



Universidade Federal da Bahia
Instituto Multidisciplinar em Saúde
Campus Anísio Teixeira
Bacharelado em Ciências Biológicas

BERNARDO MIRABAL SANTOS

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CLAMIDIOSE EM
PAPAGAIOS DE UM CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS
SILVESTRES

Vitória da Conquista – BA
NOVEMBRO DE 2018

Bernardo Mirabal Santos

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CLAMIDIOSE EM PAPAGAIOS DE UM
CENTRO DE TRIAGEM DE ANIMAIS SILVESTRES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia como exigência para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laize Tomazi

Vitória da Conquista – BA

NOVEMBRO DE 2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Mirabal, Bernardo

Diagnóstico molecular de clamidiose em papagaios de um centro de triagem de animais silvestres / Bernardo Mirabal Santos.- 2018.
50 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Laize Tomazi
TCC (Graduação – Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2018.

1. Clamidiose. 2. Papagaio. 3. Diagnóstico molecular. I. Universidade Federal da Bahia. II. Instituto Multidisciplinar em Saúde. III. Tomazi, Bernardo Mirabal. IV. Título

CDU: 577.2

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Laize Tomazi
Universidade Federal da Bahia
Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. Ricardo Evangelista Fraga
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia

Data da defesa: 04 de dezembro de 2018

À minha família,
Pela ciência,
Pela vida.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho jamais seria possível sem a permissão divina. Deus sempre esteve presente me orientando e por isso, me sinto extremamente grato e feliz. É uma honra fazer parte desta vida que me foi confiada com tanto amor.

Sou grato pelo apoio da minha família, sempre emanando esperança e força. À minha mãe, Elaine Gomes e meu pai, Ricardo Mirabal. À minha avó, Moema Gomes e minha madrinha Eliana Gomes.

Agradeço aos meus colegas e amigos, que nos momentos de necessidade, de prontidão estavam para ajudar-me. A todos aqueles que contribuíram de todas as possíveis formas, obrigado.

A Ricardo Fraga, meu orientador acadêmico. Minha gratidão por me apresentar um mundo novo a ser explorado. Ciência.

A minha orientadora Laize Tomazi, que depositou confiança no meu trabalho, sempre estando presente. Atenciosa e paciente. Obrigado.

RESUMO

Clamidiose é uma doença recorrente em aves, com destaque para psitacídeos. Esta zoonose é causada pela bactéria *Chlamydophila psittaci*. No Brasil, os Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), recebem, mantêm, tratam e reintroduzem a natureza, animais silvestres provindos do tráfico. O objetivo do presente trabalho foi realizar diagnóstico molecular e relacioná-lo com suspeita clínica, em papagaios alojados no CETAS de Vitória da Conquista (BA), Brasil. Amostras de swab cloacal foram coletadas de 59 papagaios *Amazona sp.* Estas foram transportadas em água e meio de cultura. DNA foi extraído por método de fervura. O marcador molecular para clamidiose (fragmento de DNA de 264 pb, gene *ompA*) foi amplificado por PCR, utilizado primers CPF/CPR. O diagnóstico molecular deu-se por presença/ausência em gel de agarose do marcador molecular. Todos os indivíduos foram analisados quanto a suspeita clínica de clamidiose, considerando os sinais: conjuntivite, secreção nasal e desnutrição. Os resultados obtidos seguem. (i) Não foi detectado influência dos meios de transporte das amostras biológicas sobre o diagnóstico molecular da clamidiose. (ii) A prevalência de clamidiose detectada na amostra foi de 37% (n= 22). (iii) A coincidência entre diagnóstico molecular e suspeita clínica foi de 68% (estatisticamente significativa, $p=0,0095$); com suspeita clínica indicando 15% (n=9) de falsos positivos e 17% (n=10) de falsos negativos. (iv) Não houve correlação estatisticamente significativa entre quantidade e tipo de sinal clínico em particular com diagnóstico molecular. (v) O acompanhamento de parte da amostra, demonstrou que 50% (n=7) dos indivíduos passaram de diagnóstico negativo para diagnóstico positivo em no máximo 24 dias.

Palavras chave: clamidiose; papagaio; diagnóstico molecular; suspeita clínica.

ABSTRACT

Chlamydiosis is a recurrent disease in birds, especially psittacines. This zoonosis is caused by the bacterium *Chlamydophila psittaci*. In Brazil, the Wild Animals Triage Centers (CETAS) receive, maintain, treat and reintroduce to nature, wild animals coming from the illegal trade. The objective of the present work was to perform a molecular diagnosis and to relate it with clinical suspicion, in parrots allocated in CETAS of Vitória da Conquista, BA, Brazil. Samples of cloacal swab were collected from 59 parrots *Amazona sp.* These were transported in water and culture medium. DNA was extracted by boiling method. The molecular marker for chlamydiosis (264 bp DNA fragment, *ompA* gene) was amplified by PCR using CPF / CPR primers. The molecular diagnosis occurred by presence/absence of the molecular marker on agarose gel. All individuals were analyzed for clinical suspicion of chlamydiosis, considering the signs: conjunctivitis, nasal secretion and malnutrition. The obtained results are as follow. (i) No influence of biological sample transport media was detected on the molecular diagnosis of chlamydiosis. (ii) The prevalence of chlamydiosis detected in the sample was 37%. (iii) The coincidence between molecular diagnosis and clinical suspicion was 68% (statistically significant, $p = 0.0095$); with clinical suspicion indicating 15% ($n=9$) of false positives and 17% ($n=10$) of false negatives. (iv) There was no statistically significant correlation between quantity and type of clinical signal in particular with molecular diagnosis. (v) Follow-up of part of the sample showed that 50% ($n=7$) of subjects moved from negative to positive diagnosis in a maximum 24 days.

Keywords: chlamydiosis; parrot; molecular diagnosis; suspicion

Sumário

1. Destaques	18
2. Introdução	19
2.1 <i>Epidemiologia da clamidiose</i>	19
2.2 <i>Chlamydomphila psittaci e MOMP</i>	20
2.3 <i>Suspeita clínica e diagnóstico molecular de clamidiose</i>	21
2.4 <i>Tráfico de animais silvestres no Brasil</i>	22
3 Materiais e métodos	23
3.1 <i>Amostra de indivíduos</i>	23
3.2 <i>Coleta das amostras biológicas</i>	24
3.3 <i>Suspeita Clínica</i>	24
3.4 <i>Extração de DNA</i>	25
3.5 <i>Análise de pureza e concentração de DNA</i>	25
3.6 <i>Amplificação e eletroforese</i>	25
3.7 <i>Determinação do diagnóstico molecular de clamidiose</i>	26
3.8 <i>Determinação da prevalência de clamidiose</i>	26
3.9 <i>Determinação da concordância entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose</i>	27
3.10 <i>Determinação da correlação entre quantidade e tipos de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose</i>	27
3.11 <i>Análise de positividade para clamidiose</i>	27
4 Resultados	28
4.1 <i>Análise do DNA extraído</i>	28
4.2 <i>Análise da influência do meio de transporte das amostras biológicas no diagnóstico molecular de clamidiose</i>	29
4.3 <i>Prevalência amostral, suspeita clínica e diagnóstico molecular de clamidiose</i>	29
4.4 <i>Estudo da concordância entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose</i>	29
4.5 <i>Estudo da correlação entre quantidade e tipos de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose</i>	30
4.6 <i>Análise de positividade para clamidiose</i>	31
5 Discussão	33
5.1 <i>Eficiência do protocolo de extração de DNA para o diagnóstico molecular de clamidiose</i>	33
5.2 <i>Não houve influência de meio de cultura sobre o diagnóstico molecular de clamidiose</i>	35
5.3 <i>Prevalência amostral de clamidiose</i>	36
5.4 <i>Concordância parcial e estatisticamente significativa entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose</i>	36
5.5 <i>Ausência de correlação entre número e tipo de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose</i> ..	38
5.6 <i>Rápida positividade para clamidiose</i>	39
6 Agradecimentos	42
7 Referências	43
8 Figuras, tabelas e quadros	49

Diagnóstico molecular de clamidiose em papagaios de um centro de triagem de animais silvestres

^aBernardo Mirabal Santos*, ^aLaize Tomazi

^a Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Campus Anísio Teixeira, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Vitória da Conquista, BA — Brasil, Cep 45.029-094.

***Autor para correspondência:** Bernardo Mirabal Santos. Email: bernardomirabalbio@gmail.com

1. Destaques

- Não houve influência dos meios de transporte das amostras biológicas sobre o diagnóstico molecular de clamidiose.
- Coincidência de 68%, estatisticamente significativa ($p=0,0095$), entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose.
- Suspeita clínica amostral indicativa de 15% de falsos positivos e 17% de falsos negativos de clamidiose.
- Não houve correlação estatisticamente significativa entre quantidade e tipo de sinal clínico em particular com diagnóstico molecular de clamidiose.
- Houve confirmadamente 50% de positividade para clamidiose em no máximo 24 dias de observação.

2. Introdução

Clamidiose aviária trata-se de uma doença infecciosa, que acomete principalmente aves e ocasionalmente humanos. Esta doença merece destaque sobre a infecção das aves da ordem Psittaciformes (Raso et. al., 2006/2004; Kaleta e Taday, 2003). A clamidiose foi originalmente denominada psitacose, o que refletia o fato de até então a doença ter sido descrita somente em psitacídeos; o que inclui papagaios (Ferreira, 2014).

2.1 Epidemiologia da clamidiose

O agente etiológico da clamidiose é a bactéria *Chlamydophila psittaci*. Um indivíduo apresenta ou é diagnosticado com clamidiose quando este está infectado com *C. psittaci*. Tal definição não está vinculada ao indivíduo apresentar os sinais clínicos causados pelo patógeno no hospedeiro.

A clamidiose é considerada de largo espectro, visto que *C. psittaci* é cosmopolita. *C. psittaci* já foi descrita associada a aproximadamente 465 espécies de aves, distribuídas em 30 ordens, sendo mais comuns em Psittaciformes e Columbiformes (Grespan, 2009; Kaleta e Taday, 2003). A família Psittacidae se destaca em relação a tal patologia (Proença, 2011). Em estudo no Brasil de Raso et al. (2006), *C. psittaci* foi encontrada (utilizando swab cloacal e técnica de Reação em Cadeira da Polimerase – PCR) em 6,3% de papagaios e 26,6% de araras de vida livre.

