- GODOY, S.N. Psittaciformes (Araras, papagaios, periquito). In: CUBAS, Z.S. et al. *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo: Roca, p. 222-251, 2007.
- GOLESTANI, N., KHOSHKHOO, P. H., HOSSEINI, H. et al. Detection and identification of *Chlamydia* spp. from pigeons in Iran by nested PCR and sequencing. *Iranian Journal of Microbiology*. v. 12, n. 4, p. 331-337, 2020.

GUERLACH, H. *Chlamydia*. In: RITCHIE, BRANSON W.; HARRISON, GREG J.; HARRISON, LINDA R. Avian Medicine: Principles and Application. Lake Worth: Wingers, p.984-996, 1994.

HEDDEMA, E. R., VAN HANNEN, E. J., BONGAERTS, M. et al. Typing of *Chlamydia psittaci* to monitor epidemiology of psittacosis and aid disease control in the Netherlands, 2008 to 2013. Euro Surveillance, v. 20, p. 1-8, 2015.

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.

KIK, M., HEIJNE, M., IJZER, J., GRINWIS, G., PANNEKOEK, Y., GROENE, A. Fatal *Chlamydia avium* infection in captive *Picazuro Pigeons*, the Netherlands. Emerging Infectious Diseases. v. 26, n. 10, p. 2520-2522, 2020.

LAROUCAU, K.; VORIMORE, F.; AAZIZ R. et al. *Chlamydia buteonis*, a new *Chlamydia* species isolated from a red-shouldered hawk. Systematic and Applied Microbiologic, v. 42, n.5, p. 1-7, 2019.

LIMA, N.J; FREITAS, V.M.; SILVA, T.D.P. et al. Revisão Integrativa Sobre os Principais Aspectos do Manejo e Reabilitação de Aves Silvestres. XIII Semana Universitária. XII Encontro de Iniciação Científica. V Feira de Ciência, Tecnologia e Inovação. UNIFIMES. 2018.

MARINI, M.A. Conservação de Aves no Brasil. Megadiversidade. v. 1, n.1, p. 95-101, 2005.

PEPELIN-WEDLARSKI, F., ROUX, A., AAZIZ, R., et al. Captive Psittacines with *Chlamydia avium* Infection. Avian Diseases, v. 64, p. 542–546, 2020.

RASO, T. F. Clamidiose - Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. v. 2. cap. 67. p. 1369-1379.

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. Veterinary Microbiology. v.117, p. 235–241, 2006.

SACHSE, K., LAROUCAU, K. Two more species of *Chlamydia*—does it make a difference? FEMS Pathogens and Diseases, v. 73, p. 1-3, 2015.

SACHSE, K., LAROUCAU, K., VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis. Current Clinical Microbiology Report, v. 2, p 10–21, 2015.

SACHSE, K.; LAROUCAU, K.; RIEGE, K. et al. Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, v. 37, p. 79–88, 2014.

SACHSE, K.; KUEHLEWIND, S.; RUETTGER, A. et al. More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. Veterinary Microbiology, v. 157, p. 476–480, 2012.

SARIYA, L., PROMPIRAM, P., TANGSUDJAI, S. et al. Detection and characterization of *Chlamydophila psittaci* in asymptomatic feral pigeons (*Columba livia domestica*) in central Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. p. 94-97, 2015.

SCHERER, A., SITTA, B. D., SILVA, G. A. M. S., et al. Tráfico de fauna silvestre: um potencializador de risco para a clamidiose, zoonose transmitida por aves. *PUBVET*, v.15, n.07, p, 1-12, 2021.

STOKES, H. S., BERG, M. L., BENNETT, A. T. A Review of chlamydial infections in wild birds. *Pathogens*, v. 10, p. 948, 2021.

VAZ, F.F., SERAFINI, P. P., LOCATELLI-DITTRICHA, R. et al. Survey of pathogens in threatened wild red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Rasa Island, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 747–753, 2017.

