



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA

PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

SIMONE APARECIDA ALMEIDA ARAUJO

**ESTUDO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Chlamydophila* sp. EM
PSITACIFORMES MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ**

**BELÉM – PA
2015**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UF
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

SIMONE APARECIDA ALMEIDA ARAUJO

ESTUDO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Chlamydophila* sp. EM PSITACIFORMES MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia –PPGSPAA/UFRA, como pré-requisito para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Saúde Animal.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

Co-orientadores: Dr. Sandro Patroca da Silva

Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes

BELÉM – PA
2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA

PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

SIMONE APARECIDA ALMEIDA ARAÚJO

**ESTUDO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Chlamydophila* sp. EM
PSITACIFORMES MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia –PPGSPAA/UFRA, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde Animal.

BANCA EXAMINADORA

Washington Luiz Assunção Pereira - Doutor – Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Alexandre Do Rosário Casseb – Doutor – 1º examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Hilma Lúcia Tavares Dias - Doutora - 2º examinador
Universidade Federal do Pará

Andréa Maria Góes Negrão - Doutora - 3º examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Conceição de Maria Almeida Vieira - Doutora - Suplente
Universidade Federal Rural da Amazônia

FONTES FINANCIADORAS



Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
CAPES



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -
CNPq

CASADINHO/PROCAD. Projeto de cooperação acadêmica interinstitucional Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Chamada Pública MCTI/CNPq/MEC/Capes - Ação Transversal nº 6/2011.

*À Deus, pelo dom da vida e pela
certeza de que nunca estou sozinha.*

*“O talento vence jogos, mas só o trabalho em equipe ganha
campeonatos”.*

(Michael Jordan)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Washington Pereira, pela confiança, apoio, amizade e principalmente pela generosidade em ter me orientado e ajudado a concretizar este trabalho.

Aos meus co-orientadores, Dr. Márcio Nunes e ao Dr. Sandro Patroca, pela oportunidade de ter trabalhado junto à equipe do CIT/IEC, pelos ensinamentos repassados e apoio que foram fundamentais para o melhoramento deste trabalho.

À Professora Dr^a Fernanda Hatano pela amizade, apoio, generosidade, orientação durante o estágio em docência e por ser um exemplo como pessoa.

À equipe técnica dos criadouros envolvidos neste trabalho, pela recepção e empenho em realizar esta pesquisa.

À toda a equipe do LABOPAT/UFRA pelo acolhimento, amizade, trabalho duro e comprometimento, que foram de fundamental importância na realização deste trabalho.

À equipe do CIT/IEC, principalmente ao Sandro, Clayton, Keyla, Luciana e Jedson pela excelente convivência, conhecimentos repassados e por disponibilizarem o seu escasso tempo livre para me ajudar.

À equipe Laboratório de Tecnologia Biomolecular da UFPA, em especial ao Dr Evonnildo Costa Gonçalves pela generosidade e apoio científico.

Aos meus Pais (Josué e Lúcia), as minhas irmãs (Suelen e Samara) e ao meu sobrinho (Murilo) por não medirem esforços para que eu alcance os meus objetivos, por todo o amor, paciência e por sempre estarem ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Tony, pelo carinho, respeito e por sempre incentivar os meus planos, sendo não somente ser um namorado e sim um amigo.

À UFRA, CAPES, FAPESPA e CNPq pelo apoio financeiro fundamental para o desenvolvimento nesse trabalho;

À todas as pessoas que me ajudaram e que não foram citadas, porém não são menos importantes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do ciclo de desenvolvimento da *Chlamydophila* sp. na célula do hospedeiro..... 23
- Figura 2:** Mapa da distribuição das Mesorregiões do Estado do Pará: Criatórios mantenedores de fauna silvestre selecionados para estudo (*)......35
- Figura 3.** Método de imobilização manual utilizado para a contenção física das aves.....38
- Figura 4:** Emprego de pinças hemostáticas como auxílio na abertura do bico das aves menores para a coleta de suabe de orofaringe.....39
- Figura 5:** Abertura de bico utilizando um abre boca específico para aves.....39
- Figura 6:** Coleta de suabe cloacal a partir da contenção manual e deslocamento da cauda....40
- Figura 7:** Sequência de nucleotídeos amplificada pela *semi-nested* PCR, através da utilização de *primers* dirigidos a a uma região conservada do gene da *Major Outer Membrane Protein* (MOMP) de *C. psittaci* (imagem gerada pelo programa *genious* 6.0).....42
- Figura 8** Sequências de DNA amplificadas através da *semi-nested* PCR em gel de agarose 2%. L = Marcador de peso molecular de 100 pb; 1^A = Amostra de suabe cloacal; 1^B = Amostra de suabe de orofaringe; ; (*) Amostras positivas; C+ = Controle positivo (vacina felina Felocell[®]); C- = Controle negativo (água ultra pura).....44
- Figura 9:** Gráfico da distribuição das amostras positivas na *semi-nested* PCR de acordo com o sítio de excreção do agente infeccioso.....47
- Figura 10:** Gráfico da distribuição dos resultados da *semi-nested* PCR de acordo com o criadouro analisado e classificação das aves positivas, considerando o sítio de eliminação do agente infeccioso. (*) Criadouros que apresentaram diferença estatística (*p-value*= 0.02963).....48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Número de indivíduos analisado, valor total e percentual da frequência de espécies de psitacídeos positivos no teste da semi-nested PCR.....45
- Tabela 2:** Conceitos aplicados aos principais aspectos higiênico sanitários observados nos criadouros selecionados para o estudo.....49
- Tabela 3:** Sintomatologia observada no exame clínico individual dos animais dentro dos seus respectivos criadouros, valor absoluto e percentual de cada alteração clínica visualizada em relação ao número total de aves amostradas.....51
- Tabela 4:** Relação entre a presença de sinais clínicos sugestivos de clamidiose e os resultados obtidos na *semi-nested* PCR.....52

LISTA DE SIGLAS

AST - Transaminase Glutâmico Oxalacética
ATP - Adenosina Trifosfato
CE - Corpúsculo Elementar
CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres
CI - Corpúsculo Intermediário
CIT - Centro de Inovações Tecnológicas
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
CR - Corpúsculo Reticulado
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
ELISA - Ensaio Imunoenzimático
EPI's - Equipamentos de Proteção Individual
HPLC - *High Performance Liquide Chromatography*
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
IEC – Instituto Evandro Chagas
IFI – Imunofluorescência Indireta
IgG – Imunoglobulina G
IHQ – Imuno histoquímica
LABOPAT – Laboratório de Patologia Animal
LPS – Lipopolissacarídeo
MIF – Microimunofluorescencia
MOMP - *Major Outer Membrane Protein*
PCR – Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase
FC – Fixação do Complemento
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorfism*
RNA - Ácido Ribonucléico
SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisFauna - Sistema Nacional de Gestão da Fauna Silvestre
TAE - Tris-Acetato-EDTA
UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia
UV – Ultra violeta

LISTA DE SIMBOLOS

mg - Miligrama

μL – Microlitro

μM - Micromolar

Kg - Quilograma

Mg^{2-} – Ânion Magnésio

MgCl_2 – Cloreto de magnésio

nm – Nanômetro

Nº - Número

°C – Graus Celsius

pb – Pares de base

rpm – Rotações por minuto

s – Segundos

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	27
1. INTRODUÇÃO	- 30 -
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	- 32 -
2.1. OS PSITACÍDEOS	- 32 -
2.2. ETIOLOGIA	- 33 -
2.3. EPIDEMIOLOGIA	- 34 -
2.4. PATOGENIA.....	- 35 -
2.5. SINAIS CLÍNICOS	- 37 -
2.5.1. Em aves.....	- 37 -
2.5.2. Em humanos.....	- 38 -
2.6. ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	- 39 -
2.7. DIAGNÓSTICO	- 40 -
2.7.1. Isolamento.....	- 40 -
2.7.2. Sorologia.....	- 41 -
2.7.3. Reação em Cadeia Mediada pela polimerase (PCR)	- 42 -
2.8. TRATAMENTO	- 44 -
2.9. CONTROLE E PROFILAXIA	- 44 -
2.10. CLAMIDIOSE AVIÁRIA E IMPLICAÇÕES ZOONÓTICAS	- 45 -
3. OBJETIVOS	- 47 -
3.1. OBJETIVO GERAL:	- 47 -
3.2.1. Objetivos específicos:	- 47 -
4. METODOLOGIA	- 48 -
4.1. ANIMAIS E LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ESTUDO.....	- 48 -
4.2. EXAME CLÍNICO INDIVIDUAL DOS ANIMAIS E AVALIAÇÃO DO CRIADOURO	- 49 -
4.3. CONTENÇÃO FÍSICA E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	- 50 -
4.4. MÉTODO DE CONSERVAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	- 52 -
4.6. REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE - PCR.....	- 53 -
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	- 55 -
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 56 -
6. CONCLUSÃO.....	- 65 -
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 67 -
ANEXO 2.....	69

ESTUDO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *CHLAMYDOPHILA* sp. EM PSITACIFORMES MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ

RESUMO

Os psitacídeos possuem distribuição mundial e junto aos columbiformes, representam os animais mais suscetíveis a infecção pela *Chlamydophila psittaci*, uma bactéria Gram negativa, intracelular obrigatória, de alto potencial zoonótico, que causa clamidiose em aves domésticas e silvestres e psitacose em humanos. Nas aves, a doença pode estar presente de forma inaparente ou desencadear o aparecimento de sintomas como secreção nasal, ocular e diarreia, cuja via de eliminação funciona como fonte de infecção para outros animais suscetíveis. O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo clínico e o diagnóstico molecular da infecção por *Chlamydophila* sp. em psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado do Pará, bem como identificar possíveis fatores de risco envolvidos na prevalência desta doença nos criadouros. Foram utilizadas amostras de suabe cloacal e de orofaringe de 201 psitacídeos distribuídos em quatro criadouros localizados nas Mesorregiões Metropolitana de Belém (C1 e C2), Nordeste Paraense (C3) e Baixo Amazonas (C4). As amostras de DNA foram extraídas pelo Chelex 100 à 5% e submetidas ao teste molecular a partir da *semi-nested* PCR. As análises estatísticas foram realizadas segundo o teste de proposições utilizando o R e Qui quadrado ($p < 0,05$). Em todos os criadouros foi confirmado a infecção pela *Chlamydophila* sp., com uma prevalência de 31,84% (64/201) de aves infectadas, não sendo observada pré disposição espécie-específica à doença entre as aves amostradas. Os resultados da *semi-nested* PCR demonstraram que 13,93% (28/201) das aves eliminavam o agente infeccioso pela cloaca, 11,44% (23/201) pela orofaringe e 6,47% (13/201) pela cloaca e orofaringe. A análise dos resultados na *semi-nested* PCR em cada localidade revelou uma diferença estatística significativa entre os criadouros C2 e C3 ($p = 0.02963$), os quais foram os criadouros com o menor e maior número de casos diagnosticados. Falhas na adoção de boas práticas de manejo higiênico sanitário nos criadouros, influenciaram positivamente no aumento do número de aves doentes. A maior parte dos animais 27,86% (56/201) estavam sob a condição de portador inaparente da enfermidade e somente 3,98% (8/201) das aves com diagnóstico positivo, apresentavam algum sinal clínico sugestivo da doença.

Palavras chave: *Chlamydophila* sp., psitacídeos, clamidiose, *semi-nested* PCR.

CLINICAL STUDY AND MOLECULAR DIAGNOSTIC OF *Chlamydophila* sp. IN PSITTACIFORMS HELD CAPTIVE IN PARÁ STATE.

ABSTRACT

Parrots have worldwide distribution and next to columbiformes represent the animals more susceptible to infection by *Chlamydophila psittaci*, a negative Gram bacteria, obligate intracellular, high zoonotic potential, which causes chlamydiosis in domestic and wild birds and psittacosis in humans. In birds, the disease may be present in unapparent form or trigger the onset of symptoms such as nasal discharge, ocular and diarrhea, whose elimination pathway works as a source of infection to other susceptible animals. The aim of this search was a clinical study and molecular diagnosis of infection *Chlamydophila* sp. in parrots kept in captivity in the state of Pará, and to identify possible risk factors involved in the prevalence of this disease in breeding. Samples of cloacal swabs and oropharyngeal of 201 parrots were used over four breeding located in Metropolitan Mesoregions of Belém (C1 and C2), Paraense Northeast (C3) and Lower Amazon (C4). The DNA samples were extracted by Chelex 100 to 5% and subjected to molecular test from the semi-nested PCR. Statistical analyzes were performed according to test propositions using R and Chi square test ($p < 0.05$). In all breeding was confirmed infection by *Chlamydophila* sp., With a prevalence of 31.84% (64/201) of infected birds, not being observed predisposition species-specific disease among the sampled birds. The results of the semi-nested PCR showed that 13.93% (28/201) of birds eliminated the infectious agent by the cloaca, 11.44% (23/201) by the oropharynx and 6.47% (13/201) for the cloaca and oropharynx. The results in the semi-nested PCR in each locality showed a statistically significant difference between the breeding C2 and C3 ($p = 0.02963$), which were the breeding with the lowest and highest number of diagnosed cases. Failures in the adoption of good hygienic sanitary management practices in breeding, positively influenced the increase in the number of sick birds. Most animals 27.86% (56/201) were under the unapparent carrier status of the disease and only 3.98% (8/201) of birds with positive diagnosis, presented some suggestive clinical signs of the disease

Key words: *Chlamydophila* sp., psittacine, chlamydiosis, semi-nested PCR.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade em animais da ordem Psitaciforme. Estas aves distribuem-se por toda a zona tropical do globo, podendo ser encontradas até mesmo em áreas frias, como a Patagônia. Na América do Sul, há cerca de 100 espécies de animais da família *Psittacidae*, e, dentre estes, 72 estão no Brasil, constituindo o grupo com maior número de espécies listada na "Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção" (MACHADO et al., 2008).

Estão incluídas na família dos psitacídeos, as Araras, Papagaios, Catatuas, Aratingas, Pionites, Eclectus, Forpus, Agapornis, Calopsitas, Roselas, dentre outras, possuem características anatômicas próprias, plumagem exuberante e cérebro bem desenvolvido (PERECIN et al., 2011). Algumas espécies são bem sociáveis, sendo consideradas animais excelentes para estimação e companhia. No território urbano, estes animais encontram-se amplamente distribuídos em cativeiros, no interior de parques, zoológicos, residências e lojas que comercializam animais.

A sanidade desses animais, pode ser comprometida por diversos agentes biológicos, como vírus, fungos e principalmente bactérias. Dentre as principais doenças que acometem os psitacídeos, a clamidiose, de natureza infecciosa e a de maior relevância, cujo agente etiológico é a bactéria *Chlamydophila psittaci*, um cocobacilo, Gram negativo, intracelular obrigatório, de caráter zoonótico, capaz de causar doença sistêmica clinicamente evidente em muitos mamíferos, répteis, anfíbios e aves (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

As aves infectadas, sintomáticas ou assintomáticas, costumam eliminar o agente através das fezes e secreções nasofaríngeas, sendo assim, animais suscetíveis e inclusive o homem, infectam-se ao entrar em contato com material oriundo destas duas fontes, principalmente por inalação e, ocasionalmente, por ingestão.