Além do largo espectro de possíveis hospedeiros, *C. psittaci* se destaca pelo seu potencial de dispersão (Grespan, 2009). Esta, além de se ser transmitida por inalação ou ingestão, (Ferreira, 2014), pode ser transportada por insetos, como mosquitos e ácaros (Gerlach, 1994). Os fatores apontados como intensificadores da infecção por *C. psittaci* entre aves seguem: higiene inadequada, superpopulação, desnutrição, variações de temperatura e constante reinfecção (Raso et. al. 2004; Gerlach, 1994). Evitar a ocorrência de tais fatores é o ideal para prevenir clamidiose em aves.

O tempo descrito de detecção de *C. psittaci* em tecidos após a infecção, é variável. Page et al. (1959), detectaram a presença deste patógeno em diversos órgãos de Phasianidae infectados, após 3 dias da infecção. Phasianidae trata-se de uma família de aves galiformes, incluindo galinha, pavão, faisão, perdizes, tetrazes e peru. Guzman et al.

(2010) detectaram a presença de *C. psittaci* em calopsitas, por PCR em estudo experimental, após 16 dias de inoculação.

Determinar o período de incubação de *C. psittaci* em psitacídeos trata-se de um desafio entre os pesquisadores. Tal dificuldade, é atribuída a diferença no poder de virulência das cepas, refletindo-se na variação de resposta clínica dos indivíduos (Gerlach, 1994). Page et al. (1959) relatam a apresentação de sinais clínicos no intervalo de 5 a 10 dias após a infecção, em Phasianidae. Gerlach (1994) registrou mínimo de incubação de 42 dias para aves da ordem Psittaciformes, não tendo sido incluído neste estudo papagaio *Amazona* sp.

2.2 *Chlamydophila psittaci* e MOMP

C. psittaci é uma bactéria gram-negativa, parasita intracelular obrigatória, da família Chlamydiaceae. Os organismos agrupados em Chlamydiaceae, são distintos das demais bactérias gram-negativas, (i) tanto por não possuírem peptidoglicano tão distinto em sua parede celular, (ii) quanto pelo seu modo de crescimento celular obrigatoriamente vinculado a ciclo de vida bifásico (Hatch et al. 1981; Wyllie et al. 1998). O ciclo vital bifásico das clamídias (Moulder, 1966) inclui forma intracelular vegetativa (corpo reticulado – CR) replicativa (Moulder, 1991) e forma extracelular (corpo elementar – CE) infecciosa (Evertt et al., 1999; Moulder, 1991; Proença et al., 2011).

Matsumoto e Marine (1970), descreveram por microscopia eletrônica, a superfície interna e externa de *C. psittaci*. Estes relataram padrão de organização (arranjo hexagonal) da parede celular apenas na fase CE, enquanto que na fase CR não possui padrão organizacional. Hatch, Salari e Caldwell identificaram (em 1981 e 1982) nesta espécie uma proteína principal externa de membrana - major outer membrane protein (MOMP). A MOMP foi descrita mais tarde como comum nas espécies *Chlamydia trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, e *C. pecorum* (Wyllie et al., 1998). Tal proteína apresenta multifuncionalidade, desempenhando papel tanto no processo de infecção, como na manutenção da rigidez estrutural do organismo que a possui (Wyllie et al., 1998).

A MOMP, característica principal da morfologia das clamídias, é a proteína mais presente na membrana externa do corpo elementar (CE) em *C. psittaci* (Pickett et al., 1988). Pickett et al. (1988) sequenciou o gene que codifica a MOMP de *C. psittaci*, como codificante de 402 aminoácidos. Segundo Pickett et al. (1988) e Zhang et al. (1989), o gene *ompA* está

presente em todos os estudos de genoma de *C. psittaci*. O gene *ompA*, foi também isolado em meio de cultura (Buffalo Green Monkey - BGM), sequenciado e evidenciado como um novo genótipo, o E/B (Geens et al., 2005a).

De fato, com o tempo descreveu-se que a bactéria *C. psittaci* apresenta uma série de genótipos diferentes (correspondentes a sorotipos distintos) encontrados em diferentes espécies de aves; havendo relação entre tipo de genótipo de parasita e hospedeiro (Andersen e Vanrompay, 2000). O genótipo A do gene *ompA* de *C. psittaci* é encontrado em aves da ordem Psittaciformes (Vanrompay et al., 1997). Os demais genótipos do *ompA*, como o B, C, D, E, F e E/B são correspondentes a outras ordens de aves, enquanto que os genótipos M56 e WC, não são aviários (Braz et al., 2014; Geens et al., 2005b; Vanrompay et al., 1997). Até o momento, foram descritos nove genótipos de *C. psittaci*, sendo sete de *C. psittaci* aviárias e dois não aviárias.

A nomenclatura do gene codificador da proteína MOMP, pode variar a depender do artigo considerado. Vanrompay et al. (1997) chama este gene de *omp1* e seus genótipos como A (psitacídeos), B (Columbiformes), etc. No trabalho de Hewinson et al. (1997), o gene é chamado de *ompA*. Trabalhos mais recentes utilizam o termo gene MOMP Chlamydiaceae (Raso et al., 2006) ou gene *ompA* (Braz et al., 2014; Geens et al., 2005a). No presente trabalho nos referiremos ao gene como *ompA*.

2.3. Suspeita clínica e diagnóstico molecular de clamidiose

A suspeita clínica não é considerada assertiva para emissão de diagnóstico conclusivo de clamidiose. O que se deve a dois fatores principais: (i) há indivíduos que apesar de possuir o patógeno são assintomáticos e (ii) há vários sintomas clínicos que são compartilhados com outras patologias. Tal dificuldade, justifica a realização de exame diagnóstico específico envolvendo a detecção de *C. Psittaci*.

Como integrantes de exames laboratoriais para clamidiose, já foram empregadas técnicas como: cultura celular, ELISA e imunofluorescência indireta (Proença et al., 2011). Contudo, estas técnicas apresentam desvantagens significativas, como (i) requisição de tempo no caso da cultura celular, podendo este ser fator limitante para diagnóstico rápido, (ii) falha na detecção de anticorpos, e (iii) ocorrência de reação cruzada com outras bactérias gram-negativas (Gerlach, 1994; Nasphv, 2017; Sachse et al., 2009; Proença et al., 2011).

Diante de tais dificuldades, métodos moleculares com utilização de DNA vêm sendo empregados. Dentre eles, há protocolos que se utilizam de PCR (Ferreira, 2014). As vantagens do uso da PCR na detecção de *C. psittaci* incluem alta especificidade, sensibilidade, rapidez e disponibilidade em laboratórios no Brasil (Nasphv, 2017; Proença et al., 2011; Sachse et al., 2009).

A MOMP, com o tempo, passou a exercer papel fundamental no diagnóstico de clamidiose; uma vez que estando presente em *C. Psittaci*, permite o desenvolvimento de técnicas para a identificação deste patógeno. Neste contexto, o gene *ompA* é considerado um marcador molecular no diagnóstico de clamidiose. Dentre os trabalhos que surgiram envolvendo a detecção do patógeno utilizando-se de técnicas moleculares envolvendo o gene codificador da proteína MOMP, estão Geens et al., 2005a; Raso et. al. 2006; Braz et. al. 2014; Razmyar et. al. 2016.

2.4 Tráfico de animais silvestres no Brasil

O Brasil é considerado um país com megadiversidade, o que inclui cerca de 1901 espécies de aves (Cbro, 2014). Porém, este também é um dos países com maior tráfico de animais silvestres (Laçava et al., 1995). Estima-se que 82% dos animais traficados no Brasil sejam aves (Ribeiro e Silva, 2007). Dentre o total de espécies de psitacídeos, 16,6% são traficadas (Costa et al., 2018).

Os Centros de Triagem de animais Silvestres (CETAS) são instituições brasileiras com responsabilidade de acolher animais alvo do tráfico, reabilitá-los e reintroduzi-los à natureza a partir de programas de conservação da biodiversidade (Brasil, 2008). Neste contexto, a polícia federal brasileira tem papel fundamental na apreensão e direcionamento de animais traficados.

Uma ação de impacto vinculada a conservação de animais silvestres é a reintrodução à natureza. Porém, para que esta seja bem-sucedida os animais devem estar livres de patógenos considerados de importância para a espécie. Reintroduzir aves com clamidiose na natureza, pode trazer sérios riscos as populações de animais silvestres.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo realizar diagnóstico molecular e relacioná-lo com suspeita clínica, em papagaios alocados no CETAS unidade de Vitória da Conquista, Brasil (CETAS-VDC). Além deste, teve como objetivos avaliar a

influência do meio de transporte de amostras sobre o diagnóstico molecular de clamidiose e analisar o tempo de positividade para esta patologia na amostra estudada.

3 Materiais e métodos

3.1 Amostra de indivíduos

Foram incluídos no presente estudo 59 papagaios (49 *Amazona aestiva*; 8 *A. amazonica*; 1 *A. rhodocorytha*; e 1 *A. vinaceae*), apreendidos do tráfico de animais silvestres e mantidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres, unidade Vitória da Conquista (BA, Brasil) (CETAS-VDC). Todos os indivíduos eram adultos.

Todos os 59 animais foram identificados (i) ou com marcas padronizadas de tinta atóxica temporária (diluída em álcool) (ii) ou com anilhas de alumínio. Cada anilha continha um código formado por letras e números, mais o endereço do CETAS-VDC. O anilhamento visa devolução e acompanhamento das aves pós soltura. Dos 59 indivíduos estudados, 38 animais foram marcados com tinta atóxica e 21 foram anilhados. Seguem as identificações das anilhas: CETASVCA 035; CETASVCA 051; CETASUFBA 061; CETASUFBA 062; CETASUFBA 063; CETASUFBA 064; CETASUFBA 065; CETASUFBA 066; CETASUFBA 067; CETASUFBA 068; CETASUFBA 069; CETASUFBA 070; CETASUFBA 071; CETASUFBA 072; CETASUFBA 073; CETASUFBA 074; CETASUFBA 075; CETASUFBA 076; CETASUFBA 077; CETASUFBA 078; CETASUFBA 079.

O presente estudo foi (i) aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Multidisciplinar da Universidade Federal da Bahia (IMS/UFBA), protocolo número 034/2015, e (ii) cadastrado no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), número do cadastro ACF8348. O presente projeto está vinculado ao projeto de extensão “A problemática do Tráfico de Animais Silvestres - Uma proposta Integradora entre a Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) em Vitoria da Conquista BA”; que tem por finalidade acompanhar animais alocados ou previamente alocados no CETAS-VDC.