VAZ, F.F.; SIPINSKI, E.A.B.; SEIXAS, G.H.F. et al. Molecular Survey of Pathogens in Wild Amazon Parrot Nestlings: Implications for Conservation. *Diversity*, v. 13, p. 272, 2021.

ZARDO E. L., BEHR, E. R., MACEDO, A. et al. Aves nativas e exóticas mantidas como animais de estimação em Santa Maria, RS, Brasil. *Acta Ambiental Catarinense*. v. 11., p. 33-42, 2014.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ARAÚJO, S.A.A.; PEREIRA, W.L.A.; SILVA, S.P. et al. Clinical and molecular diagnosis of *Chlamydomphila* in captive parrots in Pará State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, p. 2603-2612, 2019.

Borges, A. A.; Gontijo, D. A.; Amorin, A. C. A. M. C., et al. Investigation of *Chlamydia psittaci* in pet birds of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, v.42, p. 1-7, 2020.

BRAZ, M.A.; SILVA, D.C.; SANTIAGO, M.E.B. et al. Detecção e classificação molecular de *Chlamydomphila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.66, p.161-167, 2014.

CASAGRANDE, R.A.; MACHADO, V.R., SOUZA, S.O.; WATANABE, T. T. M.; et al. Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em Psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* v. 34, p. 885-890, 2014.

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

FERREIRA, L. L. DETECÇÃO MOLECULAR DA *Chlamydomphila psittaci* EM COLUMBIFORMES E GALLIFORMES DA REGIÃO CENTRO SUL DO ESTADO DE GOIÁS. TESE (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2014.

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, Branson W.; HARRISON, Greg J.; HARRISON, Linda R. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth: Wingers, p.984-996, 1994.

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

PIACENTIN, V.Q; ALEIXO, A.; AGNE, C.E.; et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee. *Revista Brasileira de Ornitologia*, v. 23, p. 91-298, 2015.

PICOLLI R. J., ANDRADE J. A., VIOTT A. M. Clamidiose aviária: Revisão. *PUBVET*. v. 15, n. 8, p.1-10, 2021.

PROENÇA, L. M; FAGLIARI, J. J; RASO, T. F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Ciência Rural*, v.41, n.5, p. 841- 847, 2011.

RASO, T. F. Clamidiose - Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. v. 2. cap. 67. p. 1369-1379.

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*, n.3, v.1, p.391, 2005.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Detecção e classificação molecular de chlamydia psittaci em aves selvagens encaminhadas para atendimento na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP, Campus de Araçatuba**", Processo FOA nº 00273-2020, sob responsabilidade de Marcelo Vasconcelos Meireles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 04 de Março de 2021.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 04 de Março de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 04 de Abril de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Detection and molecular classification of chlamydia psittaci at the college of Veterinary Medicine, UNESP, Campus of Araçatuba**", Protocol FOA nº 00273-2020, under the supervision of Marcelo Vasconcelos Meireles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on March 04, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 04, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 04, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B – NORMAS DE SUBMISSÃO

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 1678-4162 (*on-line*), é editado pela FEPE Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins. Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os textos que necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os artigos aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)*, citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e pelas informações contidos nos artigos. Originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ são imprescindíveis para publicação. O ABMVZ aceita submissão de artigos registrados em servidores *preprints*.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciada. Não é autorizado o uso comercial de resultados de artigos publicados no ABMVZ.

A submissão e a tramitação dos artigos são realizadas exclusivamente *on-line*, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

ORIENTAÇÕES GERAIS

- O ABMVZ recebe submissões de artigos somente redigidos na língua inglesa.
- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de Publicação *on-line* do SciELO – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>, sendo necessário o cadastramento dos autores no referido sistema.
- Toda a comunicação entre os envolvidos nos processos de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica, e o autor responsável pelo artigo será automaticamente informado, por *e-mail*, sobre qualquer mudança de *status* do artigo.
- **Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto** e, quando solicitados pela equipe de editoração, também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 2).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento da inclusão de seu nome no texto submetido e concorde com tal inserção.