Segundo Carvalho (2004), os sintomas mais frequentes em psitacídeos incluem conjuntivite, diarreia, regurgitação, espirros, dispneia, anorexia, diminuição de peso e depressão. No homem, é responsável por causar infecção respiratória decorrente do contato direto ou indireto com aves infectadas, particularmente psitacídeos, pombos, perus ou patos.

O conhecimento do perfil higiênico, sanitário e do manejo empregado nos criadouros, é importante para definir fatores de risco que influenciem no grau de morbidade da doença entre o bando e a possibilidade de transmissão ao homem, bem como, para estabelecer medidas de prevenção, como a identificação, separação e tratamento de animais doentes, e a elaboração de protocolos sanitários mais eficientes.

A Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada como principal meio de diagnóstico da infecção pela *Chlamydia* sp. em humanos, aves e outras espécies de animais, apresentando alta especificidade e sensibilidade (RASO, 2009).

Técnicas de biologia molecular realizadas a partir de amostras de suabes cloacais e de orofaringe permitem o diagnóstico não só da clamidiose, como no presente estudo, mas também são meios amplamente utilizados na identificação do *status* sanitário de populações de aves, possibilitando a identificação de diversas enfermidades igualmente importantes nestes animais, como a micoplasmose, aspergilose, poliomaviose, salmonelose, colibacilose e pulorose, dentre outras.

O diagnóstico da clamidiose através de testes de ensaio imunoenzimático (ELISA) e de anticorpos fluorescentes também é possível, desde que obtenham como resultados, títulos de anticorpos elevados em quatro vezes, entre a fase aguda e a convalescença, obtidos com intervalo de duas a três semanas entre cada coleta (RASO, 2004; SMITH et al., 2011)

O isolamento da bactéria no sangue, secreções e cultura de tecidos (fígado, baço, rim, pulmão), apesar de ser considerado um excelente meio para a confirmação da doença e identificação do microrganismo, é de difícil execução, requerendo laboratórios especializados, inviabilizando o uso deste método de diagnóstico na rotina clínica (SMITH et al., 2011).

A caracterização da clamidiose como uma doença de relevância em saúde coletiva, por conta do seu alto potencial zoonótico, e a inexistência de dados relacionados a prevalência desta doença no Estado do Pará, denota a importância em realizar estudos clínicos e moleculares que comprovem a prevalência da infecção pela *Chlamydia* sp. em psitacídeos mantidos em cativeiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. OS PSITACÍDEOS

A ordem psitaciforme se subdivide em três famílias Psittacidae, Strigopidae e Cacatuidae, incluindo mais de 360 espécies e 80 gêneros de aves, que estão amplamente distribuídas em diversas regiões do mundo, com maior concentração na Oceania, América Central e América do Sul (HARKINEZHAD et al., 2009).

São aves morfologicamente caracterizadas por apresentar o bico encurvado, maxila bem móvel, com a mandíbula superior recurvada sobre a inferior, como resposta adaptativa a ingestão de alimentos à base de sementes e frutos. Apresentam uma língua grossa e sensível, com grande quantidade de papilas gustativas, além disso, possuem uma ampla variedade de cores e vocalização forte. Algumas espécies são capazes de imitar diversos tipos de sons, inclusive a fala humana, compreendendo o grupo das aves mais inteligentes do mundo, atraindo o interesse do comércio ilegal de fauna silvestre (LOPES, 2002; GARCIA; GARCIA, 2012).

Os psitacídeos apresentam hábito gregário, sendo encontradas frequentemente no ambiente em duplas ou trios, pois praticam a monogamia, e o filhote gerado costuma permanecer na companhia dos pais por longos períodos. Para dormir reúnem-se em bandos e a maioria das espécies não apresentam dimorfismo sexual (ICMBIO, 2011).

Além dos predadores naturais, o desmatamento de florestas influencia negativamente na reprodução e manutenção da biodiversidade destes animais, uma vez que os ninhos são normalmente formados em ocos de palmeira e outras árvores ou em cupinzeiros e costumam ser reutilizados nas diferentes estações reprodutivas (ICMBIO, 2011).

Os psitacídeos são as aves mais comumente mantidas em cativeiro em todo o mundo, e frequentemente utilizadas como animais de companhia e introduzidas no ambiente domiciliar, com destaque para os periquitos australianos, agapornis, calopsitas e papagaios. No entanto, a criação e o comércio ilegal destes animais, bem como sua exposição a condições insalubres, com falta de higiene, restrição de espaço, privação de água e alimento, pode trazer riscos à saúde destas aves e até mesmo à seres humanos que lidam diariamente com estes animais (PERECIN et al., 2011).

Embora a resolução N° 394 de 06 de novembro de 2007, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleça os critérios a serem considerados na determinação das espécies da fauna silvestre, cuja criação e comercialização poderá ser permitida como

animais de estimação, muitas espécies são frequentemente encontradas no ambiente doméstico sem qualquer comprovação da legalidade da atividade de criação.

2.2. ETIOLOGIA

A família Chlamydiaceae abrange as bactérias do gênero *Chlamydia* e *Chlamydophila*, as quais se subdividem em nove espécies: *Chlamydia trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*; *Chlamydophila psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. caviae* e *C. abortus* (EVERETT, 2000; HERRMANN et al., 2000).

As bactérias da família Chlamydiaceae são Gram negativas e esféricas (cocoides). Anteriormente, estas bactérias foram classificadas como vírus e riquetsia, somente em 1966, foi observado a presença de DNA e RNA, além da existência de uma parede celular semelhante à das bactérias Gram negativas e ribossomos de superfície suscetível a ação de antibióticos, uma característica das células procariontes (MOULDER, 1991).

As clamídias apresentam morfologia específica, com membrana externa rica em proteínas que auxiliam no processo de adaptação ao meio externo e interação com a célula hospedeira, conferindo certa rigidez e força à parede celular, pois não possuem o peptidoglicano entre as camadas interna e externa da parede bacteriana, embora existam genes responsáveis pela síntese deste polímero no genoma bacteriano (MARTINEZ, 1987).

Estas bactérias possuem ciclo único e obrigatoriamente intracelular, devido a sua deficiência na produção de compostos de alta energia, como o ATP. No meio intracelular estas bactérias são encontradas na forma de inclusões citoplasmáticas, apresentam um ciclo de desenvolvimento bifásico, onde multiplicam-se e assumem a forma infectante, sendo um importante agente etiológico de doenças em animais e humanos (ABDELRAHMAN; BELLAND, 2005).

A divisão do gênero *Chlamydia* em *Chlamydia* e *Chlamydophila* aconteceu no ano de 1999, e por estar baseada em critérios genéticos, permitiu uma identificação mais específica e a diferenciação de outros microrganismos semelhantes. O gênero *Chlamydophila* se diferenciou por não possuir quantidades detectáveis de glicogênio, e apresentar morfologia variada, contendo um único ribossomo operante e possuindo um genoma ligeiramente maior que o do gênero *Chlamydia* (STEWARTSON; GRAYSON, 2010).

Dentre as espécies do gênero *Chlamydophila*, a *C. psittaci*, é o principal agente etiológico envolvido nos casos conhecidos de clamidiose ou clamidiofilose em aves silvestres, domésticas e exóticas, tendo como hospedeiros preferenciais os animais da família

psitaciforme, podendo infectar também mamíferos domésticos e seres humanos, sendo considerada a principal zoonose transmitida por aves silvestres (RASO, 2009).

Estruturalmente, a *C. psittaci* possui tamanho médio de 200 x 1.500 nm, apresentando em sua membrana externa a ausência de peptidoglicano e a presença de dois importantes antígenos de superfície, uma proteína imunodominante conhecida como: Principal Proteína Externa de Membrana (*Major Outer Membrane Protein*) - MOMP e o lipopolissacarídeo clamidial (LPS), ambos são utilizados para diagnósticos específicos (VANROMPAY et al., 1995; VANROMPAY, 2008).

Os genótipos ou sorotipos aviários de *C. psittaci* reconhecidos são o A, B, C, D, E, F e o E/B, dentre estes, o A é endêmico em psitacídeos e um dos mais virulentos para aves e humanos (GEENS et al., 2005; HARKINEZHAD et al., 2009).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

As aves infectadas, sintomáticas ou assintomáticas, costumam eliminar o agente através das fezes e secreções nasofaríngeas, sendo assim, animais suscetíveis infectam-se ao entrar em contato com material oriundo destas duas fontes, principalmente por inalação e, ocasionalmente, por ingestão (HARKINEZHAD et al., 2009; AUNDRIA WEST, 2011).

A eliminação do agente pela via fecal costuma ser intermitente em aves assintomáticas, ocorrendo principalmente quando estes animais são submetidos a estresse como, privação de alimento ou água, altas taxas de lotação, reprodução, transporte prolongado e alterações climáticas (RASO et al., 2004; HARKINEZHAD et al., 2009; AUNDRIA WEST, 2011). Aves jovens são mais suscetíveis ao desenvolvimento da forma clínica da doença, e eliminam o agente em maior frequência e quantidade (RASO, 2009; LIMA et al., 2011).

Aves domésticas e selvagens, ao compartilharem o mesmo ambiente, seja aquático ou de solo úmido, podem infectar-se por meio do contato com água contaminada e, esta última, por serem altamente móveis, funcionam como excelentes vetores para a disseminação da infecção pela *Chamydophila* sp. (HARKINEZHAD et al., 2009; SACHSE et al., 2009). Aves granívoras podem infectar-se através da inalação de poeira em fezes ou ambientes contaminados, e aves necrófagas por ingestão de carcaças contaminadas (HARKINEZHAD et al., 2009).

A transmissão vertical promove a persistência da infecção entre as aves, levando à morte de embriões ou o nascimento de aves infectadas. No ninho a transmissão é facilitada nas espécies cujas mães alimentam filhotes por regurgitação. Além disso, a presença de

infestação por ectoparasitos hematófagos como piolhos, moscas ou ácaros e a contaminação local por exsudato e fezes consistem em uma importante forma de infecção pela *Clamydophila* sp. nesta fase do desenvolvimento das aves. A infecção por bicadas ou feridas é raramente descrita (HARKINEZHAD et al., 2009).

2.4. PATOGENIA

A via de infecção pela *Clamydophila* sp. irá determinar o local de replicação do agente etiológico, quando por inalação, costumam infectar células epiteliais de pulmões e sacos aéreos, alcançando as membranas serosas adjacentes resultando em aerosaculite e pericardite. Ao ser ingerido, a *Clamydophila* sp. se replica nas células do trato intestinal, o período de incubação e a e severidade dos sinais clínicos irão depender da virulência da cepa infectante, do hospedeiro e das condições ambientais (MOULDER, 1991; GERLACH, 1994).

O estágio inicial do ciclo de desenvolvimento da *Clamydophila* sp. é denominado de Corpúsculo Elementar (CE), consistindo na forma infectante, densa, metabolicamente inativa, resistente ao ambiente e tamanho médio de 200-300 nm. O CE infecta as células eucariontes através do processo de endocitose, preferencialmente parasitando o epitélio de mucosa e macrófagos mononucleares, formando inclusões intracitoplasmáticas, e após passar por uma fase intermediária denominada de Corpúsculo Intermediário (CI), assumindo um tamanho médio de 300-1000 nm, que por sua vez dará origem ao Corpúsculo Reticulado (CR), forma não infectante, menos eletrodensa e mais sensível às condições ambientais, de tamanho variando entre 500-1000 nm, capaz de multiplicar-se por divisão binária, dando origem a novos CE, ocasionando a ruptura celular e infecção de novas células (Figura 1) (EVERETT et al, 1999; HOGAN et al., 2004; RASO, 2006).

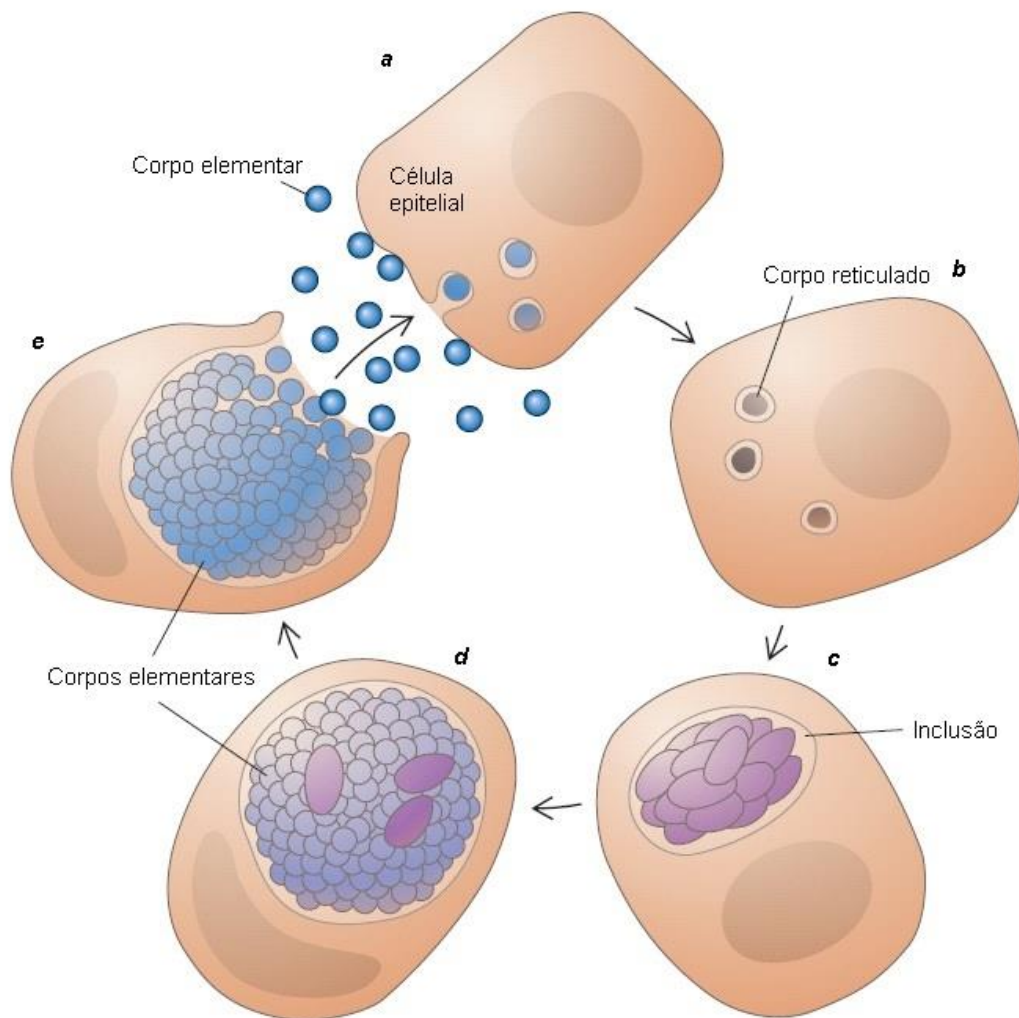


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de desenvolvimento da *Chlamydophila sp.* na célula do hospedeiro.
 Fonte: STAMM, 2006.

A virulência da cepa, a carga infectante e o estado imune do hospedeiro irão determinar o tempo de excreção dos CE pelas células hospedeiras, consistindo em uma importante fonte de infecção para seres humanos e animais suscetíveis (HARKINEZHAD et al., 2009).