3.2 Coleta das amostras biológicas

Amostras biológicas foram coletadas pela primeira vez, de 59 indivíduos, em quatro momentos. Coleta 1 (05/09/18) – 13 indivíduos (10 *A. aestiva*, 2 *A. amazonica*, 1 *A. rhodocorytha*). Coleta 2 (25/09/18) – 14 indivíduos (11 *A. aestiva*, 3 *A. amazonica*). Coleta 3 (28/09/18) – 11 indivíduos (7 *A. aestiva*, 3 *A. amazonica*, 1 *A. vinaceae*). Coleta 4 (02/10/18) – 21 indivíduos (11 *A. aestiva*). Houve recoleta de amostras de alguns indivíduos com diagnóstico molecular negativo para clamidiose, para acompanhamento de positividade para esta patologia.

Amostras de swab cloacal de todos os indivíduos foram coletados e acondicionado em frascos rosqueados autoclavados contendo 1mL de meio para transporte. Os meios de transporte foram (i) água destilada autoclavada (A.D.A) para as amostras de todos os indivíduos e (ii) em acréscimo para 10 destes indivíduos, swabs cloacais também foram transportados em meio de cultura. A nomenclatura usada aqui como “meio de cultura” é utilizada em artigos como “meio de transporte” de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Este meio continha em 200 mL de A.D.A; 8 g de Sacarose; 0,2 g de Fosfato de sódio monobásico; 0,4 g de Fosfato de sódio dibásico suplementado com 10 mL de Soro equino (Souza, 2017). O uso de dois meios de transporte diferentes teve por finalidade avaliar a influência do meio de transporte de amostras sobre o diagnóstico molecular de clamidiose.

O material biológico coletado foi transportado refrigerado em caixas térmicas até o local de processamento das amostras - Laboratório de Biologia celular e molecular do IMS/UFBA. Neste laboratório, as amostras transportadas em A.D.A sofreram a extração de DNA em até 24 h e as amostras transportadas em meio de cultura em até 72 h. As amostras mantidas em ambos as soluções foram mantidas 4°C, sem agitação, até a extração de DNA.

3.3 Suspeita Clínica

A suspeita clínica foi determinada pela presença de um ou mais dos seguintes sinais: conjuntivite, secreção nasal e desnutrição (Gerlach, 1994; Nasphv, 2017). Os três sinais clínicos foram associados a clamidiose considerando suas intensidades e frequências. Os indivíduos classificados como “desnutridos”, possuíam quilha evidente, o que levou a concluir pela origem patológica deste sinal.

3.4 Extração de DNA

O método utilizado para a extração de DNA foi o protocolo de extração de DNA por fervura para swab cloacal (Fan et. al., 1995), com modificações. Segue protocolo detalhado. O conteúdo gastrointestinal mantido em meio de transporte foi transferido para microtubo e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 100 uL de PBS 1X e submetido à centrifugação 14.000 rpm por 15 minutos. Este processo de lavagem foi repetido por mais uma vez. O precipitado foi ressuspenso em 40uL de PBS 1X, e a amostra foi mantida (em microtubo fechado) a 100°C por 10 minutos (em bloco seco). Após, a amostra foi transferida para isopor em gelo e mantida a -20°C por 5 minutos. Então, foi realizada centrifugação final a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante (contendo o DNA extraído) foi recuperado em 40 uL de 40 uL e armazenado a -20°C.

3.5 Análise de pureza e concentração de DNA

O DNA extraído foi submetido a análise quantitativa (que determina a concentração em ng/uL) e qualitativa (que fornece índices de pureza), utilizando-se NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Utiliza-se 1uL de cada amostra para as análises. As concentrações de DNA foram fornecidas diretamente pelo equipamento. Para determinar o nível de pureza das amostras, utilizaram-se os valores referenciais que seguem: (i). Para determinar a pureza de DNA em relação aos contaminantes orgânicos (amostras lidas a 260nm/230nm): valores entre 2,0 e 2,2 indicavam alto grau de pureza das amostras. (ii). Para determinar a pureza de DNA em relação a proteínas (amostras lidas a 260nm/280nm): valores entre 1,7 e 2,0 indicavam alto grau de pureza.

3.6 Amplificação e eletroforese

A amplificação de DNA ocorreu através de Reação em Cadeira da Polimerase (PCR). A PCR foi realizada (condições de reação e termociclagem) conforme protocolo de Ferreira (2014), utilizando o par de primers CPF 5' -GCAAGACACTCCTCAAAGCC-3' e CPR 5'-CCTTCCCACATAGTGCCATC-3' (Hewinson et al., 1997). As reações de PCRs em volume final de 50 uL, continham em 35,75 uL de Água ultrapura; 5 uL de Tampão de reação 10x (500 Nm KCl; 15 nM MgCl₂, 100 Nm Tris-HCl, pH 9,0); 2 uL de MgCl₂ (50 nM); 1 uL de dNTPs (200 uM de cada nucleotídeo); 0,5 uL de cada um dos dois Primers

(CPF/CPR) (5 uM); 0,25 uL de Taq DNA polimerase (5U/ul) e 5 uL da amostra de DNA extraído. As reações de PCR foram preparadas em câmara de fluxo laminar. O programa de termociclagem utilizado (Ferreira, 2014) segue: (i) Desnaturação inicial a 94°C por 3 min., (ii) 40 Ciclos de 94°C por 30 seg. 50°C por 30 seg. e 72°C por 45 seg. e (iii) Extensão final a 72°C por 45 seg. Como (i) controle negativo das reações de PCR foi utilizada A.D.A e como (ii) controle positivo utilizou-se DNA extraído (pelo mesmo protocolo de extração acima detalhado) de vacina comercial para gatos (Fel-O-Vax® LvK IV + CaliciVax®), contendo o patógeno inativado (Ferreira, 2014).

As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. A corrida se deu a 90 V, 120 mA, 120 W por aproximadamente 1 h e 20 min. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100pb a 1 Kb (BioBasic, SP-Brasil), 2 µl/ canaleta de gel.

3.7 Determinação do diagnóstico molecular de clamidiose

O diagnóstico molecular de clamidiose foi determinado através da visualização em gel de marcador molecular. Tal marcador corresponde a fragmento de DNA de aproximadamente 264 pb amplificado a partir do gene *ompA* (Hewinson et al., 1997). O par de primers utilizados amplifica exclusivamente o marcador molecular mencionado de *C. psittaci* (Hewinson, et al., 1997).

Neste contexto, diagnóstico molecular positivo para clamidiose foi emitido para as amostras nas quais visualizou-se a presença da banda de DNA mencionada e (ii) diagnóstico molecular negativo foi emitido diante da ausência desta banda. Segundo Hewinson et al. (1997), há um limite para a detecção do patógeno, o qual se apresenta entre 60 e 600 fg de DNA da *Chlamydophila psittaci*.

3.8 Determinação da prevalência de clamidiose

Para a determinação da prevalência do patógeno na amostra estudada, foi calculada a porcentagem dos papagaios diagnosticados positivamente para clamidiose em relação a todos os indivíduos da amostra (n=59). Para tal cálculo foi considerado somente o primeiro teste diagnóstico realizado de cada indivíduo.

3.9 Determinação da concordância entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose

A determinação da concordância entre diagnóstico molecular e suspeita clínica da clamidiose foi realizada estabelecendo a coincidência entre os resultados (de positividade) das avaliações em questão, considerando todos os papagaios da amostra.

Para determinar se na amostra estudada havia concordância estatisticamente significativa entre suspeita clínica e diagnóstico molecular foi realizado o Teste do qui-quadrado (χ^2). Este teste foi realizado através do software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2018), com 0,05 de significância.

3.10 Determinação da correlação entre quantidade e tipos de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose

Parte dos indivíduos cuja suspeita clínica para clamidiose foi positiva (n=21) foi caracterizada (quantitativamente e qualitativamente) quanto aos sinais clínicos apresentados e quanto ao diagnóstico molecular (se positivo ou negativo). A caracterização quantitativa consistiu no registro por indivíduo do número de sinais clínicos apresentados (mínimo de 1 e máximo de 3). A caracterização qualitativa consistiu no apontamento por indivíduo dos sinais clínicos apresentados (opções: conjuntivite, secreção nasal e desnutrição).

As caracterizações, quantitativa (número) e qualitativa (tipo) dos sinais clínicos foram analisadas quanto a estarem estatisticamente correlacionadas com diagnósticos moleculares positivo e negativo de clamidiose. A análise estatística da correlação entre diagnóstico molecular e número de sinais clínicos (análise quantitativa) foi realizada pelo Teste de Mann-Whitney. A análise estatística da correlação entre diagnóstico molecular e tipo de sinal clínico (análise qualitativa), foi realizada pelo Teste exato de Fisher. Estes testes foram realizados a partir do software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2018), com 0,05 de significância.

3.11 Análise de positividade para clamidiose

A análise de positividade para clamidiose foi realizada sobre indivíduos que inicialmente foram diagnosticados negativamente, por biologia molecular, para clamidiose. Tal análise

ocorreu sobre 14 indivíduos, que foram acompanhados por 21 a 24 dias. Neste período, amostras biológicas foram coletadas por duas vezes dos indivíduos (que permaneciam negativos para clamidiose) e estes tiveram o processamento de diagnóstico molecular repetido. Os intervalos de tempo entre as coletas foram: aproximadamente 13 dias entre Coleta e 1ª Recoleta e 10 dias entre as 1ª e 2ª Recoletas. Especificamente as recoletas aconteceram da forma que segue. 1ª Recoleta (10/10/2018) – 14 indivíduos (10 *A. aestiva*, 3 *A. amazonica*, 1 *A. vinaceae*). 2ª Recoleta (19/10/2018) – 6 indivíduos (4 *A. aestiva*, 2 *A. amazonica*).

No período do estudo, os indivíduos diagnosticados positivamente para clamidiose foram realocados para recintos próprios para quarentena, enquanto os demais foram mantidos nos recintos com indivíduos sem suspeita clínica.

4 Resultados

4.1 Análise do DNA extraído

Os valores de concentração de DNA extraído e grau de pureza estão demonstrados na **Tabela 1**. A concentração média obtida a partir das 59 amostras extraídas de DNA foi 304,15 ng/uL (menor concentração - 10 ng/uL; maior concentração - 1902,9 ng/uL). O valor médio do índice de contaminantes orgânicos foi 0,48 (menor índice - 0,31; maior índice - 1,02). A média dos valores de índice de contaminantes proteicos foi 0,79 (menor índice - 0,29; maior índice - 1,90).

Como nas reações de PCR, foram utilizados 5uL de cada amostra a quantidade média de DNA utilizada por reação foi 1520,75 ng (menor quantidade 50,4 ng e maior quantidade 9514,50 ng). Os valores de pureza indicam amostras não puras, contudo tal fator não foi suficiente para impedir a amplificação do marcador molecular.