- O ABMVZ comunicará automaticamente a cada um dos autores inscritos, via sistema eletrônico, a participação no artigo. Caso um dos autores inscritos não concorde, por escrito, em participar como autor, o artigo será considerado como “Desistência” de um dos autores e sua tramitação será encerrada. Casos omissos serão analisados pelo editor-chefe para deliberação.
- O período para adequação às normas do ABMVZ é de 30 dias; após esse prazo, o artigo será considerado como “Desistência do autor”.
- O ABMVZ estimula que os autores façam, em repositório *preprints*, o depósito e o compartilhamento de dados de pesquisa que sustentam a publicação do artigo. Os dados de pesquisa referem-se a toda e qualquer observação, notas de experimentações, relatórios e outros produtos que possibilitam gerar os resultados da pesquisa. Um exemplo de repositório é o SciELO Data – <https://data.scielo.org>.
- O autor responsável pela submissão de um artigo necessita informar sobre o depósito em um servidor de *preprints* e, obrigatoriamente, encaminhar o DOI correspondente para o ABMVZ. O manuscrito deve informar a licença que autorize compartilhar o material em qualquer suporte ou formato (Creative Commons – CC-BY). SciELO *Preprint* e Emerging Researcher Information são exemplos de servidores nacionais, e MedRxiv de servidor internacional.
- É de responsabilidade do autor de artigo aceito para publicação informar ao servidor *preprints* seu *link* da publicação do ABMVZ.
- Pareceres de avaliadores poderão ser, eventualmente, publicados, se houver interesse do Conselho Editorial do ABMVZ, sempre com anuência dos autores e dos pareceristas.

Tipos de artigos aceitos para submissão

Tipo	Seções	Sugestão de número de referências	Sugestão de número de autores	Sugestão de número de páginas
Artigo científico/ Original Article É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.	Title (português e inglês), Authors and Affiliation (somente na "Title Page"), Resumo, Abstract, Highlights (optional), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (ou Results and Discussion), Conclusions, Acknowledgements (quando houver) e References .	É recomendado que o número de referências não exceda a 20.	É recomendado que o número de autores não exceda a 10.	É recomendado que o número de páginas não exceda a 30, incluindo tabelas e figuras.
Preprint Manuscrito, na forma de artigo científico, depositado em servidores <i>preprints</i> .	Title (português e inglês), Authors and Affiliation (somente na "Title Page"), Resumo, Abstract, Highlights (optional), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (ou Results and Discussion), Conclusions, Acknowledgements (quando houver) e References .	É recomendado que o número de referências não exceda a 20.	É recomendado que o número de autores não exceda a 10.	É recomendado que o número de páginas não exceda a 30, incluindo tabelas e figuras.
Relato de caso/ Case Report Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou em que a ocorrência dos resultados não é planejada.	Title (português e inglês), Authors and Affiliation (somente na "Title Page"), Resumo, Abstract, Highlights (optional), Introduction, Casuistry, Discussion e Conclusions (quando pertinentes), Acknowledgements (quando houver) e References .	É recomendado que o número de referências não exceda a 12.	É recomendado que o número de autores não exceda a 5.	É recomendado que o número de páginas não exceda a 10, incluindo tabelas e figuras.
Comunicação/ Short Communication É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.	Title (português e inglês), Authors and Affiliation (somente na "Title Page"), Highlights (optional), Resumo (em português). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem.	É recomendado que o número de referências não exceda a 12.	É recomendado que o número de autores não exceda a 10.	É recomendado que o número de páginas não exceda a 10, incluindo tabelas e figuras.