A liberação de linfocinas e opsoninas pelo sistema imunológico (linfócitos T e macrófagos), impedem a fixação e replicação do CE na célula hospedeira e inibem a liberação de toxinas causadoras de lesões em sistema respiratório, coração, rins e fígado. Portanto, uma falha no sistema imunológico, pode determinar o aparecimento de infecção aguda. Na infecção persistente, a bactéria permanece fagocitada e liberando antígenos via exocitose, estimulando o sistema imune do hospedeiro, sujeitando o indivíduo à infecção e até mesmo a reinfeção (WYRICK; RICHMOND, 1989).

2.5. SINAIS CLÍNICOS

2.5.1. Em aves

A clamidiose aviária não possui sinais clínicos específicos, o que dificulta o diagnóstico clínico, porém, os animais infectados podem permanecer como portadores assintomáticos por longos períodos, representando uma fonte importante de infecção para humanos e outras aves. O desenvolvimento da forma clínica da doença irá depender de fatores como a espécie acometida, virulência do sorotipo, idade e o estado imunológico do hospedeiro (CUBAS; GODOY, 2004; HARKINEZHAD et al., 2009; PROENÇA et al., 2011).

Uma alta taxa de mortalidade (96,5%) foi registrada por Raso et al. (2004), ocorrendo em 95 filhotes de *Amazona aestiva* (papagaio verdadeiro), oriundos de tráfico na cidade de São Paulo. Na doença os animais apresentaram letargia, penas eriçadas, anorexia, diarreia, poliúria, desidratação e perda de peso como sinais clínicos mais frequentemente observados. De acordo com Cubas e Godoy (2004), o gênero *Amazona* (papagaios) e *Ara* (araras), assim como as aves jovens, são considerados mais suscetíveis a este tipo de infecção.

Cavalcante (2008), classifica a clamidiose aviária de acordo com a manifestação dos sinais clínicos, descrevendo infecções superaguda, aguda, crônica e inaparente. As formas superaguda e aguda são causadas por cepas altamente virulentas e se caracterizam pela presença marcante de sinais clínicos sugestivos da doença, no entanto, a primeira forma se diferencia por acometer animais jovens e apresentar altas taxas de mortalidade. Na infecção crônica, são observados somente sinais clínicos discretos como conjuntivites e alterações respiratórias, já a forma inaparente acomete principalmente aves adultas e não há sinais clínicos aparentes.

Sinais neurológicos, como tremores, opistótono e paralisia, também podem estar presentes na infecção por *Chlamydophila* sp., sendo comum a presença destes sinais clínicos considerados mais graves em animais jovens ou em aves cronicamente infectadas após serem submetidas a estresse (HARKINEZHAD et al., 2009; PROENÇA et al., 2011).

Para Smith et al. (2011), os sintomas relacionados ao trato respiratório são frequentemente observados quando a infecção pelo agente ocorre por inalação ou em casos mais avançado da doença, mesmo que a infecção primária tenha sido pela via digestória, destacando como principais sinais a congestão pulmonar, aerossaculite e a broncopneumonia.

A presença de febre pode ser observada em alguns animais, geralmente como sinal clínico de infecção sistêmica, acompanhada de depressão, letargia e alterações de plumagem (PROENÇA et al., 2011). Segundo os autores, em casos mais graves, onde há comprometimento renal, lesões degenerativas nos rins podem ocasionar a redução na produção de eritropoetina, resultando em anemia hipoplásica.

2.5.2. Em humanos

Por ser considerada o principal agente etiológico da clamidiose em aves e endêmica em psitacídeos, a *C. psittaci* também é descrita nos casos confirmados da doença em seres humanos, sendo considerada uma zoonose de impacto em saúde coletiva devido ao aumento da exploração da fauna silvestre oriundas do comércio ilegal e do uso destes como animais de companhia (RASO, 2015).

A infecção por *C. psittaci* em humanos, causa doença conhecida como psitacose, derivada da palavra *Psittacus*, que significa papagaio em grego (VANROMPAY et al., 1995). Portanto, a psitacose é considerada uma zoonose de risco considerável para pessoas que mantêm contato direto com aves, como trabalhadores em abatedouros de aves e lojas de animais, proprietários de pássaros, médicos veterinários, biólogos e funcionários de zoológicos e de criatórios comerciais (SAITO et al., 2005; FENGA et al., 2007; VANROPAY et al., 2007; RASO et al., 2010).

O primeiro relato de psitacose em humanos foi descrito por Ritter (1880) e em seguida por Morange (1895) após um surto em Paris, onde a doença foi então associada ao papagaio e passou a ser denominada de psitacose. Uma pandemia mundial com mais de 800 casos e 20% de óbitos foi registrada entre os anos de 1929 e 1930, as ocorrências foram relacionadas ao contato com psitacídeos infectados oriundos da América do Sul e levados para a Europa e América do Norte. Em todos os casos relatados, a doença apresentava a pneumonia como principal sinal clínico.

O homem se infecta por meio da inalação de aerossóis contaminados pela *C. psittaci* presentes no ambiente, nas penas, secreções, excreções ou nos tecidos de aves infectadas. A transmissão entre seres humanos é raramente descrita e, mais frequentemente, observada como infecção nosocomial (VANROPAY et al., 1995; VANROPAY et al., 2007). Não há registros de infecção relacionada a ingestão de carnes de aves infectadas, pois as clamídeas são facilmente destruídas pelo calor (WILLS, 1986).

Na espécie humana a doença apresenta baixos índices de mortalidade desde o advento dos antibióticos, apresentando período de incubação médio de 5 a 14 dias, os sinais clínicos assim como nas aves, são inespecíficos e os mais frequentemente observados, incluem mialgia, febre de início abrupto, dispneia, tosse não produtiva, calafrios e dor de cabeça (STEWARDSON; GRAYSON, 2010; SMITH et al., 2011).

Acredita-se que a escassez de dados na literatura acerca da psitacose em humanos, esteja relacionada a dificuldade em realizar o diagnóstico clínico da doença, sendo somente notificados pacientes com sintomatologia grave, onde há a pneumonia severa associada ou não a complicações neurológicas, cardíacas e ao histórico de contato direto ou indireto com aves infectadas (STEWARDSON; GRAYSON, 2010).

2.6. ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

Na infecção por *C. psittaci* os achados de necropsia assim como a sintomatologia, são inespecíficos e a gravidade das lesões varia de acordo com a evolução da doença, normalmente as alterações estão limitadas ao fígado, baço, pulmão, sacos aéreos e coração (FRIEND; FRANSON, 1999; ANDERSEN; VANROMPAY, 2003; LONGBOTTOM; COULTER, 2003).

Hepato e esplenomegalia são comuns, e o fígado pode se apresentar friável e de coloração amarela ou esverdeada, com presença de pequenos focos necróticos na capsula ou superfície de corte, além da proliferação de ductos biliares, infiltração de heterofilos, linfócitos e células plasmáticas. As lesões esplênicas são variáveis, podendo ocorrer a perda da arquitetura normal do órgão, além da presença de focos necróticos e petéquias na sua superfície e a infiltração de macrófagos junto a células plasmáticas. Fibrina e heterofilos também podem ser observados (RASO et al., 2006).

A hepatite/hepatomegalia observada na infecção por *C. psittaci* está relacionada à liberação de hepatotoxinas presentes na superfície bacteriana, que lesam os hepatócitos e resultam no extravasamento de aspartato aminotransferase (AST) na corrente sanguínea, aumentando também os níveis de albumina sérica. As lesões ao nível hepático são mais comuns em infecções severas ou quando decorrentes da ingestão do agente infeccioso (PROENÇA et al., 2011).

Em psitacídeos a aerossaculite é um achado frequente nos animais acometidos, com as membranas dos sacos aéreos podendo estar espessadas e opacas e, em alguns casos,

recobertas por exsudato fibrinopurulento. Nos pulmões, são descritos congestão e pneumonia fibrinosa (RASO et al., 2006; ECCO et al., 2009).

Vilela (2012) ao realizar necropsia em 15 psitacídeos recuperados do comércio ilegal em Minas Gerais, confirmou a existência de *Chlamydophila* sp. no citoplasma de macrófagos no fígado, baço e em alguns outros órgãos de quatro papagaios através da técnica de imunohistoquímica (IHQ), utilizando anticorpos monoclonais. Hepatomegalia, esplenomegalia e aerossaculite fibrinopurulenta foram as alterações mais visíveis na maioria dos animais.

Ao nível cardíaco a principal alteração descrita é a pericardite. Nos rins a nefrose ocorre consequência da liberação de nefrotoxinas pelo agente etiológico. Em machos a infecção pode causar orquite e epididimite podendo levar a infertilidade, porém, a ooforite é raramente descrita em fêmeas (RASO et al., 2006).

2.7. DIAGNÓSTICO

2.7.1. Isolamento

O isolamento de *C. psittaci* requer a inoculação em ovos embrionados ou culturas de células e é considerado o padrão ouro para a identificação do agente infeccioso, embora a aplicação desta técnica envolva algumas limitações, pois demanda um longo tempo de execução, necessita de amostras de alta qualidade, além do risco aos manipuladores em laboratório, fazendo com que outros meios de diagnóstico laboratorial sejam preferencialmente utilizados na confirmação desta doença, como o teste ELISA para detecção de antígeno, PCR e DNA *microarray* para a detecção molecular da *C. psittaci* (BUTLER; WHITNEY, 1998; SMITH et al., 2011).

A coleta, o transporte e o armazenamento do material deve ser criterioso e feita de forma asséptica, podendo ser utilizados fragmentos de rim, pericárdio, baço ou fígado, exudatos e suabes de cloaca e orofaringe. As amostras devem ser mantidas em meio de transporte tampão SPG (contendo sacarose, ácido L-glutâmico, KH₂PO₄, K₂HPO₄, soro fetal, vancomicina, canamicina, estreptomomicina, anfotericina B e gentamicina), onde permanecerão viáveis por até 30 dias sem refrigeração e 34 dias a 4°C (CFSPH, 2009; SMITH et al., 2011). Andersen e Franson (2007) recomendam a adição de antibióticos que não possuam efeito contra *C. psittaci* junto as amostras como forma de reduzir a possibilidade de contaminação.

Para a cultura em ovo embrionado é necessário a inoculação de 0,5mL de inóculo no saco vitelino de embrião e aguardar a replicação do agente que terá como efeito a congestão vascular nas membranas do saco vitelino e a morte do embrião em um período não superior a 10 dias. As inclusões podem ser demonstradas por imunofluorescência direta, indireta e técnicas de coloração histoquímica ou IHQ (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003; OIE, 2004).

2.7.2. Sorologia

O diagnóstico sorológico utilizando testes de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto e reação de fixação do complemento (RFC), sendo consideradas técnicas rápidas, principalmente quando comparadas ao isolamento e cultura de células em ovo embrionado, e capazes de identificar CE viáveis e não viáveis, e antígenos solúveis de lipopolissacarídeos específicos do gênero *Chlamydophila* presentes em secreções (VANROMPAY et al., 1994; OIE, 2004).

O teste de IFI possui suas limitações no diagnóstico laboratorial na clamidiose, por se tratar de um teste cujo resultado é qualitativo e os reagentes necessários não estão disponíveis no mercado, fazendo com que a realização da técnica dependa em grande parte da experiência do técnico que a executa e da colaboração com outros grupos de pesquisa que disponham de laboratórios especializados (EVERETT, 2000).

Existem no mercado, kits comerciais para a realização do teste ELISA, desenvolvidos a partir da seleção cuidadosa de anticorpos monoclonais, porém necessitam que exista um aumento de quatro vezes no título de amostras pareadas, além da possibilidade de que mesmo após serem tratados, os animais continuam apresentando alta titulação de anticorpos IgG, denotando a necessidade de considerar sempre a presença de sinais clínicos, resultados de exames complementares e dados epidemiológicos associados a doença (OIE, 2004; VERMINNEN et al., 2008; SASCHE et al., 2009).

O emprego do teste ELISA é recomendado na rotina da investigação de aves acometidas como meio para triagem do criadouro, não sendo aceito como meio de diagnóstico definitivo, por conta da possibilidade de reação cruzada com antígenos de outros agentes infecciosos Gram negativos (falso positivo) e da possibilidade de falhar na identificação de anticorpos em infecção recente (falso negativo) (RASO et al., 2002; RASO et al., 2006).

O diagnóstico por meio da FC está fundamentado na presença de anticorpos anti *C. psittaci* presentes em amostras seriadas de diluição de soro testes em placas contendo antígeno e hemácias, e é considerado positivo quando se observa a lise de hemácias em concentrações de soro acima de 1:16 (RASO et al., 2004).

Recomenda-se sempre a confirmação dos resultados obtidos no diagnóstico sorológico por meio de testes moleculares ou pelo isolamento do agente infeccioso, seja em casos de amostras positivas em animais assintomáticos ou quando aves sintomáticas demonstram resultados negativos (CFSPH, 2009; SMITH et al., 2011).

O diagnóstico IHQ se baseia na presença de antígenos, fundamentado na teoria da ligação entre antígenos e anticorpos nos tecidos biológicos de aves e por isso consiste em um teste sorológico direto (FERRO, 2013). Em um estudo realizado por Casagrande et al. (2014), foi feita uma análise retrospectiva em 111 psitacídeos provenientes de apreensão ou cativeiro, evidenciou-se imunomarcagem anti-*Chlamydophila* em fígado (11/12), baço (7/9), pulmões (3/9), rins (2/8), intestinos (2/3), sacos aéreos (1/4) e bursa de *Fabricius* (1/2) dos animais estudados, mostrando a relevância da IHQ como forma de diagnóstico definitivo *post mortem* de clamidiose em psitacídeos no Brasil.

2.7.3. Reação em Cadeia Mediada pela polimerase (PCR)

O diagnóstico molecular através da Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR), é o único método comercial disponível para diagnóstico de *C. psittaci* no Brasil, sendo considerada uma técnica de rápida execução e capaz de detectar pequenas quantidades do agente presente em amostras biológicas, permitindo simultaneamente a identificação, quantificação e genotipagem dos sete genótipos de *C. psittaci* (A a F e E/B) de acordo com o protocolo empregado (OLSEN et al., 1998; RASO, 2009; VASCONCELOS, 2012).

A PCR permite a replicação *in vitro* do DNA, a partir da utilização de *primers* específicos para gênero ou espécie da bactéria, amplificando exponencialmente uma porção alvo da molécula de DNA, formando milhões de *amplicons* (EVERETT et al., 1999). As técnicas de PCR utilizadas no diagnóstico de *Chlamydophila* sp. em aves são: a PCR convencional (OLSEN et al., 1998), *semi-nested* PCR (RASO et al., 2006), multiplex PCR (EVERETT et al., 1999), PCR-RFLP, PCR em tempo real (GEENS et al., 2005) e DNA *microarray* (SACHSE et al., 2009).

A reação de PCR convencional acontece em duas fases onde os *amplicons* formados na primeira reação são utilizados como molde para uma segunda reação e todos os

protocolos são espécie-específicos ou específicos para a família Chlamydiaceae apresentando como alvo o gene *ompA*, *ompB* ou os genes ribossomais 16S e 23S RNA da bactéria (GEENS et al., 2005; VAN LOOCK et al., 2005; PANTCHEV et al., 2009).