Foi detectada a presença do marcador molecular para a clamidiose a partir de amplificação de amostras apresentando os seguintes parâmetros de menores (i) quantidade de DNA – 50,4ng, (ii) índice de contaminantes orgânicos – 0,31 e (iii) índice de contaminante de proteínas – 0,33; e foi observada amplificação do marcador molecular nos seguintes parâmetros de maiores (iv) quantidade de DNA – 5442 ng, (v) índice de contaminantes orgânicos – 1,02 e (vi) índice de contaminante de proteínas – 1,90.

4.2 Análise da influência do meio de transporte das amostras biológicas no diagnóstico molecular de clamidiose

Os resultados do diagnóstico molecular de 10 indivíduos, considerando a utilização de amostras biológicas coletadas em duplicadas e acondicionadas em água destilada autoclavada (A.D.A) e em meio de cultura estão especificados na **Tabela 2**. Esta tabela mostra que dos 10 indivíduos estudados, 7 (70%) tiveram diagnóstico molecular positivo para a clamidiose. Também pode ser observado que houve coincidência de 100% quanto aos resultados obtidos a partir das amostras do mesmo indivíduo, acondicionadas em ambos os meios de transporte. Ou seja, não houve influência do meio de transporte utilizado quanto a detecção de *C. psittaci* nas amostras.

Dos 10 indivíduos considerados na Tabela 2, dois estão representados na **Figura 1**. Esta, mostra o resultado do diagnóstico molecular para clamidiose aviária de um indivíduo com diagnóstico positivo e um com diagnóstico negativo. Para ambos os indivíduos, foram considerados os resultados da amplificação das amostras biológicas acondicionadas em ambos os meios de transporte. Nesta figura, observa-se o marcador molecular amplificado (banda de aproximadamente 264 pb) das amostras analisadas e do controle positivo utilizado.

4.3 Prevalência amostral, suspeita clínica e diagnóstico molecular de clamidiose.

A suspeita clínica e o diagnóstico molecular dos 59 papagaios estudados encontram-se na **Tabela 3**. Tais dados mostram que na amostra estudada houve prevalência de 37% (n=22) de clamidiose (diagnosticada por biologia molecular), e 36% (n=21) de suspeita clínica.

4.4 Estudo da concordância entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose

A análise quanto a concordância entre diagnóstico molecular e suspeita clínica da clamidiose, citada por indivíduo na Tabela 3, encontra-se resumida no **Quadro 1**. Da amostra analisada de animais, 68% (n=40) obtiveram resultados coincidente entre suspeita clínica e diagnóstico molecular. Dos 19 indivíduos cujos resultados não foram coincidentes, 9 (47%) eram positivos por suspeita clínica e negativos por diagnóstico molecular (suspeita clínica aponta falsos positivos para clamidiose), enquanto que 10 (53%) eram positivos por diagnóstico molecular e negativos por suspeita clínica (suspeita

clínica aponta falsos negativos para clamidiose). Considerando a amostra total, os resultados indicam para 15% (n=9) apresentaram suspeita clínica apontando falsos positivos e 17% (n=10) mostraram suspeita clínica apontando falsos negativos para clamidiose.

O Teste do qui-quadrado (χ^2) demonstrou haver concordância ou dependência estatística entre suspeita clínica e diagnóstico molecular de clamidiose na amostra analisada (p=0,0095).

4.5 Estudo da correlação entre quantidade e tipos de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose

Os dados da **Tabela 4** mostram os sinais clínicos e o diagnóstico molecular apresentados pelos 21 indivíduos com suspeita clínica de clamidiose. Destes, (i) 12 apresentaram diagnóstico molecular positivo (57%) (diagnóstico coincidente) e (ii) 9 apresentaram diagnóstico molecular negativo para a clamidiose (43%). Ou seja, para estes 9 indivíduos as suspeitas clínicas conduziram para diagnóstico falso positivo.

A análise quanto a correlação entre quantidade e tipos de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose citada por indivíduo na Tabela 4, encontra-se resumida no **Quadro 2**. Os resultados da correlação entre diagnóstico molecular e sinais clínicos (análise quantitativa), seguem. Dos 12 indivíduos com diagnóstico molecular positivo, 6 apresentavam 2 sinais clínicos (50%) e 6 apresentavam 1 sinal clínico (50%). Dos 9 indivíduos com diagnóstico molecular negativo, 7 apresentavam 1 sinal clínico (78%) e 2 apresentavam 2 sinais clínicos (22%). Nenhum indivíduo apresentou simultaneamente 3 sinais clínicos.

Tais resultados apontam que há dependência de correlação entre diagnóstico molecular (positivo e negativo) com número de sinais clínicos. Neste sentido, apesar de ter sido observado: (i) dentre os indivíduos com diagnóstico molecular positivo mesma frequência de indivíduos com dois e um sinais clínicos (utilizados para suspeita clínica) - 50%; (ii) dentre os indivíduos com diagnóstico molecular negativo, observou-se maior frequência de menos sinais clínicos - 78% dos indivíduos.

O teste de Mann Whitney não demonstrou haver relação estatística entre número de sinais clínicos e diagnóstico molecular de clamidiose. Porém, verificou que tanto a mediana (1,5) quanto à média (1,5) de sinais clínicos dos indivíduos com diagnóstico positivo,

foram maiores quando comparados as medianas (1,0) e médias (1,22) ligadas aos indivíduos que tinham diagnóstico negativo.

Os resultados da correlação entre diagnóstico molecular e tipos de sinais (análise qualitativa) clínicos seguem. Dos 12 indivíduos com diagnóstico molecular positivo, 1 (8%) apresentou conjuntivite, 9 (75%) apresentavam secreção nasal e 8 (67%) apresentavam desnutrição. Dos 9 indivíduos com diagnóstico molecular negativo, 4 (44%) apresentavam conjuntivite, 4 (44%) apresentavam secreção nasal e 3 (33%) apresentavam desnutrição.

Neste sentido, observou-se: (i) nos indivíduos com diagnóstico molecular positivo maior frequência de secreção nasal (75%) e desnutrição (67%) do que nos indivíduos diagnósticos negativamente para clamidiose aviária (44% e 33%, respectivamente). A conjuntivite apresentou-se em 8% dos diagnosticados como positivos e 44% dos diagnosticados como negativos.

A análise estatística da correlação entre diagnóstico molecular e tipo de sinal clínico (análise qualitativa), seguem. O Teste exato de Fisher demonstrou que não houve relação estatisticamente significativa entre diagnóstico molecular e (i) conjuntivite ($p=0,0805$); (ii) secreção nasal ($p=0,1656$); e (iii) desnutrição ($p=0,1421$).

4.6 Análise de positividade para clamidiose

O acompanhamento, quanto a positividade para clamidiose, de 14 indivíduos diagnosticados molecularmente como negativos em primeira coleta está demonstrado na **Figura 2**.

No primeiro intervalo de análise (intervalo médio de 13 dias; entre Coleta e 1ª Recoleta), dos 14 indivíduos com diagnóstico molecular negativo, 5 (36%) positivaram, enquanto 9 (64%) continuaram negativos. No segundo período de análise (intervalo de 10 dias, entre 1ª e 2ª Recoleta) dos 9 animais negativos (diagnosticados negativamente tanto na Coleta como na 1ª Recoleta), 2 (22%) indivíduos positivaram, 4 (45%) morreram e 3 permaneceram negativos (33%); em somatório consideramos que neste intervalo, com certeza 22% positivaram e provavelmente 67% positivaram. Em resumo, quanto a positividade para clamidiose em intervalo médio de 23 dias, dos 14 indivíduos inicialmente negativos, 50% positivaram ($n=7$) e 21% ($n=3$) permaneceram negativos. A situação de positividade do percentual restante dos indivíduos (29%) é incerta, visto que

esta percentagem se refere aos indivíduos que morreram antes do último teste para positividade de clamidiose.

Não foi possível até o momento realizar diagnóstico molecular de amostras de necropsia dos indivíduos que faleceram; porém a morte apresentada é compatível com infecção sistêmica aguda associada a clamidiose.

5 Discussão

5.1 Eficiência do protocolo de extração de DNA para o diagnóstico molecular de clamidiose

Quando considerados resultados de diagnósticos moleculares é recomendável analisá-los a luz de controles do material biológico utilizado. No caso do presente trabalho, o material utilizado para o diagnóstico molecular foi DNA dos indivíduos; obtido por protocolo de extração de DNA. O protocolo de extração de DNA aqui utilizado é considerado de baixa complexidade.

A técnica de PCR demonstra-se altamente sensível para detecção de patógenos. O que é baseado no princípio, intrínseco da técnica, de amplificação de quantidade inicial de DNA das amostras. Porém, tal sensibilidade depende consideravelmente do DNA extraído (quantidade e qualidade) e da especificidade de anelamento dos primers utilizados na PCR.

Os variados protocolos de extração de DNA disponíveis atualmente geram DNAs em quantidades e qualidades diferentes. A escolha do protocolo é geralmente influenciada por simplicidade, orçamento e rapidez dos procedimentos. A maioria dos artigos com detecção de *C. psittaci* utilizando-se da amplificação de *ompA* utilizaram protocolos de extração de DNA com clorofórmio (Sachse e Hotzel, 2003; Buxton et al., 1996; Geens et al., 2005b). Contudo, quando possível, recomenda-se evitar o uso de clorofórmio devido principalmente a toxicidade deste produto.

Hewinson et al. (1997) e Ferreira (2014) detectaram *C. psittaci* utilizando os primers CPF e CPR, que amplificam parte do gene *ompA*. Hewinson et al. (1997) detectou presença do marcador molecular de *C. psittaci* a partir de amostras de DNA que possuíam de 60 a 600fg por reação de PCR. Ferreira (2014) não descreveu qual foi o mínimo e máximo de quantidade de DNA utilizados nas amostras extraídas nas quais houve detecção molecular do patógeno. Quanto ao material biológico utilizado, Hewinson et al. (1997) usou amostras de fezes de papagaio-moleiro (*Amazona farinosa*), já Ferreira (2014) usou amostras de swab cloacal de Columbiformes e Galliformes. O protocolo de extração de DNA utilizado por Hewinson et al. (1997) foi o método de McClenaghan et al. (1984) (que se utiliza de clorofórmio); enquanto Ferreira (2014) usou protocolo de extração de DNA que se utiliza de PBS e clorofórmio.

Fan et al. (1995) amplificou marcador molecular (gene) de *Mycoplasma gallisepticum*, a partir de cepas de Galliformes (incluindo galinhas, peru e pavão); não foi informado o material biológico utilizado. O protocolo de extração de DNA utilizado por Fan et al. (1995) é mais simples, em relação aos protocolos utilizados por Hewinson et al. (1997) e Ferreira (2014). Este protocolo de extração de DNA inclui basicamente somente os passos de lise celular e purificação; mesmos passos que compõem o protocolo utilizado no presente trabalho.