DETALHAMENTO DE CADA SEÇÃO

- **Title.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.
- **Authors and Affiliation (Apenas na Title Page).** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com o número do ORCID (de todos os autores) e com identificação da instituição à qual pertencem. O autor e o seu *e-mail* para correspondência devem ser indicados com asterisco.
- **Highlights (optional).** Recomenda-se que o autor faça uma breve síntese dos pontos principais de seu trabalho, em no máximo cinco linhas.
- **Abstract (in English and Portuguese).** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro, contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os objetivos, os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso, e as conclusões. Cada frase deve conter uma informação completa.
- **Keywords (in English and Portuguese).** Deve conter, no máximo, cinco e no mínimo duas*.
* Na submissão, usar somente *Keywords* (Step 3) e, no corpo do artigo, constar tanto *keywords* (inglês) quanto palavra-chave (português).
- **Introduction.** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho, realçando-se com clareza a originalidade ou o ineditismo. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.
- **Material and Methods.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados, **deverá constar, obrigatoriamente, o número do Certificado de Aprovação da CEUA** (verificar o Item Comitê de Ética). Nos trabalhos que envolvem seres humanos, **deverá constar, obrigatoriamente, o número do Certificado de Aprovação da Comissão de Ética** que analisou o projeto.
- **Casuistry.** Descrever detalhadamente o conjunto de achados que constitui e justifica a originalidade da casuística.
- **Results.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - ✓ *Tabela.* Tabelas só serão aceitas se apresentadas em formato de retrato/*portrait*, em um conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab., seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e em fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda de tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento, mas deve ser completa o suficiente para ser entendida independentemente do texto principal. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto, de preferência após a sua primeira

citação.

- ✓ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig., seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridos no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto, de preferência após a sua primeira citação.

Nota:

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data), e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- **Discussion.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).
- **Conclusions.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e ser apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Acknowledgements.** Não são obrigatórios. Devem ser concisamente expressados.
- **References.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos a seguir.

COMISSÃO DE ÉTICA

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da Pesquisa que originou o artigo, expedido pela Comissão de Ética da instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 2). O número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no corpo do artigo e, preferencialmente, na seção Material e Métodos. Nos trabalhos que envolvem seres humanos, **deverá constar, obrigatoriamente, o número do Certificado de Aprovação da Comissão de Ética** que analisou o projeto.

FORMATAÇÃO - Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em inglês na forma impessoal.

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo e deve ser apresentado em arquivo *Microsoft Word* e anexado como "Main Document" (Step 2), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte *Times New Roman* tamanho 12, parágrafo justificado e com espaçamento 1 entrelinhas, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências).

- Não deve ser usado rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parênteses, no corpo do texto, na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

COMO REFERENCIAR

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação, para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais, pode-se reproduzir a informação citada anteriormente por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por**, o sobrenome do autor e o ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não faz parte das Referências. Na citação, coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação e o nome da instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (Até quatro autores, citar todos. Acima de quatro autores, citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. *et al.* Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (Até quatro autores, citar todos. Acima de quatro autores, citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (Até quatro autores, citar todos. Acima de quatro autores, citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <http://www.org/critca16.htm>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>. Acessado em: 5 dez. 1994.

5. Documentos preprints

OLIVEIRA, D.C; AGUIAR, A.F. (2021). Aspectos biológicos. PsyArXiv. <https://psyarxiv.com/kzy7u/>.

TAXAS DE SUBMISSÃO E DE PUBLICAÇÃO

Somente para ARTIGOS NACIONAIS (Autores brasileiros)

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$60,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias, será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00, por página, deverá ser paga na ocasião da prova final do artigo, por meio de boleto bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.

OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato, deve ser enviado um *e-mail* para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

Somente para ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is US\$ 50.00 (fifty American dollar per page, plus US\$50.00 (fifty American dollar) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author must inform the date to be in the invoice issuance.

RECURSOS E DILIGÊNCIAS

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso, este deverá ser anexado em arquivo Word, no item “Justification” (Step 2), e enviado por

- e-mail*, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, este deve ser feito pelo *e-mail* abmvz.artigo@abmvz.org.br.