A técnica da *semi-nested* PCR é amplamente utilizada no diagnóstico da *Chlamydomphila* sp. por diminuir as chances de se obterem resultados falso negativos, pois enquanto o produto da primeira etapa poderá ser demasiado pequeno para detecção, produto suficiente é sintetizado para a amplificação e detecção em uma segunda etapa da reação ou “*nested*”, aumentando a especificidade e a eficiência do teste (MESSMER et al., 1997).

A técnica de realização de diagnóstico molecular utilizando o protocolo de PCR em tempo real é mais rápida e apresenta um menor risco de contaminação em relação às demais, uma vez que não necessita de uma reação suplementar de amplificação sendo realizada por meio de um sistema fechado (GEENS et al., 2005; PANTCHEV et al., 2009).

O protocolo que utiliza a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) promove a clivagem do DNA, originando sequências homologas marcadas com radioatividade que promovem uma reação de luminescência (GEENS et al., 2005).

A PCR-RFLP, DNA *microarray* e PCR em tempo real são as únicas técnicas capazes de identificar os genótipos de *Chlamydomphila* presentes em amostras biológicas, embora a PCR-RFLP não seja capaz de identificar o genótipo E/B da bactéria. Os testes de biologia molecular que empregam a *semi-nested* PCR e Multiplex PCR necessita sequenciar o material amplificado para a identificação dos genótipos envolvidos nos casos examinados (GEENS et al., 2005; MAGNINO et al., 2009).

A técnica de DNA *microarray* possui sensibilidade equivalente a PCR em tempo real e permite que a amostra de DNA seja examinada simultaneamente por várias sondas de hibridização espécie específicas, possibilitando a identificação direta e genotipagem das espécies da família *Chlamydiaceae*. Porém esta técnica, ainda é considerada emergente, por ser um teste mais sofisticado, com maior teor de informação e de custo elevado, embora consista em uma ferramenta de diagnóstico promissor para rastreamento epidemiológico, explorando a divulgação de genótipos e identificando representantes atípicas de *C. psittaci* envolvidas nos casos estudados (SACHSE et al., 2009).

Para a realização do exame são admitidas amostras de suabe cloacal, orofaríngea, conjuntiva ou tecidos. A coleta também deve ser cuidadosa, com o objetivo de diminuir o risco de contaminação ambiental e de outras aves. O método de conservação deve estar de acordo com o protocolo empregado, pois o manejo utilizado pode influenciar na sensibilidade e especificidade do teste (SACHSE et al., 2009).

A biologia molecular também é empregada no diagnóstico de infecção por *C. psittaci* em humanos, através da utilização da semi-nested PCR e PCR em tempo real e anticorpos recombinantes ELISA (SAIKKU et al., 1998; VERMINNEN et al., 2008; SACHSE et al., 2009).

2.8. TRATAMENTO

Não é recomendado o uso profilático de antibiótico em animais, uma vez que esta prática poderá resultar na seleção de cepas mais resistentes, comprometendo a resposta de aves doentes ao tratamento por estes fármacos (ANDERSEN; FRANSON, 2007; RASO, 2007).

A terapêutica deve ser restrita a aves sintomáticas, podendo ser utilizados antibióticos da classe das tetraciclina, onde a doxiciclina tem demonstrado melhores resultados devido a sua rápida absorção e eliminação lenta. O tratamento deve durar 45 dias e a dose recomendada é de 25 a 50 mg/kg por via oral a cada 24 horas ou 75 a 100 mg/kg a cada 5 a 7 dias, administrado pela via intramuscular (RASO, 2007).

O uso de rações à base de grãos impregnados com antimicrobianos também pode ser eficaz no tratamento de aves infectadas (SMITH et al., 2011). No entanto, Raso (2006), afirma que há certa dificuldade em encontrar este tipo de alimento em alguns países latino americanos.

O tratamento de calopsitas experimentalmente infectados através da utilização doxiciclina associado a azitromicina demonstrou resultados satisfatórios diminuindo o tempo de tratamento e 45 para 21 dias (GUZMAN et al., 2010). As penicilinas e o cloranfenicol também possuem efeito satisfatório no tratamento da clamidiose (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003; VANROMPAY et al., 2007).

Raso (2007) recomenda que o tratamento medicamentoso esteja sempre associado ao tratamento de suporte, com suplementação alimentar, fluidoterapia, isolamento e alimentação através de sonda, quando necessário.

2.9. CONTROLE E PROFILAXIA

O controle do comércio ilegal de aves silvestres pelo IBAMA deve ser efetivo no intuito de coibir o tráfico de animais selvagens e de proporcionar meios para que estes animais retirados da natureza tenham condições de se restabelecer, pois quando

comercializados ilegalmente, são sujeitos a condições inadequadas de transporte, alimentação e higiene e, quando resgatados, são geralmente mantidos em recintos com altas taxas de lotação, provocando queda de imunidade e a propagação de doenças entre as aves (RASO et al., 2004; BARBOSA et al., 2011; RASO, 2015).

A adoção da quarentena como medida restritiva à introdução de novos animais no criadouro, com a utilização de recintos individuais, juntamente com a observação e realização de exames clínicos e laboratoriais, deve estar incluída dentro do protocolo de medidas higiênicas sanitárias dos criadouros, como medidas profiláticas à introdução e disseminação de doenças (SMITH et al., 2011).

O isolamento e tratamento de aves suspeitas ou com diagnóstico confirmado de infecção por *Chlamydophila* sp. é a principal medida a ser adotada com a finalidade de impedir o aumento do número de casos no criadouro, sendo que os protocolos terapêuticos adotados devem ser eficientes no sentido de curar os animais doentes, não permitindo que mesmo após a forma clínica eles permaneçam como portadores assintomáticos da doença, funcionando como fontes de infecção para humanos e outras aves (RASO, 2007; SMITH et al., 2011).

A adoção de boas práticas de manejo, como a limpeza cuidadosa dos recintos, bebedouros e comedouros, o uso de equipamentos de proteção individual por parte dos manipuladores, constituem medidas importantes no controle da contaminação por esta bactéria, que embora possa permanecer viável no ambiente por até 30 dias, devido a sua estrutura de membrana com alto teor de lipídeos, pode ser inativada através de limpeza e desinfecção com a maioria dos detergentes e desinfetantes, como o etanol a 70% e compostos de amônia quaternária, ao calor e à luz solar (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003).

2.10. CLAMIDIOSE AVIÁRIA E IMPLICAÇÕES ZOONÓTICAS

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) estima-se que cerca de 90% do comércio de animais selvagens é ilegal, e no caso das aves, este dado se torna preocupante, uma vez que estes animais ao sobreviverem, geralmente são levados ao ambiente doméstico e ao contato com outros animais suscetíveis podendo resultar em efeitos sanitários relevantes (RENCTAS, 2011).

A criação de passeriformes em cativeiro está conceituada no artigo 2º, inciso II da Instrução Normativa n. 003/99. Portanto, deve ser, autorizada, regulamentada e fiscalizada pelo IBAMA, pois a manutenção de animais silvestres em cativeiro possui como aspectos

positivos, o equilíbrio ecológico, a possibilidade de realização de experiências científicas, o auxílio na educação ambiental, na preservação das espécies e na economia ambiental (WIEDMANN, 2009; GARCIA; GARCIA, 2012). No entanto, é necessário um maior entendimento em relação aos procedimentos de criação, adotando formas de manejo adequadas que funcionem como uma barreira sanitária à disseminação de zoonoses e outras enfermidades.

Aves infectadas pela *Chlamydophyla* sp., quando não tratadas, podem tornar-se portadoras assintomáticas da doença, logo, a captura de aves silvestres e a manutenção destes animais no ambiente doméstico sem os devidos cuidados, consistem em um fator de risco importante na disseminação desta doença, uma vez que a eliminação do agente é estimulada por condições de estresse, como manipulação, transporte e manejo inadequado (RASO, 2007).

A espécie *C. psittaci* é considerada endêmica em psitacídeos, principalmente quando as aves são mantidas em cativeiro, e dentre as 465 espécies de aves onde a bactéria foi isolada, os psitacídeos e columbiformes, portanto, estes animais merecem destaque como potenciais disseminadores desta zoonose, uma vez que a doença pode apresentar-se de forma inaparente nas aves e a excreção do agente pode acontecer de forma intermitente em fezes e exsudato respiratório (KALETA; TADAY, 2003).

Raso et al. (2010) ao investigarem a soroprevalência de anticorpos anti-*C. psittaci* em biólogos, cientistas, tratadores, médicos veterinários e estudantes de veterinária que trabalhavam em zoológicos, através das técnicas de reação de fixação do complemento (RFC) e microimunofluorescência (MIF), identificaram 23,9% e 4,7% de amostras de soro positivas dentre os indivíduos estudados, confirmando a necessidade de se investigar esta doença em humanos, pois a maioria dos casos ainda são confundidas com gripes sazonais ou estão em condição de portador assintomático.

Vásquez et al. (2010) ao utilizarem a técnica de PCR como meio para o diagnóstico, observaram alta prevalência de infecção por *C. psittaci* em pombos assintomáticos de vida livre que frequentavam parques e jardins públicos em Madri (Espanha), destacando o risco de contaminação por este microrganismo até mesmo para pessoas que não possuem contato direto com aves consideradas como grupos de risco.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de clamidiose em diferentes espécies de psitacídeos da fauna brasileira, mantidos em criadouros conservacionistas no Estado do Pará.

3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar molecularmente através da técnica da *semi-nested* PCR, a infecção pela *Chlamydia* sp. em psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado do Pará;
- Investigar a presença de sinais clínicos sugestivos de clamidiose nas aves de estudo e correlacionar a sintomatologia apresentada com os achados positivos na PCR;
- Identificar fatores de risco relacionados ao manejo higiênico sanitário empregado nos criadouros que possam predispor à ocorrência da doença.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS E LOCAIS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE ESTUDO

Para a realização do estudo foram utilizados 201 aves, todas provenientes de quatro criadouros mantenedores de fauna silvestre, autorizados pelo Sistema Nacional de Gestão da Fauna Silvestre - SisFauna e localizados nas Mesorregiões Metropolitana de Belém (C1 e C2), Nordeste Paraense (C3) e Baixo Amazonas (C4) (Figura 2). Todos os animais envolvidos no estudo eram adultos, sem distinção entre machos e fêmeas, pertencentes a 08 gêneros e 16 espécies da Ordem dos Psitaciformes (Quadro 1).

A presente pesquisa foi licenciada pelo SISBIO-IBAMA (Anexo 1) e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal Rural da Amazônia (CEUA-UFRA) (Anexo 2).

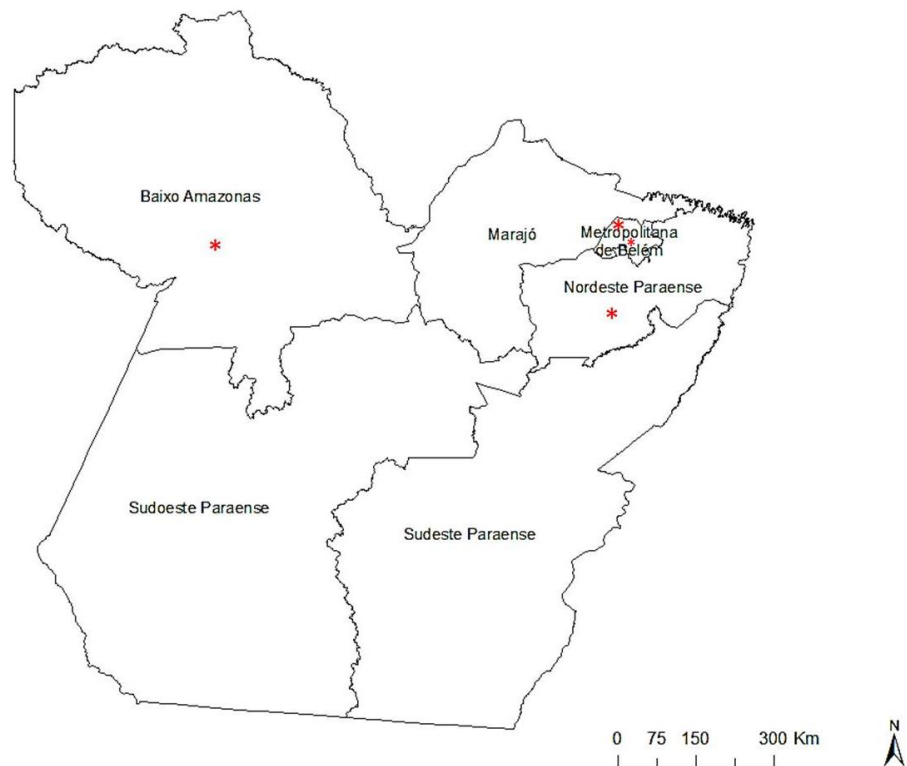


Figura 2. Mapa da distribuição das Mesorregiões do Estado do Pará: Criatórios mantenedores de fauna silvestre selecionados para estudo (*).

Fonte: SILVA; SILVA, 2008.

Quadro 01. Relação de todas as espécies envolvidas no estudo e suas respectivas amostragens por criadouro de origem

Nome Comum	Nome Científico	C1	C2	C3	C4	Total
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	01	02	16	00	19
Papagaio-papa-cacau	<i>Amazona festiva</i>	00	02	00	01	03
Papagaio-moleiro	<i>Amazona farinosa</i>	00	03	08	08	19
Papagaio-campeiro	<i>Amazona ochrocephala</i>	00	00	00	08	08
Papagaio-do-mangue	<i>Amazona amazônica</i>	21	09	09	37	76
Arara-azul-grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	00	02	00	03	05
Ararinha azul	<i>Cyanopsitta spixii</i>	00	00	06	00	06
Ararinha-verde	<i>Ara ambigua</i>	00	05	00	01	06
Arara- Canindé	<i>Ara ararauna</i>	01	02	00	01	04
Arara-vermelha-grande	<i>Ara chloropterus</i>	03	04	00	08	15
Arara-vermelha-pequena	<i>Ara macao</i>	03	01	00	06	10
Maracanã-verdadeiro	<i>Ara maracanã</i>	03	02	00	03	08
Ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	00	04	11	02	17
Macaranã-do-butiti	<i>Orthopsittaca manilatus</i>	00	00	00	01	01
Anacã	<i>Deropterus accipitrinus</i>	00	02	00	00	02
Marianinha-de-cabeça-preta	<i>Pionites melanocephala</i>	00	02	00	00	02
Total		32	40	50	79	201

4.2. EXAME CLÍNICO INDIVIDUAL DOS ANIMAIS E AVALIAÇÃO DO CRIADOURO

Como método complementar ao diagnóstico laboratorial, foi realizado o exame clínico individual de todas as aves que participaram do estudo, cujos dados foram registrados em uma ficha (Apêndice 1), contendo dados referentes a presença de sinais clínicos possivelmente relacionados a doença, como apatia, anorexia, alterações de plumagem, presença de conjuntivite, alterações respiratórias, digestivas, urinárias ou neurológicas.

As práticas de manejo e as condições higiênico sanitárias a que esses animais são submetidos, também foram registradas em um formulário de avaliação de cada criadouro

(Apêndice 2), com a finalidade de identificar possíveis interferências que favoreçam à manifestação ou disseminação da doença.