No presente trabalho, foram obtidas ampliações do marcador molecular de *C. psittaci* usando os mesmos pares de primers de Hewinson et al. (1997) e Ferreira (2014), porém utilizando-se de protocolo de extração de DNA diferente. As amostras a partir das quais obtivemos amplificação do marcador molecular de *C. psittaci* continham de 52,4 ng a 5.442 ng de DNA extraído. Não houve amostra de DNA extraído com concentração de DNA mais baixa do que a que foi utilizada na quantidade de 52,4ng por reação. Ou seja, neste estudo, as reações de PCR começaram a detectar o patógeno a partir da amostra com a menor concentrada de DNA extraída. Foi detectada a presença do marcador molecular de *C. psittaci* utilizando amostras apresentando os seguintes parâmetros de menores indicadores para contaminantes orgânicos e para contaminantes de proteínas 0,31 e 0,33; respectivamente. Considerando os intervalos dos índices de pureza do DNA (2,0 – 2,2 para contaminantes orgânicos e 1,7 – 2,0, para contaminantes proteicos), observa-se que o nível de impureza do DNA obtido utilizando o protocolo de extração de DNA do presente estudo, não foi impeditivo para a amplificação do marcador molecular utilizado. Ou seja, o protocolo de extração de DNA aqui utilizado, em conjunto com as outras técnicas de biologia molecular empregadas no processo de diagnóstico molecular de clamidiose aviária, foi adequado.

Comparativamente a outros artigos que realizaram diagnóstico molecular de clamidiose, o protocolo de extração de DNA utilizado no presente trabalho foi mais simples, menos oneroso, mais rápido, e menos tóxico (e mesmo assim efetivo na detecção do patógeno). Acreditamos que em conjunto com as demais técnicas de DNA utilizadas para o diagnóstico molecular de clamidiose, o protocolo de extração de DNA aqui utilizado, é seguro e tem vantagens significativas em relação aos demais aqui abordados.

5.2 Não houve influência de meio de cultura sobre o diagnóstico molecular de clamidiose.

Corte de custos são importantes especialmente para instituições com elevada demanda, como o são os CETAS. Estes, abrigam dezenas ou centenas de animais. Os programas de reintrodução dos animais silvestres à natureza recomendam avaliação sanitária dos mesmos. Neste sentido, a utilização de protocolos de diagnóstico de doenças com orçamentos reduzidos pode influenciar na diminuição do risco levado à natureza, por permitir aumento da triagem sanitária de animais que serão reintroduzidos.

O meio de acondicionamento e transporte das amostras biológicas até o local de processamento destas, tem impacto no orçamento de protocolos utilizados no diagnóstico molecular de doenças parasitárias. A literatura científica relata uso de meio de transporte, por vezes suplementado com soros animais (no presente trabalho denominado “meio de cultura”) para o acondicionamento de swab cloacal. Os meios de transporte ou meios de cultura tem geralmente como objetivo aumentar a probabilidade de detecção de patógenos bacterianos nas amostras biológicas utilizadas.

Há estudos envolvendo detecção molecular de *C. psittaci* que se utilizaram de meios de transportes, suplementados ou não com soro animal (Razmyar et al., 2016; Hewinson et al., 1997). Razmyar et al. (2016) utilizaram meio de Sacarose-fosfato-glutamato; enquanto Hewinson et al. (1997) usaram Sacarose-fosfato-glutamato suplementado com soro fetal bovino. Razmyar et al. (2016) utilizou o meio de transporte mencionado para acondicionar swab cloacal de papagaio-cinzento; enquanto Hewinson et al. (1997) utilizou o meio de cultura mencionado para fezes de papagaio-moleiro. Os artigos de Razmyar et al. (2016) e Hewinson et al. (1997) não trazem informações detalhadas sobre o impacto dos meios de transporte suplementados ou não com soro animal, sobre o incremento na detecção da clamidiose. Porém, também há trabalhos que envolveram diagnóstico molecular de clamidiose utilizando-se de swab cloacal sem a utilização de meio de cultura especial (Sareyyupoglu et al., 2007; Raso et al., 2004).

Comparado a *C. psittaci*, as bactérias do gênero *Mycoplasma* são consideradas mais exigentes quanto as condições para crescimento populacional. O meio de cultura de Souza (2017), foi aplicado para transporte de amostras, afim de detectar bactérias mais sensíveis, como *Mycoplasma*. O presente estudo, utilizou o meio de cultura de Souza (2017), para

avaliar possível influência deste no aumento da detecção de *C. psittaci* e por consequência diagnóstico molecular de clamidiose, a partir de amostras de swab cloacal. No presente trabalho, não foi observada influência dos meios de transporte das amostras biológicas sobre o diagnóstico molecular de clamidiose, mesmo sendo um destes meio de transporte água. Os resultados dos diagnósticos foram 100% concordantes, comparado meio de cultura e água. Destaca-se que com diminuição de custo de processamento de amostras, é possível estender o número de aves a serem avaliadas por diagnóstico molecular. Tal fato, tem impacto significativo sobre a inclusão de mais indivíduos em programas de reintrodução de animais silvestres à natureza.

5.3 Prevalência amostral de clamidiose

Raso et al. (2006) em estudo com aves silvestres livres na natureza detectou as seguintes prevalências 6,3% para *A. aestiva* assintomáticos e 26,7% em araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*). Há relatos de prevalência de clamidiose de 4,21% em aves criadas em cativeiro, assintomáticas (Braz et al. 2014). Na Turquia, teste com diversas espécies de aves sintomáticas em cativeiro, detectou nestes grupos prevalência de 91,5% de clamidiose (Sareyyupoglu et al., 2007).

No presente trabalho, a amostra de papagaios em cativeiro estudada demonstrou prevalência da clamidiose de 37%. Tal valor de prevalência é similar aos estudos de Raso et al. (2002). Este encontrou para papagaios assintomáticos (*Amazona* sp.) em cativeiro, prevalência de clamidiose de 35,8%. Os diagnósticos da clamidiose, tanto os realizados no presente trabalho como nos demais (deste parágrafo e do anterior), se utilizaram PCR (convencional) ou qPCR.

5.4 Concordância parcial e estatisticamente significativa entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose

Ao comparar os resultados de suspeita clínica e molecular das amostras, houve coincidência para a maioria destas (68%). Tal concordância mostrou-se estatisticamente significante ($p=0,0095$). Contudo, os demais indivíduos (32%), ou possuíam sinais clínicos com diagnóstico molecular negativo (15% falsos positivos), ou não possuíam sinais clínicos apesar do diagnóstico molecular ser positivo para a patologia (17% falsos negativos).

Os artigos encontrados na literatura que relatam diagnóstico de clamidiose, mencionam o uso de suspeita clínica como indicador da doença (Raso et al., 2004; Razmyar et al., 2016; Sareyyupoglu et al., 2007). Porém, estes não trazem análise de proporção de concordância entre diagnóstico e suspeita clínica de clamidiose. Esses estudos incluíram dentre outras aves, papagaios *Psittacus* sp. e *Amazona* sp., além de *Serinus* sp. (Passeriformes).

A Instrução Normativa 179 (25/06/2008) do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), determinou a realização de exames laboratoriais como medidas para se prevenir a introdução de agentes infecciosos no meio ambiente, e garantir a sobrevivência a longo prazo dos animais em questão. O programa de reintrodução à natureza de aves silvestres administrado pelo CETAS-VDC em parceria com a Universidade Federal da Bahia, exerce papel importante na manutenção da biodiversidade da região do sudoeste baiano e entorno. Para o sucesso de tal ação é necessária a verificação da condição sanitária das aves a serem reintroduzidas.

Os resultados discordantes entre diagnóstico molecular e suspeita clínica da clamidiose apontam a importância do diagnóstico molecular para laudos assertivos. A discordância é justificada pela clamidiose (i) poder ser assintomática e (ii) não haver sinais clínicos patognomônicos desta doença (Fudge, 1984; Gerlach, 1994). A sintomatologia é influenciada pelo poder de virulência da bactéria e pelo sistema imunológico do indivíduo parasitado (Gerlach, 1994). Guzman et al. (2010) reportam que a clamidiose pode ser silenciosa em até 10 dias após a infecção em algumas espécies, como calopsita (*Nymphicus hollandicus*).

Considerando a fácil transmissão do patógeno da clamidiose, por inalação de fezes e secreções de aves (Andersen e Vanrompay, 2000), laudos falso negativos podem ser devastadores para população de aves que compartilham mesmo recinto. Em manejo e em programas de reintrodução exercidos por órgãos como os CETAS, uma fração de aves infectadas assintomáticas podem servir como vetores para outros indivíduos, tanto para a comunidade alocada nas instalações das instituições como para populações de animais silvestre (quando os animais forem reintroduzidos). O agente etiológico da clamidiose aviária é considerado cosmopolita (Andersen e Vanrompay, 2000); tendo sido encontrado em 30 ordens de aves (Kaleta e Taday, 2003). Os CETAS trabalham com grande trânsito de aves silvestres recém-chegadas das apreensões de tráfico. Situações de estresse animal, comida escassa e higiene precária são potencializadores da clamidiose (Gerlach, 1994;

Andersen e Vanrompay, 2000; Raso et al., 2004). Tais situações são frequentemente encontradas em animais traficados; o que propicia que animais acolhidos pelos CETAS se apresentem desta forma.

Laudos falso positivos de clamidiose também são considerados prejudiciais, considerando (i) a importância de tratamento medicamentoso ser direcionado ao patógeno correto (para que o tratamento seja efetivo sobre o paciente), e (ii) ao dano causado pelo desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos usados indiscriminadamente. Segundo Gerlach (1994), quanto ao tratamento de clamidiose vários antibióticos são eficazes quando testados *in vitro*. Contudo, experimentos *in vivo* demonstram a eficiência apenas de tetraciclina e enrofloxacinas (Gerlach, 1994). O tratamento para aves infectadas deve contemplar o período de 45 dias e ser realizado por profissional veterinário (CDC, 2000). Em acréscimo, em 2016, Razmyar et al. apontaram a eficiência de doxiciclina administrada em 25 mg/kg durante o período de 45 dias. Este estudo, corrobora com o protocolo apresentado pelo CDC, quanto ao quesito tempo (2000).