Os resultados da avaliação higiênico sanitária foram esquematizados a partir dos dados registrados nas fichas de avaliação de cada criadouro, onde foram selecionados seis aspectos considerados os mais relevantes no controle da disseminação de doenças, aos quais foram atribuídos os conceitos A, B e C, onde o A fora atribuído aos que apresentavam condições ambientais satisfatórias, proporcionando um ambiente salubre, seguro e adequado à manutenção dos animais em cativeiro, o conceito B, faz referencia aos que possuem condições de manejo regular, ou seja, que atendem em alguns aspectos, porém não são suficientes para minimizar o risco de transmissão de agentes infecciosos, o C refere-se aos criadouros onde não se observava os critérios contidos na ficha de avaliação higiênico sanitária ou se encontravam em péssimas condições de higiene, impossibilitando o uso coletivo.

4.3. CONTENÇÃO FÍSICA E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Para a coleta de amostras biológicas as aves foram capturadas com auxílio de puçás e contidas fisicamente através de luvas de raspa de couro, não necessitando da utilização de métodos de contenção química. Os animais foram imobilizados cuidadosamente mantendo uma mão fixa apoiada na região cervical e a outra segurando corpo e pernas (Figura 3).



Figura 3. Método de imobilização manual utilizado para a contenção física das aves.

Para o suabe orofaringiano procedeu a abertura do bico, onde nas aves menores, foi utilizando a haste circular de duas pinças hemostáticas, onde uma haste se manteve fixa na porção superior do bico e a outra na inferior, tracionando-as contra lateralmente (Figura 4). Nas aves maiores, foi utilizado um abridor de bico feito em aço inoxidável, específico para a espécie (Figura 5). Para a coleta de suabe cloacal, além da contenção manual, a cauda do animal deve ser levemente deslocada para baixo (Figura 6).



Figura 4. Emprego de pinças hemostáticas como auxílio na abertura do bico das aves menores para a coleta de suabe de orofaringe.



Figura 5. Abertura de bico utilizando um abre boca específico para aves.



Figura 6. Coleta de suabe cloacal a partir da contenção manual e deslocamento da cauda.

Os suabes foram introduzidos e friccionados levemente na região da cloaca e orofaringe. A coleta foi executada somente uma vez em cada animal, e logo em seguida as aves receberam marcação com tinta atóxica no bico para sua identificação e posteriormente foram reinsersidas no recinto junto aos demais animais e submetidos à rotina normal.

4.4. MÉTODO DE CONSERVAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS

Após a coleta do material, os suabes foram transferidos para eppendorfs estéreis, devidamente identificados, colocados em rack e acondicionado em caixa de polímero expandido com gelox, onde permaneceu por um período não superior a 12 horas, e em seguida acondicionados em freezer a -20°C , no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia - LABOPAT/UFRA, onde permaneceram por no máximo 30 dias, até que fossem encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Inovações Tecnológicas do Instituto Evandro Chagas - CIT/IEC e conservadas em freezer a -80°C , até o momento de realização da análise molecular, através da técnica da *semi-nested* PCR.

4.5. EXTRAÇÃO DO DNA

Para a extração do DNA das amostras biológicas foi utilizado o Chelex[®]100 sodium form (Sigma-Aldrich), uma resina quelante amplamente utilizada na extração DNA bacteriano e viral, provenientes de amostras clínicas ou de culturas para fins de diagnóstico molecular.

O Chelex 100 possui propriedades que o torna capaz de proteger as moléculas de DNA da ação de *DNases* (enzimas que degradam o DNA), por meio da ligação com os íons de magnésio, porém, este método gera um produto menos estável em armazenamento, podendo permanecer somente por 3 a 4 meses a uma temperatura de 4 a 8°C, e por isso é mais recomendado quando há a necessidade de um diagnóstico rápido de amostras com pouca concentração de DNA, como os materiais forenses (LAMBALLERIE et al., 1992).

Para a sua utilização na extração de material genético, o Chelex 100 foi preparado em suspensão a 10%, através da diluição em água esterilizada UV HPLC acrescentado-se uma pequena barra de agitação magnética, e em seguida posto em um agitador magnético, durante o preparo, a solução foi manipulada cuidadosamente e mantida sob condições estéreis, e após, permaneceu armazenada a 4°C até o uso.

Após ser homogeneizado, foram adicionados 100µl do Chelex 100 a 10% e 100µl de água ultra pura em cada eppendorf contendo os suabes, reduzindo a solução a uma concentração de 5%, o material foi transferido para um termobloco a 56°C e 1200 rpm por 2 horas, seguida de 10 minutos a 100°C, sem a necessidade de agitação e posteriormente, mantidas sob refrigeração entre 4 e 8°C. Antes da sua utilização na reação de PCR, o material extraído foi levado ao vórtex por alguns segundos e centrifugado a 13000 rpm, durante 3 minutos.

4.6. REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE – PCR

Os procedimentos metodológicos para a realização da PCR, seguiram a orientação de Raso et al. (2006), com algumas adequações. Os *primers* utilizados no estudo correspondiam a uma região conservada do gene da *Major Outer Membrane Protein* (MOMP) da bactéria, contendo as seguintes sequencias: A (5'-CAGGACATCTTGTCTGGCTTTAA-3') e B (5'-GCAAGGATCGCAAGATC-3') para a primeira reação, produzindo um produto de 260 pb e C (5'-TTAGAGGTGAGTATGAAAAACTC-3') e B (5'- GCAAGGATCGCAAGATC-3') para a segunda reação, produzindo um *amplicon* de 165 pb (Figura 7).



Figura 7. Sequência de nucleotídeos amplificada pela *semi-nested* PCR, através da utilização de *primers* dirigidos a a uma região conservada do gene da *Major Outer Membrane Protein* (MOMP) de *C. psittaci* (imagem gerada pelo programa *genious* 6.0).

Para as reações de amplificação foram utilizados, 5 µL de amostra (*template*) de DNA, 2,5 µl de 10x PCR Buffer minus Mg2, 0,5 µl de 10 mM dNTPs, 0,75 µl de 50 mM MgCl2, 0,5 µM de cada primer, 0,1 µl de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) e adicionado água estéril até completar um volume final de 25 µL.

A reação foi executada a 94°C por 10min, seguida de 34 ciclos a 94°C por 60s, 54°C por 60s. (para primeira reação) e 52°C por 60s (para segunda reação) e 72°C por 60s, com uma extensão final a 72°C por 4 minutos. O produto da PCR foi corado com solução de Blue Orange (Invitrogen, EUA) e submetidos à corrida eletroforética horizontal em gel de agarose 2% com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, EUA), em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), juntamente com o marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, EUA).

Os resultados foram visualizados num transluminador de UV e fotodocumentados. A vacina felina Felocell® CVR-C (Zoetis, Brasil), foi utilizada como controle positivo, pois segundo informações do fabricante, contém amostras atenuadas de *C. psittaci*, que após a nova nomenclatura, passou a ser denominada de *Chlamydophila felis*. Como controle negativo, foi utilizado água ultrapura

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A associação entre os resultados obtidos nos quatro criadouros analisados foi obtida pelo teste de proporções (*prop. test*) na versão 2.1.1, utilizando o R

Para a avaliação da suscetibilidade espécie-específica tendo como base a frequência dos dados obtidos nos testes de PCR e as aves amostradas, foi utilizado o teste do Qui quadrado (X^2), pelo programa SPSS a versão 19 (IBM, EUA).

A análise destes resultados limitou-se às variáveis que apresentaram diferenças significativas detectáveis com o resultado da semi-nested PCR ($p < 0,05$).

Os dados obtidos a partir da avaliação clínica individual dos animais e da avaliação higiênico sanitária dos criadouros serão representados por análise descritiva.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de suabe cloacal (n=201) e de orofaringe (n=201) das aves utilizadas no estudo, a extração do DNA bacteriano utilizando o Chelex 100 e a aplicação da técnica de *semi-nested* PCR, tendo como base a sequência de nucleotídeos iniciadores derivados do gene MOMP da *Chlamydophila* sp., originaram como produto final um *amplicon* de 165 pb facilmente visualizado através de um transluminador (Figura 8).

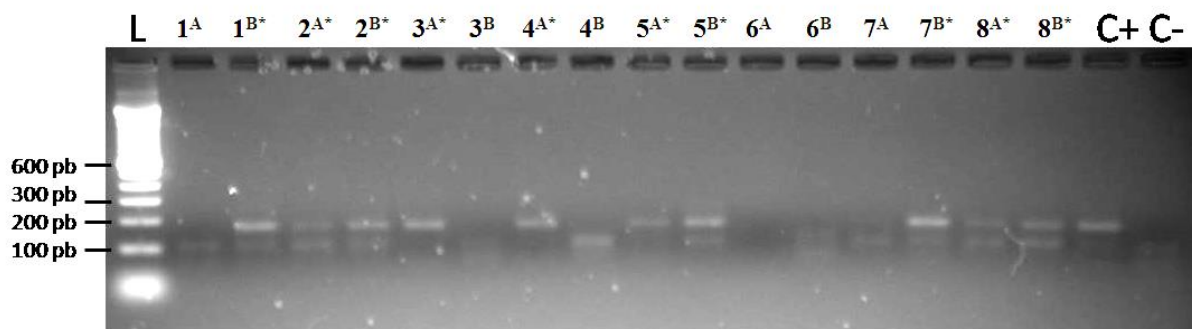


Figura 8. Sequências de DNA amplificadas através da *semi-nested* PCR em gel de agarose 2%. L = Marcador de peso molecular de 100 pb; 1^A = Amostra de suabe cloacal; 1^B = Amostra de suabe de orofaringe; ; (*) Amostras positivas; C+ = Controle positivo (vacina felina Felocell[®]); C- = Controle negativo (água ultra pura).

A *semi-nested* PCR também fora utilizada como meio para o diagnóstico da clamidiose em psitacídeos por Raso et al. (2006) demonstrando que 23,38 % (18/77) dos psitaciformes eram positivos, e em seguida por Vanrompay et al. (2007) com 19,2% (59/308), por Donati (2012) identificando a existência de *Chlamydophila* sp. em 5,09% (11/216) das aves estudadas e Leal (2013) com uma frequência de 10,6% (33/311) de animais infectados, destacando esta técnica como uma alternativa eficiente no diagnóstico desta enfermidade e reafirmando a importância epidemiológica da clamidiose nestes animais.

Além disso, Algayer (2003) e Neves (2013) também utilizaram a técnica de PCR em amostras de suabe cloacal e de orofaringe para a identificação dos agentes *Salmonella* e *Mycoplasma* sp., que assim como a clamidiose, são doenças importantes para determinar o *status* sanitário de psitacídeos mantidos em cativeiro.

No presente estudo a presença de infecção pela *Chlamydophila* sp. foi confirmada em 31,84% (64/201) dos animais amostrados, cuja distribuição dos resultados obtidos na *semi-*

nested PCR entre as espécies e o valor percentual estão demonstrados na tabela 1. Os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

Tabela 1. Número de indivíduos analisado, valor total e percentual da frequência de espécies de psitacídeos positivos no teste da *semi-nested* PCR.

(*)valores sem diferença estatística significativa; $X^2 = 13,467$; $p\text{-value} = 0,336$.

Espécie	Nº de emplaques	PCR positivas	%
<i>Amazona aestiva</i>	19	07	36,84%*
<i>Amazona festiva</i>	03	02	66,66%*
<i>Amazona farinosa</i>	19	08	42,11%*
<i>Amazona ochrocephala</i>	08	03	37,50%*
<i>Amazona amazônica</i>	76	18	23,68%*
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	05	02	40%*
<i>Cyanopsitta spixii</i>	06	01	16,66%*
<i>Ara ambígua</i>	06	01	16,66%*
<i>Ara ararauna</i>	04	01	25%*
<i>Ara chloropterus</i>	15	06	40%*
<i>Ara macao</i>	10	02	20%*
<i>Ara maracanã</i>	08	03	37,50%*
<i>Guaruba guarouba</i>	17	10	58,82%*
<i>Orthopsittaca manilatus</i>	01	00	-
<i>Deroptyus accipitrinus</i>	02	00	-
<i>Pionites melanocephala</i>	02	00	-
Total	201	64	

Os resultados obtidos na *semi-nested* PCR mostraram que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o percentual de amostras positivas relacionado à espécie de ave amostrada (Tabela 1), portanto, não evidenciou-se suscetibilidade à doença em qualquer uma das espécies de aves envolvidas nesta pesquisa, embora seja reconhecido que a maioria dos estudos relacionados a sanidade de psitacídeos envolvam os grupos de aves mais frequentemente observadas no ambiente doméstico, como as do gênero *Ara*, *Amazona* e *Nymphicus*.

A ausência de pré disposição específica também foi observada por Carvalho (2012) em uma pesquisa por *Chlamydophila sp.*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado de Goiás.

Em um estudo epidemiológico desenvolvido por Proença et al (2010) utilizando aves de companhia atendidas em uma clínica particular em Brasília/DF, observou-se que todos os animais atendidos (n=123) possuíam algum sinal clínico sugestivo de clamidiose ou foram positivos na PCR, mesmo na ausência de sintomatologia, e a espécie de maior importância epidemiológica foi a calopsita (*Nymphicus hollandicus*), perfazendo um total de 75% dos casos suspeitos de clamidiose ou com PCR positiva, representando 85% dos casos positivos à PCR no referido estudo.

O gênero *Ramphastos* por sua vez não demonstrou positividade à clamidiose em teste de biologia molecular realizado em 25 aves da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (RASO et al., 2005). O mesmo resultado também foi descrito por Ferreira Junior (2012) ao pesquisar a infecção por *Chlamydophila sp.* em ramphastídeos, embora os dois autores acreditem que esta espécie possui participação no ciclo epidemiológico da clamidiose aviária, necessitando de investigações mais precisas, em estudos futuros, que envolvam mais de uma coleta, além da associação à outras técnicas de diagnóstico, como testes sorológicos.

De acordo com Raso (2007) na clamidiose, a forma de excreção do agente infeccioso pode ser determinar o estágio clínico da doença no hospedeiro, pois quando a excreção através da cloaca é predominante, observar-se que os animais estão em processo crônico de infecção e quando a presença da bactéria é mais acentuada na orofaringe, sugere um estágio inicial da doença e nos casos de eliminação da *C. psittaci* pelas vias traqueais e cloacais, é possível que esteja acontecendo uma reinfecção persistente.

No presente estudo, a maior parte da população de animais estudados, 13,93% (28/201) das aves eliminavam o agente exclusivamente pela via cloacal e a ocorrência de dupla excreção do agente infeccioso (cloaca e orofaringe) foi confirmada em 6,47% (13/201) dos casos (Figura 9).

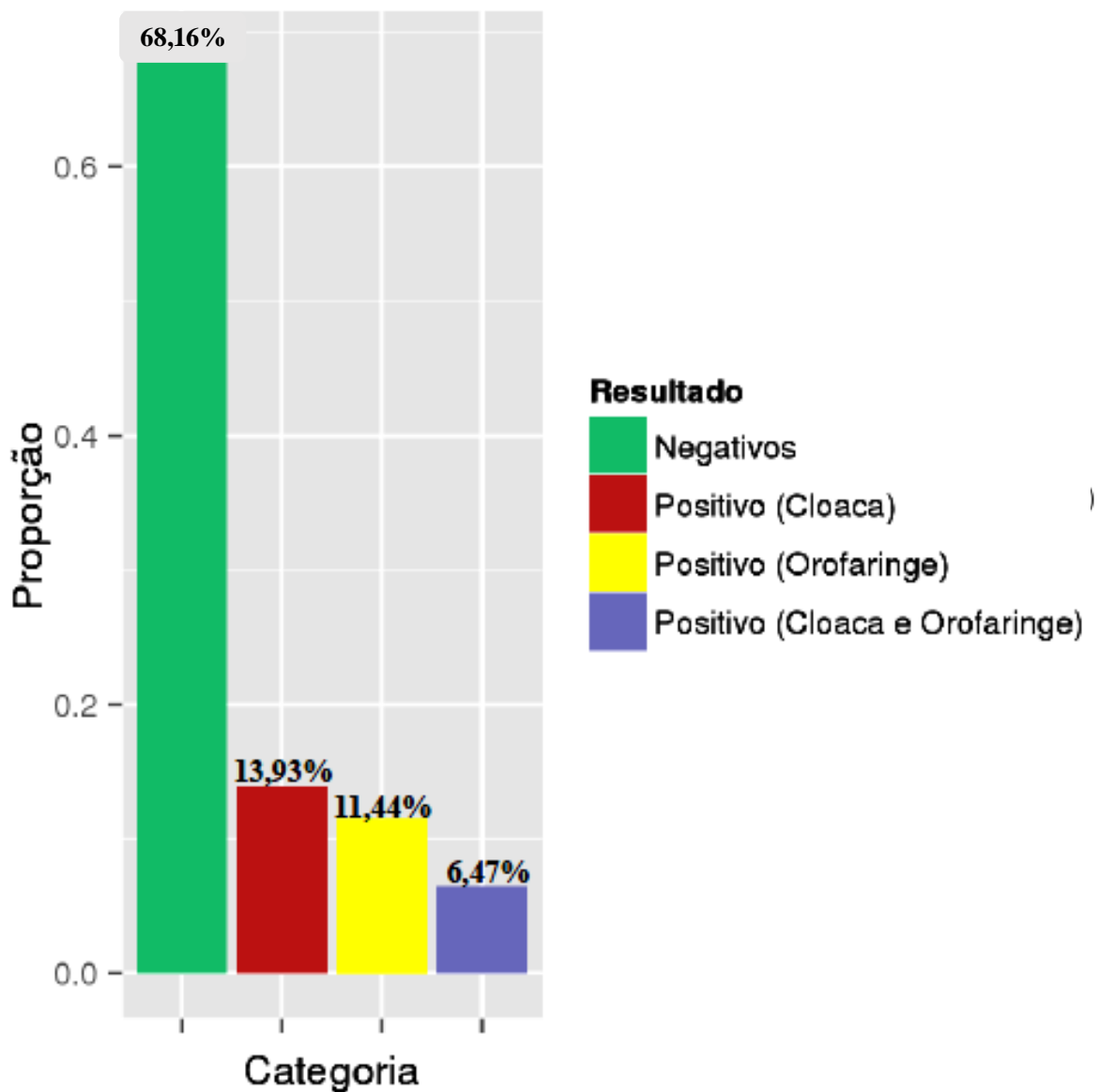


Figura 9: Distribuição das amostras positivas na semi-nested PCR de acordo com o sítio de excreção do agente infeccioso

A distribuição de aves infectadas entre os criadouros foi variável, porém em todas as localidades foi possível identificar as três formas de eliminação do agente infeccioso nas aves positivas e após comparação entre as variáveis estudadas tendo como base os resultados obtidos na *semi-nested* PCR para cada criadouro, foi observado diferença estatística significativa entre os criadouros C2 e C3 ($p= 0.02963$) (Figura 10).

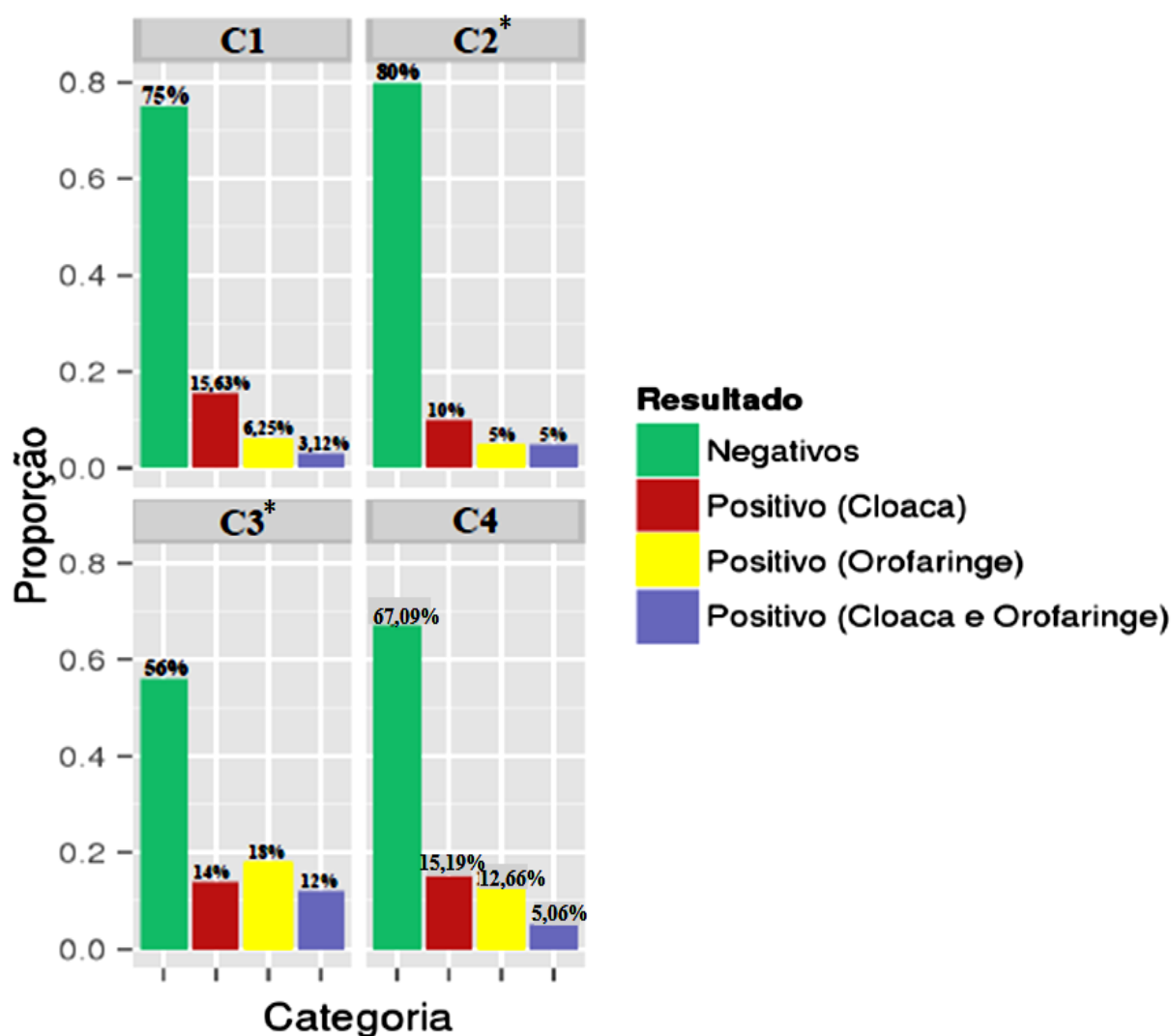


Figura 10. Gráfico da distribuição dos resultados da semi-nested PCR de acordo com o criadouro analisado e classificação das aves positivas, considerando o sítio de eliminação do agente infeccioso (*) Criadouros que apresentaram diferença estatística $p\text{-value} = 0.02963$.

Em uma pesquisa realizada por RASO et al. (2006) foi investigada a prevalência da infecção por *Chlamydophila* sp. na espécie *A. aestiva* e *Anodorhynchus hyacinthinus* oriundos do pantanal do Matogrosso a partir da técnica de *semi-nested* PCR, confirmando que 26,7% das aves positivas eliminavam o agente pela via cloacal e somente 8,9% pela orofaringe, comprovando importância da forma crônica da doença, onde aves assintomáticas eliminam os CE de forma intermitente pelas fezes, mesmo na ausência de sinais clínicos sugestivos da doença.

Do mesmo modo, em um estudo envolvendo 311 Psitaciformes oriundos de estabelecimentos comerciais e proprietários na cidade de Salvador, a frequência de infecção

por *Chlamydophila* sp. foi de 10,6% (33/311), sendo 9,3% (29/311) em amostra de cloaca e apenas 1,3% (4/308) em amostras de orofaringe (SANTOS 2012).

Andersen (1996) ao realizar um estudo comparativo entre amostras de fezes, suabe de cloaca e orofaringe em periquitos e perus e infectados experimentalmente por *C. psittaci*, detectou que dentre as aves positivas, 80,4 % excretavam o agente pela orofaringe, 45,1% pelas fezes e 37,3% pela cloaca. Para o autor, um maior número de animais excretando o agente pela orofaringe é indicativo de que a maior parte dos animais sem encontravam em um estágio de infecção inicial.

Apesar deste trabalho ter comprovado casos de excreção do agente infeccioso pela cloaca e orofaringe em psitacídeos de todos os criadouros estudados, até o momento não fora encontrado nenhum relato como este na literatura, mesmo sendo consenso entre os autores a possibilidade de dupla eliminação (SAITO et al, 2005; RASO, 2007; STAMM, 2006; RASO, 2009; SANTOS, 2012).

Os resultados da avaliação higiênico sanitária dos criadouros estudados, confirmaram que fatores ambientais e sanitários influenciaram na ocorrência de infecção por *Clamydophila* sp. nas diversas localidades, pois ao analisar os dados relacionados na tabela 4, observou-se que C1 e C2 obtiveram uma avaliação positiva, com 66,66% (4/6) e 83,33% (5/6) de conceitos (A) e conseqüentemente, o menor número de casos de clamidiose diagnosticados, enquanto que nos criadouros C3 e C4, foi observado um manejo deficiente no ponto de vista higiênico sanitário, com somente 0% (0/6) e 50% (3/6) de boas avaliações e um maior número de animais doentes (Tabela 2/ Figura 9).

Tabela 2. Conceitos aplicados aos principais aspectos higiênico sanitários observados nos criadouros selecionados para o estudo.

Aspectos higiênico sanitários	C1	C2	C3	C4
Higiêne dos recintos	A	A	B	A
Higiêne dos comedouros	A	A	B	A
Higiêne dos bebedouros	A	A	B	A
Lotação dos recintos	A	A	B	B
Utilização de EPI's pelos funcionários	C	B	C	C
Adoção de quarentena em recintos individuais	C	A	C	C

Legenda: A= Boa/se aplica; B= Regular; C= Péssima/Não se aplica

Uma maior ocorrência de aves positivas para *Chlamydophila* sp. também foi identificada em um CETAS e um criadouro comercial em relação a um conservacionista no Estado de Goiás, o que segundo os autores, é reflexo de uma melhor qualidade dos recintos, boas condições de higiene e menor rotatividade de aves dentro do criadouro (CARVALHO, 2012).

De acordo com HARKINEZHAD et al. (2009), quando aves são submetidas a fatores de estresse, como falhas no manejo, provação de alimento, água ou mudança de recinto, a manifestação dos sinais clínicos pode se intensificar, bem como as taxas de eliminação da bactéria, podem aumentar, potencializando o risco de infecção à outras aves.

Neste estudo, a diferença estatística demonstrada na figura 9 encontrada nos resultados obtidos na PCR entre as aves pertencentes aos criadouros C2 e C3, está diretamente relacionada ao manejo higiênico sanitário empregado nas duas localidades, tendo em vista que o C3 apresentava uma maior variabilidade de espécies pertencentes a fauna silvestre, o que pode dificultar a implementação de um manejo higiênico sanitário mais criterioso que atenda igualmente a todas as espécies. E além disso, outro aspecto que pode ter influenciado no aumento da prevalência da doença entre as aves estudadas pertencentes a este criadouro, é o fato de que o mesmo estava passando por um momento de reordenação, com a construção de novos recintos e reagrupamento das aves.

Enquanto que o criadouro C2, obteve uma melhor avaliação em relação ao manejo empregado, com o menor número de animais positivos (20%), sendo que dentre estas aves, somente quatro animais encontravam-se distribuídos em recintos coletivos e os demais se encontravam isolados em quarentena, sem qualquer tipo de contato com outras aves. Este criadouro também é o mais antigo, desde 1866, localizado na região urbana, aberto ao público e com a presença de apoio técnico especializado diariamente, possibilitando o emprego de um manejo sanitário mais eficiente e consolidado.

Para Raso (2007) e Cavalcante (2008), a implementação de medidas rigorosas de limpeza e desinfecção nos criadouros, além de cuidados com relação às fronteiras, à quarentena, ao tratamento de aves infectadas e ao movimento de aves migratórias, são medidas eficientes controle da clamidiose, diminuindo a presença e a disseminação do agente infeccioso no ambiente.

Fatores ambientais e sanitários como o tipo de estabelecimento, origem do animal, higiene e lotação do recinto, tempo no local e procedimento para entrada de novas aves também pareceram influenciar na ocorrência de infecção por *Clamydophila* sp. em psittaciformes de

zoológicos, CETAS, criadouros comerciais e conservacionistas no Estado da Bahia (LEAL, 2013).

Nesta pesquisa a sintomatologia não consistiu em um fator determinante como auxílio no diagnóstico da clamidiose, pois a maioria dos animais positivos na *semi-nested* PCR se encontravam sob a condição de portador assintomático e somente 7,96% (16/201) das espécies examinadas apresentavam algum sinal clínico possivelmente relacionado a doença (Tabela 3).

Tabela 3. Sinais clínicos observados no exame clínico individual dos animais dentro dos seus respectivos criadouros, valor absoluto e percentual de cada alteração clínica visualizada em relação ao número total de aves amostradas.