5.5 Ausência de correlação entre número e tipo de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose

Os sinais clínicos, não patognomônicos, da clamidiose em aves em geral incluem: (i) baixa temperatura corporal, (ii) plumagem áspera, (iii) letargia, (iv) tremores, (v) dispnéia, (vi) conjuntivite, (vii) anorexia e (viii) sinusite; e em particular em Psittaciformes, podem também haver os seguintes sinais (ix) convulsões e (x) desenvolvimento de déficit neurológico (Gerlach, 1994; Nasphv, 2017; Andersen & Vanrompay, 2000). Segundo Gerlach (1994) aves jovens expostas a alta carga viral, desenvolvem infecção sistêmica aguda, o que com frequência leva ao óbito; este não relata tempo para morte pós infecção e/ou sinais clínicos. Dentre os sinais clínicos de clamidiose reportados, foram considerados no presente estudo os seguintes sinais: conjuntivite, secreção nasal (indicadora de sinusite) e desnutrição (indicadora de anorexia). Os demais sinais clínicos de clamidiose, descritos na literatura, não foram considerados no presente trabalho pois não se apresentavam em frequência relevante ou apresentavam dificuldades em suas identificações.

A correlação dos sinais clínicos (considerando quantidade e qualidade) com diagnóstico molecular, sugeriram inicialmente haver tendência de possível relação entre quantidade

e qualidade de sinais clínicos com o diagnóstico. A análise quantitativa apontou que apesar de 2 e 1 sinais clínicos serem igualmente frequentes em indivíduos com diagnóstico positivo, 2 sinais estavam presentes na minoria (22%) dos indivíduos com diagnóstico negativo. A análise qualitativa encontrou os sinais secreção nasal e desnutrição como os aparentemente mais relacionados a clamidiose; visto que estes foram encontrados em 75% (secreção nasal) e 67% (desnutrição) dos indivíduos diagnosticados positivamente e em somente 44% e 33% (secreção nasal e desnutrição, respectivamente) dos indivíduos com diagnóstico negativo. A conjuntivite foi encontrada em 8% dos indivíduos diagnosticados positivamente e 44% dos diagnosticados como negativos para clamidiose. Apesar da relatada tendência de correlação entre número e tipos de sinais clínicos de clamidiose com diagnóstico molecular, estas não mostraram-se estatisticamente significativas. A falta de relação da conjuntivite com diagnóstico positivo para clamidiose no presente trabalho é contrastante com a informação de Gerlach (1994). Este, traz que a conjuntivite recorrente é geralmente o único sinal clínico aparente da clamidiose em psitacídeos (periquito - *Neophema sp.*).

A ausência de correlação entre (i) número e tipo em particular de sinal clínico e (ii) diagnóstico de clamidiose, confirma mais uma vez que os sinais clínicos somente devem ser considerados como indicativos de clamidiose. Ou seja, exame laboratorial é essencial para o diagnóstico de clamidiose para papagaios do gênero *Amazona* das espécies estudadas no presente trabalho. A Associação Nacional dos Veterinários de Saúde Pública dos Estados Unidos (Nasphv, 2017) defende a importância do diagnóstico de clamidiose sob a ótica do histórico do paciente. Por fim, o presente trabalho demonstra que laudo assertivo para a clamidiose em papagaios *Amazona sp*, necessariamente requer diagnóstico molecular.

5.6 Rápida positividade para clamidiose

Estudos mostram que infecção por *C. psittaci*, ocorre principalmente de uma ave para outra, a partir de excreções respiratórias e de fezes (Andersen & Vanrompay, 2000). Tal infecção pode ser potencializada por condições precárias e fatores estressantes para o animal, como (i) superlotação de aves num mesmo recinto, vinculada a (ii) má alimentação e (iii) saneamento básico deficiente (Raso et al., 2004). Um animal comumente se encontra em tais condições durante o seu tráfico.

Guzman et al. (2010) relataram positividade para a presença de *C. psittaci* em 16 dias em calopsitas. Page et al. (1959) detectaram positividade para a presença do patógeno após 3 dias em Phasianidade. Guzman et al (2010) estabeleceram o tempo, através de estudos experimentais, com análise de swab cloacal em PCR. Page et al. (1959) detectaram corpos elementares em material cloacal, utilizando-se de microscopia. No trabalho de Guzman et al (2010) o patógeno foi detectado em todos os animais, nos quais foram inoculados através do estudo experimental. Page et al. (1959) não relataram em que proporção dos animais foi detectada a presença de *C. psittaci*.

No presente estudo, utilizando-se de PCR, em intervalos de aproximadamente (i) 13 e (ii) 10 dias (1º e 2º intervalos de observação) houveram (i) 36% e (ii) 22% de papagaios que passaram de diagnóstico inicial negativo de clamidiose para diagnóstico positivo para esta patologia. Porém, o presente trabalho não estabeleceu o tempo mínimo para a positividade. Ao comparar com a literatura, os tempos de positividade encontrados no presente trabalho foram mais próximos ao tempo descrito por Guzman et al. (2010) do que por Page et al. (1959). O trabalho de Guzman et al. (2010) tem mais pontos de semelhança com o do presente trabalho, como espécies de animais estudados para a infecção (também psitacídeos), método de detecção do patógeno (utilização de PCR) e material biológico utilizado para a detecção do patógeno (swab cloacal).

O trabalho realizado por Page et al. (1959), com Phasianidade, também demonstrou a ocorrência de sinais clínicos evidentes a partir do 7º dia após a infecção. Os únicos registros quanto a sintomatologia que o presente trabalho fez ao longo do tempo foi a morte de alguns (n=4) indivíduos; o que ocorreu em até 10 dias entre diagnóstico negativo e diagnóstico positivo para clamidiose. Mais comparações quanto ao tempo de evolução clínica não podem ser realizadas.

Durante o período analisado quanto a positividade para clamidiose, houve realocação dos indivíduos diagnosticados como positivos. A realocação ocorreu para viabilizar o tratamento dos indivíduos, bem como para reduzir o risco de contaminação dos animais com diagnóstico negativo. Dada a rápida dispersão do agente etiológico da clamidiose, o tempo (i) do processamento das amostras para determinação do diagnóstico molecular, (ii) da realocação dos indivíduos e (iii) da coleta de amostras dos indivíduos anteriormente negativados para a clamidiose, podem (em conjunto ou em separado) ter sido fatores determinantes para a infecção (rápida) dos indivíduos negativados. Os resultados aqui apresentados demonstram a necessidade de triagens sanitárias frequentes

(incluindo coleta de amostras e processamento do diagnóstico) e realocação imediata dos indivíduos positivados para clamidiose aviária.

Por fim, os resultados apontam (i) eficiência da utilização de método de extração de DNA simples (previamente descrito, e menos oneroso) no diagnóstico molecular da clamidiose; (ii) eficiência equivalente do uso de água como meio de transporte para amostra biológica utilizada em diagnóstico molecular de clamidiose, ao comparar com meios suplementados com soro animal (mais oneroso); (iii) prevalência de 37% de clamidiose na amostra, (iv) coincidência de 68%, estatisticamente significativa, entre diagnóstico molecular e suspeita clínica de clamidiose; (v) não haver correlação estatisticamente significativa entre quantidade e tipo de sinal clínico com diagnóstico molecular de clamidiose; (vi) positividade para clamidiose em 50% dos indivíduos acompanhados quanto a positividade.

6 Agradecimentos

Ao Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), ligado à Prefeitura de Vitória da Conquista, por possibilitar a coleta do material biológico. Agradecemos especialmente aos médicos veterinários Aderbal Azevedo e Rosana Elizabete F. Ladeia e a bióloga Gisele Filadelfo. Ao docente da UFBA, Antônio Carlos Ricardo Braga Júnior, agradecemos pelo auxílio com as análises estatísticas. Agradecemos ainda ao docente da UFBA Ricardo Evangelista Fraga pelo auxílio com as coletas das amostras biológicas, reconhecimento e registro dos sinais clínicos dos papagaios. Aos graduandos de Ciências biológicas Ana Tereza Teixeira Silva Dourado e Bárbara Silva Alves agradecemos pelo auxílio na coleta das amostras, a Douglas Campos Pereira e Flávia de Souza Nascimento pela ajuda com resolução de questões técnicas na padronização do diagnóstico molecular.

DECLARACAO DE INTERESSE

Nenhum.

DECLARACAO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

7 Referências

Andersen, A. A. & Vanrompay, D. Avian chlamydiosis. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, vol 19, p. 396-404, 2000.

Brasil, Instrução Normativa n.169, de 20 de fevereiro de 2008. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, p.13. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=585>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

Braz, M. A., Silva, D. C., Santiago, M. E. B., Garcia, S. D., Nakamura, A. A., Meireles, M.V. 2014. Detecção e classificação molecular de *Chlamydophila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.66, n.1, p.161-167.

Buxton, D., Rae, A.G., Maley, S.W., Thomson, K.M., Livingstone, M., Jones, G.E., Herring, A.J., 1996. Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. *J. Comp. Pathol.* 114, 221–230.

Caldwell, H. D. & Judd, R. C. Structural Analysis of Chlamydial Major Outer Membrane Proteins. *American Society for Microbiology – Infection and Immunity*, Vol. 38, No. 3, p. 960 – 968. 1982.

Cbro (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2014. Disponível em: <http://www.cbro.org.br/PDF/avesbrasil_2014jan1.pdf>. Acesso em: 10 de nov. 2018.

Cdc – Centers for Disease Control and Prevention. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis), 2000. *MMWR Recomm Rep.* 2000;49(RR-8):3–17.

Costa, F. J. B. Espécies de Aves Traficadas no Brasil Uma Meta-Análise com Ênfase nas Espécies Ameaçadas. *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, vol. 7, n. 2, p. 324-346. 2018.

Everett, K.D., Bush, R.M., Andersen, A.A., 1999. 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (Pt 2), 415–440.

Fan, H. H. 1995. Application of Polymerase Chain Reaction with Arbitrary Primers to Strain Identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, Vol 39, p. 729 – 735. 1995.

Ferreira, L. L. 2014. Detecção molecular da *Chlamydophila psittaci* em Columbiformes e Galliformes da região centro-sul do Estado de Goiás. 2014. 57 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Fudge AM. 1984. Update on chlamydiosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*; 14(2):201-21.

Geens, T., Desplanques, A., Van Loock, M., Bonner, B.M., Kaleta, E.F., Magnino, S., Andersen, A.A., Everett, K.D., Vanrompay, D., 2005a. Sequencing of the *Chlamydophila psittaci* ompA gene reveals a new genotype, E/B, and the need for a rapid discriminatory genotyping method. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2456–2461.

Geens, T., Dewitte, A., Boon, N., Vanrompay, D., 2005b. Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific realtime PCR. *Vet. Res.* 36, 787–797.

Gerlach, H., 1994. Chlamydia. In: Ritchie, B.W., Harrison, G.J., Harrison, L.R. (Eds.), *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers, FL, pp. 984–996.