Alterações clínicas	C1	C2	C3	C4	Total	%
Diarreia	(1/32)	--	(1/50)	--	(2/201)	1,00%
Secreção ocular/nasal	--	--	--	--	--	--
Mutilação	--	--	(1/50)	--	(2/201)	1,00%
Alterações na plumagem	(3/32)	--	(3/50)	--	(6/201)	2,98%
Alterações no bico	--	--	(3/50)	--	(3/201)	1,49%
Animais magros	--	--	--	--	--	--
Sobrepeso	--	(4/40)	--	--	(4/201)	1,99%
Presença de ectoparasitos	--	--	--	--	--	--
Ausência de sinais clínicos	(28/32)	(36/40)	(42/50)	(79/79)	(185/201)	92,04%
Presença de sinais clínicos	(4/32)	(4/40)	(08/50)	(0/79)	(16/201)	7,96%

Embora vários sinais clínicos como conjuntivite, diarreia e alterações de plumagem sejam amplamente descritos como sugestivos de clamidiose em psitacídeos, nesta pesquisa observou-se que somente 3,98% (8/201) das aves apresentavam sintomatologia compatível com a enfermidade seguida de diagnóstico confirmado a partir da PCR, enquanto que 27,86% (56/201) dos animais avaliados eram PCR+, porém não apresentavam qualquer sinal clínico

possivelmente relacionado à doença, reafirmando a predominância da forma crônica desta enfermidade entre as aves estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Relação entre a presença de sinais clínicos sugestivos de clamidiose e os resultados obtidos na *semi-nested* PCR

Avaliação clínica/ da PCR	Resultado	C1	C2	C3	C4	Total	%
Sintomáticas/ PCR+		(0/32)	(0/40)	(6/50)	(2/79)	(8/201)	3,98%
Sintomáticas/ PCR-		(2/32)	(3/40)	(3/50)	(0/79)	(8/201)	3,98%
Assintomáticas/ PCR+		(8/32)	(8/40)	(14/50)	(26/79)	(56/201)	27,86%
Assintomáticas/ PCR-		(22/32)	(29/40)	(26/50)	(52/79)	(129/201)	64,18%

Legenda: PCR+ =Animais positivos no teste da PCR; PCR- = Animais negativos no teste da PCR

A presença de aves portadoras assintomáticas da *Chlamydophila* sp. também foi observada por Hidasi (2010), onde foi diagnosticado a doença em 3,66% (11/300) na análise pela PCR e apenas duas das aves apresentaram alterações clínicas compatíveis. Braz et al. (2014) realizaram um estudo envolvendo exclusivamente aves assintomáticas, confirmando o diagnóstico de clamidiose em 4,21% (17/403) amostras.

Ono (2009), ao realizar um estudo referente a clamidiose nas espécies *A. ararauna* e *A. aestiva* oriundas de Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) no Mato Grosso do Sul, obteve como resultado 55,56% e 35,42% de prevalência nas duas espécie, destacando a presença de diarréia esbranquiçada, apatia, anorexia, alteração no empenamento (com queda de penas) e musculatura peitoral principalmente na espécie *A. ararauna*.

Alterações respiratórias e oculares também não foram observadas em nenhum dos animais utilizados no presente estudo, embora estas sejam as alterações clínicas mais frequentemente descritas por Raso et al. (2004) e Van Loock et al. (2005) em aves positivas.

Segundo OGLESBEE (1998), na forma crônica da clamidiose a emaciação muscular e as alterações no empenamento podem ser os únicos sinais clínicos observados.

Os sinais clínicos frequentemente observados nas aves sintomáticas e PCR+ neste estudo, foram as alterações de plumagem (6/201), sinais como sobrepeso e diarréia não estavam associados à infecção pela *Chlamydophila* sp. nas aves amostradas.

Vasconcelos (2012) ao encontrar uma prevalência de 34,78% de indivíduos positivos e assintomáticos para *Chlamydophila* sp., destacou a importância em realizar o isolamento destes animais na recepção, bem como o uso de EPI's por parte dos tratadores e demais pessoas que possuam qualquer tipo de contato com essas aves, como medidas importantes de prevenção e controle, que devem ser adotadas mesmo na ausência de sinais clínicos sugestivos da doença.

6. CONCLUSÃO

A biologia molecular, por meio da técnica de *Semi-nested* PCR permitiu o diagnóstico de clamidiose nas diferentes espécies de psitacídeos mantidos em cativeiro, demonstrando uma prevalência variável entre os criadouros e as Mesorregiões estudadas;

A predominância de aves portadoras assintomáticas da doença, comprova o potencial destes animais como transmissores da clamidiose e a importância desta doença em saúde coletiva;

A não implementação de um manejo higiênico sanitário adequado nos criadouros, influenciou positivamente no aumento do número de aves positivas nas diferentes localidades;

A presença de aves positivas em todas as localidades avaliadas, evidencia a necessidade de estudos mais aprofundados em relação a doença, incluindo pesquisas em outras aves suscetíveis e seres humanos que lidam diariamente com estes animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHMAN, Y. M.; BELLAND, R. J. The chlamydial developmental cycle. **FEMS Microbiol. Rev.** Nov; 29(5), p 949-959, 2005.

ALLGAYER, M. C. **Detecção de Salmonella sp. em psitacídeos de cativeiro através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. UFRS. 54 p. Porto Alegre, 2003.

ANDERSEN, A. A Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. **J Vet Diagn Invest**, v. 8, p. 448-450, 1996.

ANDERSEN, A. A., FRANSON, J. C. Avian Chlamydiosis. In: THOMAS, N. J.; D.; HUNTER, B.; ATKINSON, C. T. **Inf. Dis. of Wild Birds** Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, p. 303-316, 2007

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

AUNDRIA WEST, D. V. Topics in Medicine and Surgery. A Brief Review of *Chlamydomydia psittaci* in Birds and Humans. **M Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, nº 1, p. 18–20, jan. 2011.

BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. S.; MAGALHÃES, D. F. Zoonoses e Saúde Pública: Riscos da Proximidade Humana com a Fauna Silvestre. **Ciênc. vet. tróp.**, v. 14, p. 1-9, 2011.

BUTLER, J. C.; WHITNEY, C. G. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis). **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** v. 47, p.1-14, 1998.

BRAZ, M. A. **Detecção e caracterização molecular de *Chlamydomydia psittaci* e *Chlamydomydia abortus* em aves assintomáticas**. Mestrado em Ciência Animal. 39 p. UNESP. Araçatuba, 2012.

CARVALHO, A. M. ***Chlamydomydia spp.*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em psitacídeos (Filo: Cordata, Ordem: Psitaciforme) de diferentes cativeiros no Estado de Goiás**. Mestrado em Ciência Animal. 71p. UFG Goiânia, 2012.

CARVALHO, P. P. **Alterações patológicas encontradas em psitacídeos mortos em cativeiro de janeiro de 1994 a dezembro de 2002 no estado do Paraná**. 2004. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Setor de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <<http://wonderfullglosters.110mb.com/PDF/Patologiadasaves.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2014.

CASAGRANDE, R. A.; MACHADO, V. R.; SOUZA, S. O.; WATANABE, T. T. N; SONNE, L.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D. Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 9, p. 885-890, 2014.

CAVALCANTE, G. C. **Clamidiose Aviária: Revisão de Literatura** (Trabalho monográfico de conclusão do curso de Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos. Brasília, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.qualittas.com.br/uploads/documentos/Clamidiose%20Aviaria%20%20Georges%20Cavalcanti%20e%20Cavalcante.PDF.pdf>>. Acesso em: 14 de nov., 2014.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução, nº 394 de 2007 - Gestão de Espécies – Fauna. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legislacao/CONAMA_RES_CONS_2007_394.pdf>. Acesso em: 14 de set. 2014.

CFSPH, Center for Food Security e Public Health. Psittacosis/ Avian Chlamydiosis. Iowa State University, 2009. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/psittacosis.pdf>>. Acesso em: 04 de dez. 2014.

CUBAS, Z. S.; GODOY, S. N. **Algumas doenças de aves ornamentais.** 2004. Disponível em: <<http://wonderfullglosters.110mb.com/PDF/Dossierdedoenças.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2014.

DONATTI, R. V. **Avaliação sanitária de psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado de Minas Gerais, no período de 2010-2012.** Dissertação mestrado (Ciência Animal). 104 p. UFMG. Belo Horizonte, 2012.

ECCO, R.; PREIS I. S.; MARTINS, N. R. S.; VILIELA, D. A. R.; SHIVAPRASAD, H. L. An outbreak of chlamydiosis in captive psittacines. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 2, n. 2, p. 85-90, 2009.

EVERETT, K. D.; HORNUNG, L. J.; ANDERSEN, A. A. Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 575-580, 1999.

EVERETT, K. D. *Chlamydia* and Chlamydiales: more than meets the eye. **Vet Microbiol.** 75, p. 109-126, 2000.

FENGA, C.; CACCIOLA, A.; DI NOLA, C.; CALIMERI, S.; LO GIUDICE, D.; PUGLIESE, M.; NIUTTA, P. P.; MARTINO, L. B. Serologic Investigation of the prevalence of *Chlamydophila psittaci* in occupationally-exposed subjects in Eastern Sicily. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 14, p. 93-96, 2007.

FERREIRA JUNIOR, F. C. **Avaliação sanitária de tucanos e araçarís (Aves: Psiformes) em cativeiro no Estado de Minas Gerais.** Mestrado em Ciência Animal. 80p. Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte. 2012.

FERRO, A. B. **Imunohistoquímica.** Instituto Politécnico de Lisboa - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Out., 2013. Disponível em: <<http://amadeuferro.webs.com/documentos/texto%20total%20v2.4a.pdf>>. Acesso em: 22 set., 2014.

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

GARCIA, H. S.; GARCIA, D. S. S. A criação de passeriformes como forma de preservação ambiental. **Revista Eletrônica Direito e Política**, v. 7, n.3, 2012.

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

GERLACH, H. *Chlamydia*. In: RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. (Eds.), **Avian Medicine: Principles and Application**. Wingers, FL, p. 984–996, 1994.

GUZMAN, D. S. M.; DIAZ-FIGUEROA, O.; JR, T. T.; CIEMBOR, P.; MORGAN, T.; WALDEN, M.; POSTON, R. P.; FLAMMER, K.; MITCHELL, M. A.; RITCHIE, B. Evaluating 21-day Doxycycline and Azithromycin Treatments for Experimental *Chlamydophila psittaci* Infection in Cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 1, p. 35-45, 2010.

HARKINEZHAD, T.; GEENS, T.; VANRONPAY, D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. **Vet. Microbiology**, v. 135, n. 1–2, 16, p. 68-77, 2009.

HERRMANN, B.; PETTERSSON, B.; EVERETT, K. D. MIKELSEN, N. E.; KIRSEBON, L. A. Characterization of the *rnpB* gene and the RNase P RNA in the order *Chlamydiales*. **Intern J Syst Evolut Microb.**, v. 50, p.149-158, 2000.

HIDASI, H. W. **Detecção de Enterobacteriaceae e Chlamydophila spp. em psitacídeos provenientes do centro de triagem de animais selvagens de Goiás**. Mestrado em Ciência Animal. 65 p. UFG. Goiânia, 2004.

HOGAN, R. J.; MATHEWS, S. A.; MUKHOPADHYAY, S. *et al.* Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. **Infect. Immunology**, v. 72, n. 4, p. 1843-1855, 2004.

ICMBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica. Brasília, 2011. Disponível em: < <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-papagaios/pan-papagaios.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2014.

KALETA, E. F.; TADAY, E. M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. **Avian pathology**, Philadelphia v. 32, n. 5, p. 435-462, 2003.

LAMBALLERIE, X.; ZANDOTTI, C.; VIGNOLI, C.; BOLLET, C.; MICCO, P. A one-step microbial DNA extraction method using “Chelex 100” suitable for gene amplification. **Res. Microbiology**, v. 143, p. 785-790, 1992.

LEAL, D. C. **Epidemiologia da infecção por Chlamydophila psittaci em Psittaciformes e Columbiformes no estado da Bahia**. Tese (Doutorado em Ciência Animal nos Trópicos).

106p. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 2013.

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

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

LOPES, J. C. A. Operações de fiscalização da fauna: análise, procedimentos e resultados. In: **Animais Silvestres. Vida à venda**. Brasília: Dupligráfica, 260 p., 2002.

MACHADO, A. M. B.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed., Brasília: MMA; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008, 1420 p.

MAGNINO, S., AGNINO, S., HAAG-WACKERNAGEL, D.; GREIGENFEIND, I.; HELMECKE, A.; DOVČ, E.; PRUKNER-RADOVČIĆ, E; REŠIDBEGOVI, E; ILESKI, K.; LAROUCAU, M.; DONATI, V.; MARTINOV, E. F. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. **Vet. Microbiol**, v. 135, p. 54-67, 2009.

MARTINEZ, P. A. J. Genero *Chlamydia*: Biología Básica_Propriedades Antigénicas Y Potencial Patogénico. **C. Veterinaria**. v. 4, 1987.

MESSMER, T. O.; SKELTON, S. K.; MORONEY, J. F.; DAUGHARTY, H.; FIELDS, B. S. Application of a *nested* PCR, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35 (8), p. 2043-2046, 1997.

MORANGE, A. **De la psittacose, ou infection speciale determinee par des perruches**. Academie de Paris. Paris, France 1895.

MOULDER, J. W. Interaction of Chlamydia and host cells in vitro. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 143-190, 1991.

NEVES, J. P. **Estudo da prevalência de *Mycoplasma spp.* em psitacídeos de dois criadouros do Distrito Federal**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 75p. Brasília- DF, 2013.

OGLESBEE, B. L. **Distúrbios dos animais de estimação aviários e exóticos**. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Saunders: clínica de pequenos animais. São Paulo: Roca, 1998, p. 1397-1407.

OIE, World Organisation for Animal Health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2004. Disponível em: < http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00105.htm>. Acesso em: 04 maio 2014.

OLSEN, B.; PERSSON, K.; BROHOLM, K. A. PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerine birds. **Sweden. Epidemiol. Infect.**, v. 121, p. 481-483, 1998.

ONO, T. M. **Prevalência de Chlamydophila sp. e quadro hematológico de Ara ararauna e Amazona aestiva em Centro de Reabilitação de Animais Silvestres em Campo Grande/MS.** Mestrado em Ciência Animal. 56 p. UFMS. Campo Grande, 2009.

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

PERECIN, F.; CUNHA, L. L.; RIGOLETO, L.; MARTELLI, L.; BONICI, M.; GOMES, M. D.; MARTINS, T.; COSTA, T. A.; FAUSTO, T.; TAIRA, R.; **Manual Informativo sobre Posse Responsável de Psitacídeos.** BOTUCATU, 2011.

PROENCA, L. M.; FAGLIARI, J. J.; RASO, T. F. C. psittaci infection: a review with emphasis in psittacines. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 841-847, 2011.

RASO, T. F.; Berchieri Júnior, A.; Pinto, A. A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrot in Brazil. **J. Zoo Wildlife Med.**, v. 33, p. 118-121, 2002.

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

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

RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 235-241, 2006.

RASO, T. F. Clamidiose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (org.). **Tratado de animais selvagens.** São Paulo: Roca, 2007. Cap. 47, p. 760-767.

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

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

RASO, T. F. ***Chlamydophila psittaci* em aves e humanos: estudo de uma zoonose emergente.** 2015. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/57897/chlamydophila-psittaci-em-aves-e-humanos-estudo-de-uma-zoonose-emergente/>>. Acesso em: 06 jul 2015.

RENTAS, Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. 1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre. 2011. Disponível em: <<http://www.rentas.org.br/>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Clamidiose aviária.** Patologia Aviaria. Barueri: Manole. P. 367 – 373, 2009.

RITTER, J. Beitrag zur Frage des Pneumotyphus (Eine Hausepidemie in Uster [Schweiz] betreffend). **Deutsches Archiv für Klinische Medizin**, v. 25, p. 53-96, 1880.

SACHSE, K.; VRETOU, E.; LIVINGSTONE, M.; BOREL, N.; POSPISCHIL, A.; LONGBOTTOM, D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. **Vet. Microbiol.**, v. 135, p. 2 – 21, jun.2009.

SAIKKU, P.; LAITINEN, K.; LEINONEN, M.; Animal models for *Chlamydia pneumoniae* infection. **Atherosclerosis**, v. 140, Suppl.1, p. 140, 17-19, 1998.