Grespan, A. 2009. Clamidiose em *Calopsitas* (*Nymphicus hollandicus*): perfil do proprietário e ensaio terapêutico. 111f. São Paulo, 2009. Dissertação 12 (mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo.

Guzman, D.S. et al. Evaluating 21-day doxycycline and azithromycin treatments for experimental *Chlamydia psittaci* infection in Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v.24, n.1, p.35- 45, 2010.

Hatch, T. P. et al. Identification of a Major Envelope Protein in *Chlamydia* spp. *Journal of Bacteriology*. Vol. 146, No. 1. p. 426 – 429. 1981.

Hewinson, R. G. et al. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. n. 54, p. 155 – 166, 1997.

Kaleta, E. F.; Taday, M. A. Avian host range of *Chlamydia* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, v.32, n.5, p.435-462, 2003.

Laçava, U. (coord.). Tráfico de animais silvestres no Brasil: um diagnóstico preliminar. WWF-Brasil, Brasília. 1995

Matsumoto A. e Marine G. P. Electron Microscopic Observations on the Fine Structure of Cell Walls of *Chlamydia psittaci*. *American Society for Microbiology – Journal of Bacteriology*, Vol. 104, No. 3, p 1332 – 1337, 1970.

McClenaghan, M.; Honeycombe, J.R. and Aitken, I.D. 1984. Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis. *Infect. Immun.*, 45: 384-389.

Moulder, J.W., 1966. The relation of the psittacosis group (chlamydiae) to bacteria and viruses. *Annu. Rev, Microbiol.*, 20: 107-130.

Moulder, J.W. Interaction of *Chlamydiae* and Host Cells In Vitro. *Microbiological Reviews*. Vol. 55, No. 1, 1991.

Nasphv – National Association of Public Health Veterinarians. Compendium of Measures to Control *Chlamydia psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), *Journal of Avian Medicine and Surgery*. Vol 31 (3), p. 262–282, 2017.

Page, L.A., 1959. Experimental omithosis in turkeys. *Avian Dis.*, 3: 51-66.

Pickett, M.A., Everson, J.S. and Clarke, I.N., 1988. *Chlamydia psittaci* ewe abortion agent: complete nucleotide sequence of the major outer membrane protein gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 55: 229-234.

Proença, L.M.; Fagliar J.J.; Raso T.F. 2011. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Ciência Rural*. Vol.41, no.5.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Raso, T.F., Berchieri Jr., A., Pinto, A.A., 2002. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrot in Brazil. *J. Zoo Wildlife Med.* 33, 118–121.

Raso, T.F., Godoy, S.N., Milanelo, L., Souza, C.A.I., Matushima, E.R., Araújo Jr., J.P., Pinto, A.A., 2004. An outbreak of chlamydiosis in captive Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. *J. Zoo Wildlife Med.* 35, 94– 96.

Raso, T. F., Seixas, G. H. F., Guedes, N. M. R., Pinto, A. A. 2006. *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,

Razmyar, J., Rajabioun, M., Zaeemi, M., Afshari, A. 2016. Molecular identification and successful treatment of *Chlamydophila psittaci* (genotype B) in a clinically affected Congo African grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). *Iranian Journal of Veterinary Research*. Vol. 17, no. 4, p. 281 – 285.

Ribeiro, L. B. & Silva, M. G. 2007. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. *Ciência e Cultura*. Vol. 59, no. 4, São Paulo,

Sachse, K., Hotzel, H. 2003. Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested PCR. In: PCR Detection of Microbial Pathogens, Sachse K. & Frey J., eds. Humana Press. New Jersey, USA, p. 123 –136.

Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., Longbottom, D. 2009. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, v.135, p.2-21.

Salari, S. H. & Ward, M. E. 1981. Polypeptide Composition of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of General Microbiology*. 123, 197 – 207.

Sareyyupoglu, B., Cantekin, Z., Bas, B. 2007. *Chlamydophila psittaci* DNA detection in the faeces of cage birds. *Zoon. Pub. Health*, v.54, p.237-242.

Souza, Patrícia da Cruz. 2017. Detecção de microrganismos de importância veterinária em psitacídeos de cativeiro em Vitória da Conquista, Bahia. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista.

Vanrompay, D., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. et al. 1995. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*. Vol 45, p 93 – 119.

Vanrompay, D., Butaye, P., Sayada C., Ducatelle R., Haesebrouck F. 1997. Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res Microbiol*; 148: 327–333.

Wyllie, S., Ashley, R. H., Longbottom, D., Herring, A. 1998. The Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia psittaci* Functions as a Porin-Like Ion Channel. *American Society for Microbiology – Infection and Immunity*, Vol. 66, No. 11, p 5202 – 5207,

Zhang, X. Y., Morrison, S. G., Caldwell, H. D., Baehr W. 1989. Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein genes of two *Chlamydia psittaci* strains.

American Society for Microbiology – Infection and Immunity, Vol. 57, No. 5, p. 1621 – 1625.

8 Figuras, tabelas e quadros

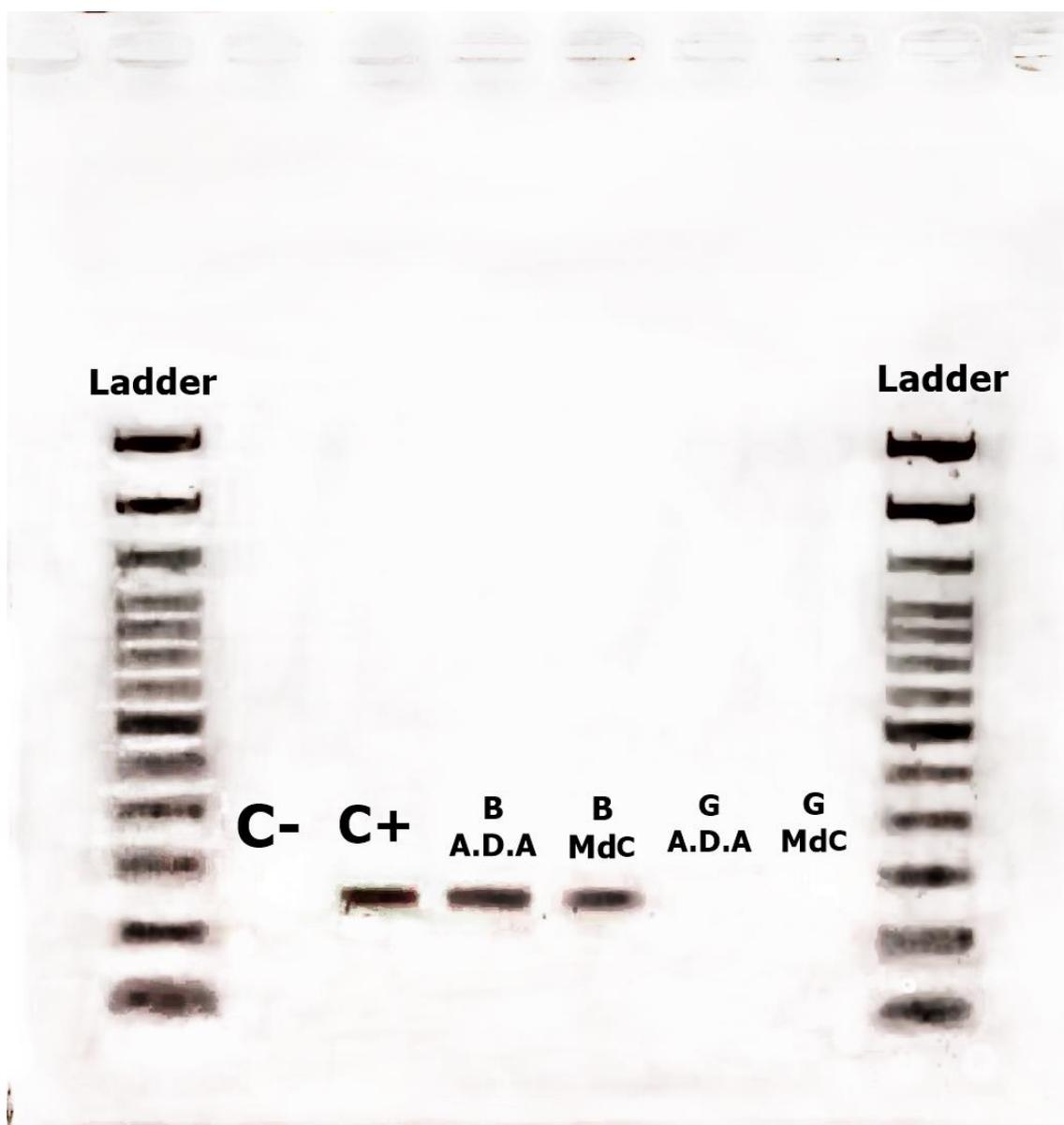


Figura 1 – Gel de agarose (2%), mostrando marcador molecular utilizado no diagnóstico de clamidiose em papagaios (*Amazona* sp.). Amostras aplicadas: C- (controle negativo – reação de PCR sem DNA), C+ (controle positivo – reação de PCR com DNA extraído de vacina comercial para gatos Fel-O-Vax® LvK IV + CaliciVax®), amostras B e G (amostras de indivíduos cujo diagnóstico molecular foi aqui estabelecido). As amostras biológicas de swab que foram transportadas do local de coleta até o local de extração de DNA em Água Destilada Autoclavada estão identificadas como “A.D.A” e as amostras que foram transportadas em Meio de Cultura estão identificadas como “MdC”. O marcador molecular de diagnóstico de clamidiose equivale a banda de DNA de aproximadamente 264 pb. Ladder 100pb a 1 Kb (BioBasic, SP-Brasil). Os últimos fragmentos do Ladder lidos de baixo para cima possuem os seguintes tamanhos: 100, 200 e 300 pb. DNA corado com brometo de etídeo. Os indivíduos provem do CETAS – Vitória da Conquista (BA), Brasil. A imagem do gel teve suas cores invertidas para facilitar a visualização das bandas de DNA.