SAITO, T.; OHNISHI, J.; MORI, Y.; IINUMA, Y.; ICHIYAMA, S.; KOHI, F. Infection by *Chlamydophila avium* in an elderly couple working in a pet shop. **J. Clin. Microbiology**, v. 43, n.6, p. 3011–3013, 2005.

SANTOS, F. ***Chlamydophila psittaci* em Psittaciformes de estimação em Salvador, Bahia, Brasil.** – Salvador, Bahia, 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2012.

SILVA, C. F.; SILVA, L. J. M. **História e participação social nas mesorregiões paraenses.** Núcleo de Altos Estudos Amazônicos da UFPA (NAEA), paper – 226, 2008.

SILVA, S. S. **Avaliação clínica, laboratorial e detecção de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Distrito Federal, Brasil.** Dissertação de mestrado em saúde animal. 72p. Universidade de Brasília. Brasília/DF, 2013.

SMITH, K. A.; CAMPBELL, C. T.; MURPHY, J.; STOBIERSKI, M. G.; ENGELSEN, L. A. Compendium of Measures to Control *Chlamydophila psittaci* Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2010 National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, n.1, p. 32-45, 2011.

STAMM, W. E. Diseases due to Chlamydia. **ACP Medicine**. P. 1-10, 2006.

STEWARTSON, A. J.; GRAYSON, M. L. Psittacosis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 24, p. 7-25, 2010.

VAN LOOCK, M.; VERMINNEN, K.; MESSMER, T. O.; VOLCKAERT, G.; GODDEERIS, B. M.; VANROMPAY, D. Use of a nested PCR-enzyme immunoassay with an internal control to detect *Chlamydophila psittaci* in turkeys. **BMC Infect Dis.**, v. 5, n.76, 2005.

VANROMPAY, D.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Chlamydophila psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. **Vet. Microbiology**, 25, v. 45, p. 93-119, 1995.

VANROMPAY D.; VAN NEROM A.; DUCATELLE R.; HAESEBROUCK F. Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, p. 1470– 1474, 1994.

VANROMPAY, D.; HARKINEZHAD, T.; VAN DE WALLE, M.; BEECKMAN, D.; VAN DROOGENBROECK, C.; VERMINNEN, K.; LETEN, R.; MARTEL, A.; CAUWERTS, K. *Chlamydophila psittaci* transmission from pet birds to humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1108–1110, 2007.

VANROMPAY, D. Update on avian chlamydiosis and its public health significance. **EJCAP.**, v. 18, n. 3, p. 267-273, 2008.

VASCONCELOS, T. C. B. **Estudo Clínico e Detecção pela Reação em Cadeia da Polimerase de *Chlamydophila psittaci* em Araras-canindé (*Ara araruana*, Aves: Psitaciformes) no Centro de Triagem de Animais Silvestres/ IBAMA, Rio de Janeiro.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária- Clínica e Reprodução Animal da Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2012.

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

VERMINNEN, K.; DUQUENNE, B.; KEUKELEIRE, D.; DUIM, B.; PANNEKOEK, Y.; BRAECKMAN, L.; VANROMPAY, D. Evaluation of a *Chlamydophila psittaci* Infection Diagnostic Platform for Zoonotic Risk Assessment. **J. of Clinical Microbiology**, v. 46, Jan., p. 281–285, 2008.

VILELA, D. A. R. **Diagnóstico e Situação dos Animais Recebidos nos Cetos Brasileiros e *Chlamydophila psittaci* no Cetos de Belo Horizonte, MG.** Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte, 2012.

WIEDMANN, S. M. P. **A fauna silvestre na legislação brasileira.** In: MARQUES, José Roberto. (org.) Sustentabilidade e temas fundamentais do direito ambiental. Campinas, SP: Millennium Editora, 2009.

WILLS, J. M. Chlamydia zoonoses. **J. Small Anim. Practice**, v.27, p.717-731, 1986.

WYRICK, P. B.; RICHMOND, S. J. Biology of chlamydiae. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n. 195, p.1507- 1512, 1989.

APÊNDICES

APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZONIA
 PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
 Projeto: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CHLAMYDOPHILA sp. EM
 PSITACIFORMES MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ

FICHA DE EXAME CLINICO INDIVIDUAL

Espécie:		Peso:	Data:		
Nº do recinto:		Nº da anilha:			
Faixa etária: () Jovem () Adulto		Sexo: () Masc. () Fem. () Indef			
Há quanto tempo está no criadouro? () <1 ano () 1 a 5 anos () > 5 anos					
Qual a origem do animal?					
Aparência geral: () Boa () Ruim () Regular					
Atitude: () Normal/ativo () Calmo () Irresponsivo					
Comportamento: () Dócil () Agressivo					
Score corporal: 1. () Caquético 2. () Magro 3. () Normal 4. () Sobrepeso 5. () Obeso					
Hidratação: () Normal () Desidratado					
Ectoparasitos: () Presentes () Ausentes					
Empenamento	Cobertura	() Boa			
		() Ruim			
		() Regular			
	Qualidade	Aparência	() Boa		
			() Ruim		
		Cor	() Regular		
() Normal					
() Alterada					
Alterações		Tegumentar:			
		Oftálmica:			
		Neurológica:			
		Digestória:			
		Buco facial:			
		Ap. Locomotor:			
Dieta/suplementação:					
Vacinação:					
Vermifugação:					
Procedimentos: () Swab de cloaca () Swab de orofaringe					
Observações:					

APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZONIA
 PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
 Projeto: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CHLAMYDOPHILA sp. EM
 PSITACIFORMES MANTIDOS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ

FICHA DE AVALIAÇÃO HIGIÊNICO SANITÁRIA DO CRIADOURO

Nome do Criadouro:	Data:
Endereço:	
Espécies de animais criados:	
Há outras espécies na propriedade? Quais?	
Nº de animais do plantel:	
Tipos de recintos: () Gaiola pequena () Gaiola grande () Incubadora () Gaiolão () Gaiola de reprodução () Outro	
Lotação: animais por m ²	
Cobertura: () Coberto () parcialmente coberto () descoberto	
Piso: () Natural () Artificial/ Tipo:	
Condição Sanitária: () Sujo () Razoável () Limpo	
Presença de poleiros: () Sim () Não/ Tipo:	
Condição Sanitária: () Sujo () Razoável () Limpo	
Presença de comedouros: () Sim () Não/ Tipo:	
Condição Sanitária: () Sujo () Razoável () Limpo	
Presença de bebedouros: () Sim () Não/ Tipo:	
Condição Sanitária: () Sujo () Razoável () Limpo	
Nº de animais no recinto:	
Frequência de limpeza:	
Materiais utilizados para higienização do recinto:	
Funcionários costumam utilizar EPI's para limpeza geral e manipulação dos animais?	
Realiza quarentena em recintos individuais?	
Condição sanitária geral: () Sujo () Razoável () Limpo	
Observações:	

ANEXOS

ANEXO 1



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39285-2	Data da Emissão: 31/08/2014 15:28	Data para Revalidação*: 30/09/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: WASHINGTON LUIZ ASSUNÇÃO PEREIRA	CPF: 220.629.201-72
Título do Projeto: Estudos de doenças infecciosas e parasitárias em animais silvestres no Estado do Pará: as inter-relações fauna-saúde-doença	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e processamento de amostras: histopatológica, sorológica, parasitológica, etc.	08/2013	07/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1 - Recomendamos a utilização de outro método de marcação que seja alternativo à ablação de artelhos, desde que o mesmo ocasiona injúrias menores ao animal, em comparação à ablação; Caso a ablação de artelho seja o único método possível, dentro do escopo do projeto e tendo em vista as características da espécie-alvo, recomendamos que, como meio de minimizar eventual injúria e/ou infecção, seja feita a dessensibilização e a anestesia do local do corte, com xilocaína, e, se possível, que a ferida cirúrgica seja isolada com fio de sutura absorvível. 2 - Realizar as coletas de material dos peixes-boi do cativeiro de acordo com o manejo periódico dos animais.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Frederico Ozanan Barros Monteiro	Pesquisador	484.792.843-15	94025004946 SSP-CE	Brasileira
2	RAIMUNDO NONATO MORAES BENIGNO	Pesquisador	049.143.682-34	0326 CRMV-PA	Brasileira
3	Klena Sarges Marruaz da Silva	Colaboradora	566.401.295-15	24604594-2 SSP-SP	Brasileira
4	Manoel do Carmo Pereira Soares	Pesquisador	102.147.802-44	3146 CRM-PA	Brasileira
5	Bárbara do Nascimento Borges	Pesquisadora	606.119.872-87	2808594 SSP-PA	Brasileira
6	HILMA LUCIA TAVARES DIAS	Pesquisadora	159.059.692-72	65366 SEGUP-PA	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17393534





Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39285-2	Data da Emissão: 31/08/2014 15:28	Data para Revalidação*: 30/09/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: WASHINGTON LUIZ ASSUNÇÃO PEREIRA	CPF: 220.629.201-72
Título do Projeto: Estudos de doenças infecciosas e parasitárias em animais silvestres no Estado do Pará: as inter-relações fauna-saúde-doença	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PA	Fundação Zootécnica de Marabá	Fora de UC Federal
2		PA	AREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DO IGARAPÉ GELADO	UC Federal
3	BELEM	PA	Bosque Rodrigues Alves	Fora de UC Federal
4	BELEM	PA	Museu Paraense Emilio Goeldi	Fora de UC Federal
5	BELEM	PA	Parque Mangual das Garças,	Fora de UC Federal
6	TERRA ALTA	PA	Fazenda Pacaiamum	Fora de UC Federal
7	CAPITÃO POCO	PA	Criatório conservacionista Gavião Real	Fora de UC Federal
8	BENEVIDES	PA	Criatório comercial fazenda Inhamuns	Fora de UC Federal
9		PA	Criatório de caítilos da Embrapa Amazônia Oriental	Fora de UC Federal
10		PA	FLORESTA NACIONAL DE CARAJÁS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Didelphimorphia, Sarcophagii, Holocephali, Chiroptera, Bradypodidae, Cyclopedidae, Rodentia, Artiodactyla, Mustelidae, Squamata, Procyonidae, Podocnemididae, Actinopterygii, Chelidae, Crocodylia, Perissodactyla, Kinosternidae, Amphibia, Dasydopidae, Cephalaspidomorphi, Sarcophagii, Perissodactyla, Crocodylia, Actinopterygii, Squamata, Mustelidae, Rodentia, Amphibia, Cyclopedidae, Dasydopidae, Aves, Cephalaspidomorphi, Sirenia, Chelidae, Didelphimorphia, Procyonidae, Kinosternidae, Bradypodidae, Chiroptera, Podocnemididae, Artiodactyla, Holocephali, Primates
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Holocephali, Cyclopedidae, Podocnemididae, Kinosternidae, Amphibia, Artiodactyla, Actinopterygii, Sarcophagii, Procyonidae, Bradypodidae, Dasydopidae, Chelidae, Perissodactyla, Sirenia, Crocodylia, Cephalaspidomorphi, Mustelidae, Squamata, Rodentia, Didelphimorphia, Chiroptera
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Holocephali, Cyclopedidae, Podocnemididae, Kinosternidae, Amphibia, Artiodactyla, Actinopterygii, Sarcophagii, Procyonidae, Bradypodidae, Dasydopidae, Chelidae, Perissodactyla, Sirenia, Crocodylia, Cephalaspidomorphi, Mustelidae, Squamata, Rodentia, Didelphimorphia, Chiroptera

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Secreção, Fezes, Sangue, Ectoparasita
2	Amostras biológicas (Aves)	Ectoparasita, Fezes, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue, Fragmento de tecido/órgão, Penas
3	Amostras biológicas (Camívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes, Pêlo, Sangue, Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão
4	Amostras biológicas (Mamíferos Aquáticos: cetáceos, sirênios e pinípedes)	Ectoparasita, Fezes, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Pêlo, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
5	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue, Secreção, Fezes, Pêlo
6	Amostras biológicas (Peixes)	Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão, Escama, Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fezes
7	Amostras biológicas (Primates)	Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão, Fezes, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue
8	Amostras biológicas (Répteis)	Fragmento de tecido/órgão, Ectoparasita, Fezes, Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Secreção, Sangue
9	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual, Puçã, Armadilha de queda "pit fall"
10	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina, Puçã
11	Método de captura/coleta (Camívoros)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman")

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17393534



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39285-2	Data da Emissão: 31/08/2014 15:28	Data para Revalidação*: 30/09/2015
------------------------	--	---

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: WASHINGTON LUIZ ASSUNÇÃO PEREIRA	CPF: 220.629.201-72
Título do Projeto: Estudos de doenças infecciosas e parasitárias em animais silvestres no Estado do Pará: as inter-relações fauna-saúde-doença	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

12	Método de captura/coleta (Mamíferos Aquáticos: cetáceos, sirênios e pinípedes)	Captura manual
13	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Puçá, Armadilha de queda "pit fall"
14	Método de captura/coleta (Peixes)	Anzol e linha (op. manual); linha de mão, de curso, carretilha, molinete, corrico, vara e isca viva, Rede de arrasto de meia-água (tração motorizada), Tarrafa, Draga, pegador (Van veen, Box corer, Holme, Petersen, etc.)
15	Método de captura/coleta (Primatas)	Puçá, Captura manual
16	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha de queda "pit fall", Puçá, Coleta manual
17	Método de marcação (Anfíbios)	Ablação de artelhos
18	Método de marcação (Aves)	Corantes, Etiquetas de asa
19	Método de marcação (Carnívoros)	Descoloração de pêlos, Colar, Brinco
20	Método de marcação (Mamíferos Aquáticos: cetáceos, sirênios e pinípedes)	Foto-identificação
21	Método de marcação (Outros mamíferos)	Tatuagem (por compressão), Descoloração de pêlos, Foto-identificação
22	Método de marcação (Peixes)	Outros métodos de marcação (picote nadadeira)
23	Método de marcação (Primatas)	Microchip, Tatuagem
24	Método de marcação (Répteis)	Outros métodos de marcação (picote orelha)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZONIA	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17393534



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39285-2	Data da Emissão: 31/08/2014 15:28	Data para Revalidação*: 30/09/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: WASHINGTON LUIZ ASSUNÇÃO PEREIRA	CPF: 220.629.201-72
Título do Projeto: Estudos de doenças infecciosas e parasitárias em animais silvestres no Estado do Pará: as inter-relações fauna-saúde-doença	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 17393534



Página 4/4

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

ATESTADO

Protocolo 034/2014 (CEUA) – 23084.022512/2014-18 (UFRA)

Título do Projeto/Plano de Aulas: **Estudo de doenças infecciosas e parasitárias em animais silvestres de cativeiro no Estado do Pará: as inter-relações fauna-saúde-doença.**

Docente/Pesquisador Responsável: **Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira**

Instituição: UFRA – Belém

Data do Parecer: 23 de Fevereiro de 2015.

PARECER

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRA apreciou o protocolo acima e verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794/2008, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega nesta CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 24 de fevereiro de 2015.

Prof.ª, MSc. Maria Cristina Manno
Vice-Coordenadora CEUA/UFRA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Bairro Montese, Belém – PA. CEP: 66.077-901
Contatos: (1)3210-5165 ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua