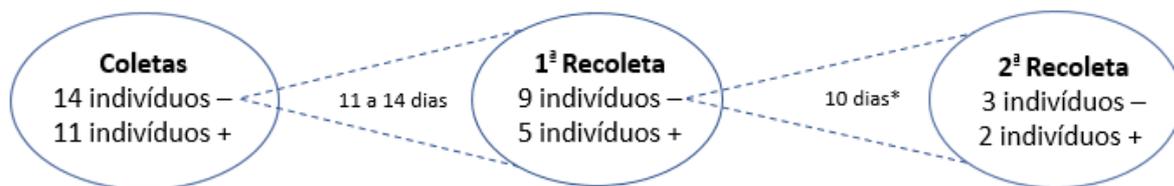


Figura 2 - Desenho esquemático do acompanhamento, quanto a positividade para clamidiose, de papagaios com diagnóstico molecular inicialmente negativo. As amostras biológicas (swab cloacal) foram coletadas de papagaios alocados no CETAS – Vitória da Conquista (BA, Brasil). As coletas ocorreram em 25 e 28/09/18. A 1ª Recoleta aconteceu em 10/10/2018. A 2ª Recoleta ocorreu em 19/10/2018. As recoletas de amostras ocorreram somente dos indivíduos negativados para clamidiose. O estado negativado (-) e positivado (+) dos indivíduos para a clamidiose foi determinado por diagnóstico molecular. O diagnóstico ocorreu pela presença (em eletroforese) do marcador molecular de 264 pb. Os intervalos (i) entre Coletas e 1ª Recoleta foram de 11 a 14 dias e (ii) entre 1ª Recoleta e 2ª Recoleta foi de 10 dias (*Neste intervalo morreram 4 indivíduos). No total o acompanhamento dos indivíduos negativados para a clamidiose foi de 21 a 24 dias. No período do estudo, os indivíduos diagnosticados positivamente para clamidiose foram realocados para recintos próprios para quarentena, enquanto os demais foram mantidos nos recintos com indivíduos sem suspeita clínica.

Tabela 1 - Análise quantitativa e qualitativa das amostras de DNA extraídas.

	Concentração de DNA (ng/uL)	Indicadores de pureza de DNA com contaminantes	
		Orgânicos	Proteínas
Média das amostras	304,15	0,48	0,79
Menor valor encontrado	10,0	0,31	0,29
Maior valor encontrado	1902,9	1,02	1,90

A tabela demonstra valores de análise das amostras de DNA extraídas dos 59 indivíduos estudados. Os indicadores de pureza de DNA estabelecem que a amostra está pura se em relação aos (i) Contaminantes orgânicos o valor estiver entre 2,0 e 2,2 e aos (ii) Contaminantes proteínas o valor estiver entre 1,7 e 2,0.

Tabela 2 - Influência do meio de transporte das amostras biológicas para a detecção de *C. psittaci*.

Indivíduos	Resultado do diagnóstico molecular	
	Água	Meio de cultura
A	+	+
B	+	+
C	+	+
D	+	+
E	-	-
F	+	+
G	-	-
H	+	+
I	-	-
J	+	+
Diagnostico molecular positivo	7	7

Os meios de transporte utilizados foram: Água destilada autoclavada (A.D.A) e Meio de cultura (meio de transporte de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* suplementado com soro equino, (Cruz et al. 2017). As amostras biológicas foram swab cloacal de papagaios (alocados no CETAS – Vitoria da Conquista). Dos 10 indivíduos considerados, amostras de seis foram coletadas em 25/09/18 (2,3,4,5,6,8) e de quatro em 19/10/18 (53,54,55,56). A extração de DNA, das amostras mantidas no meio de transporte a 4°C sem agitação, foi realizada no mesmo dia sobre as amostras acondicionadas em A.D.A. e no terceiro dia nas amostras mantidas em Meio de cultura. Quanto aos resultados do diagnóstico molecular para a clamidiose (presença de *C. psittaci*) – “+” aponta diagnóstico positivo e “-“ aponta diagnóstico negativo. O diagnóstico molecular foi obtido através de marcador molecular amplificado por PCR e identificado em eletroforese.

Tabela 3 – Suspeita clínica e diagnóstico molecular de clamidiose em papagaios alocados no CETAS – Vitória da Conquista (BA), Brasil.

Indivíduos Coleta 1	Suspeita e Diagnóstico		Indivíduos Coleta 2	Suspeita e Diagnóstico		Indivíduos Coleta 3	Suspeita e Diagnóstico		Indivíduos Coleta 4	Suspeita e Diagnóstico	
	Clínica	Molecular									
1*	-	-	1*	-	-	18*	+	+	CETASVCA 035#	+	-
3#	+	-	2*	+	+	19§	-	+	CETASVCA 051*	-	-
4*	+	+	3*	+	+	20*	-	-	CETASUFBA 061*	+	+
5*	+	+	4*	+	+	21§	-	+	CETASUFBA 062*	+	+
6#	+	-	5*	+	+	22*	-	-	CETASUFBA 063§	-	+
8*	+	+	6#	+	-	23*	-	-	CETASUFBA 064*	-	-
11#	+	-	7*	-	-	24*	-	-	CETASUFBA 065*	-	-
12#	+	-	8§	-	+	25*	-	-	CETASUFBA 066*	-	-
13§	-	+	9§	-	+	26§	-	+	CETASUFBA 067*	-	-
14#	+	-	10§	-	+	27*	-	-	CETASUFBA 068*	-	-
16*	+	+	11#	+	-	28*	-	-	CETASUFBA 069*	-	-
19*	+	+	12*	-	-				CETASUFBA 070*	-	-
20#	+	-	13*	-	-				CETASUFBA 071§	-	+
			14*	-	-				CETASUFBA 072*	-	-
									CETASUFBA 073*	-	-
									CETASUFBA 074*	-	-
									CETASUFBA 075*	-	-
									CETASUFBA 076*	-	-
									CETASUFBA 077*	-	-
									CETASUFBA 078*	-	-
									CETASUFBA 079§	-	+

As coletas 1, 2, 3 e 4 correspondem a coletas de amostras biológicas (swab cloacal) de papagaios (alocados no CETAS-VDC, Brasil) nas seguintes datas 05, 25, 28/09/18 e 02/10/18, respectivamente. Quanto ao diagnóstico (da clamidiose), “+” representa diagnóstico positivo e “-” representa diagnóstico negativo. A suspeita clínica foi determinada pela presença de um ou mais dos seguintes sinais: conjuntivite, secreção nasal e desnutrição. O diagnóstico molecular foi obtido através de marcador molecular amplificado por PCR e identificado em eletroforese. Foram analisados 59 indivíduos. Os indivíduos marcados com “*” consistem nos com suspeitas clínicas e diagnóstico molecular coincidentes. Os indivíduos marcados com # consistem nos que tiveram suspeita clínica positiva e diagnóstico molecular negativo (suspeita clínica para falso positivo). Os indivíduos marcados com § consistem nos que tiveram suspeita clínica negativa e diagnóstico molecular positivo (suspeita clínica para falso negativo). Identificações coincidentes entre indivíduos da Coleta 1 e 2, não indicam os mesmos indivíduos.

Tabela 4 - Quantidade e tipos de sinais clínicos e diagnóstico molecular de clamidiose, em papagaios alocados no CETAS – Vitória da Conquista (BA), Brasil.

Indivíduos sintomáticos	Sinais Clínicos				Diagnóstico molecular
	Número de Sinais	Conjuntivite	Secreção nasal	Desnutrição	
Coleta 1					
3	1	X			-
4	2		X	X	+
5	2		X	X	+
6	1	X			-
8	2		X	X	+
11	2		X	X	-
12	1		X		-
14	1	X			-
16	1		X		+
19	2	X	X		+
20	1			X	-
Coleta 2					
2	2		X	X	+
3	1		X		+
4	1			X	+
5	2		X	X	+
6	2	X		X	-
11	1		X		-
Coleta 3					
18	1			X	+
Coleta 4					
CETASVCA 035	1		X		-
CETASUFBA 061	1		X		+
CETASUFBA 062	1			X	+

As coletas 1, 2, 3 e 4 correspondem a coletas de amostras biológicas (swab cloacal) de papagaios (alocados no CETAS-VDC) nas seguintes datas 05, 25, 28/09/18 e 02/10/18, respectivamente. A suspeita clínica foi determinada pela presença de um ou mais dos seguintes sinais: conjuntivite, secreção nasal e desnutrição. Cada indivíduo está caracterizado clinicamente quanto aos sinais apresentados, apontando-os (quando presente) como “X”. O diagnóstico molecular foi obtido através de marcador molecular amplificado por PCR e identificado em eletroforese. Cada indivíduo está identificado quanto ao diagnóstico molecular da clamidiose, utilizando “+” para diagnóstico positivo e “-” para diagnóstico negativo. Foram considerados nesta análise a parte da amostra de indivíduos estudados que apresentavam sinais clínicos (N=21).

Quadro 1 - Comparação de suspeita clínica e diagnóstico molecular de clamidiose.

Suspeita clínica	Diagnóstico molecular	
	+/ (+) coincidentes n=12 (20%)	+/ (-) falso positivo n=9 (15%)
-/ (+) falso negativo n=10 (17%)	-/ (-) coincidentes n=28 (48%)	

Suspeita clínica foi definida pela presença de um ou mais dos 3 sinais clínicos de clamidiose considerados no presente trabalho (conjuntivite, secreção nasal e desnutrição). O diagnóstico molecular foi obtido através de marcador molecular amplificado por PCR e identificado em eletroforese. Sinal “+” corresponde a presença da suspeita ou do diagnóstico e Sinal “-” a presença ou ausência dos mesmos. O sinal que aponta a presença ou não da suspeita clínica está identificado em negrito. O sinal que indica a presença ou não do diagnóstico molecular positivo está sinalizado entre parênteses. n= indica o número de indivíduos correspondentes as diferentes combinações. As percentagens referem-se a proporção de indivíduos distribuídos em cada combinação. Foram considerados nesta análise o total de indivíduos estudados no presente trabalho (N=59).

Quadro 2 - Correlação entre quantidade e tipos de sinais clínicos com diagnóstico molecular de clamidiose.

Sinais clínicos (N=21)	Diagnóstico molecular		Total
	Positivo (N=12; 57%)	Negativo (N=9; 43%)	
Análise quantitativa			
1 sinal	n=6 (50%)	n=7 (78%)	n=13 (62%)
2 sinais	n=6 (50%)	n=2 (22%)	n=8 (38%)
3 sinais	n=0 (0%)	n=0 (0%)	n=0 (0%)
Análise qualitativa			
Conjuntivite	n=1 (8%)	n=4 (44%)	n= 5 (24%)
Secreção nasal	n=9 (75%)	n=4 (44%)	n=13 (62%)
Desnutrição	n=8 (67%)	n=3 (33%)	n=11(52%)

Os 3 sinais clínicos de clamidiose considerados no presente trabalho foram conjuntivite, secreção nasal e desnutrição. O diagnóstico molecular foi obtido através de marcador molecular amplificado por PCR e identificado em eletroforese. n= indica o número de indivíduos correspondentes as diferentes combinações. As percentagens (aproximadas) referem-se a proporção de indivíduos distribuídos em cada combinação. Foram considerados nesta análise a parte da amostra de indivíduos estudados que apresentavam sinais clínicos (N=21).

