



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

KELLY CRISTINY GOMES DA PAIXÃO ALBUQUERQUE

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Chlamydia* sp. EM POMBOS DOMÉSTICOS
DE VIDA LIVRE (*Columba livia*), CAPTURADOS NO PARQUE ECOLÓGICO
MANGAL DAS GARÇAS, EM BELÉM-PA**

BELÉM-PA
2020

KELLY CRISTINY GOMES DA PAIXÃO ALBUQUERQUE

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Chlamydia* sp. EM POMBOS DOMÉSTICOS
DE VIDA LIVRE (*Columba livia*), CAPTURADOS NO PARQUE ECOLÓGICO
MANGAL DAS GARÇAS, EM BELÉM-PA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional – MACPRO, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb

Co-orientador: Dr. Sandro Patroca da Silva

BELÉM-PA
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A345d Albuquerque, Kelly Cristiny Gomes da Paixão Albuquerque.
DIAGNÓSTICO MOLÉCULAR DE Chlamydia sp. EM
POMBOS DOMÉSTICOS DE VIDA LIVRE (Columba livia),
CAPTURADOS NO PARQUE ECOLÓGICO MANGAL DAS
GARÇAS, EM BELÉM-PA / Kelly Cristiny Gomes da Paixão
Albuquerque. — 2020.
49 f. : il.

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb Casseb
Coorientador(a): Prof. Dr. Sandro Patroca da Silva
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Análises Clínicas, Belém, 2020.

1. Chamydia psittaci, pombos, semi-nested PCR. I. Título.

CDD 610

KELLY CRISTINY GOMES DA PAIXÃO ALBUQUERQUE

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Chlamydia* sp. EM POMBOS DOMÉSTICOS DE VIDA LIVRE (*Columba livia*), CAPTURADOS NO PARQUE ECOLÓGICO MANGAL DAS GARÇAS, EM BELÉM-PA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb

Laboratório de Microbiologia-ISPA/UFRA

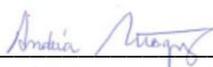
Co-orientador: Dr. Sandro Patroca da Silva

Bolsista de Produção Científica Instituto Evandro Chagas-IEC

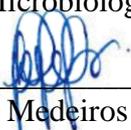
DATA DA AVALIAÇÃO: 20/10/2020.

CONCEITO: APROVADO

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Andréa Maria Góes Negrão
Laboratório de Microbiologia ISPA/UFRA



Prof. Dra. Livia Medeiros Neves Casseb
Pesquisadora do Instituto Evandro Chagas



Prof. Dr. René Silva
Universidade Federal do Pará



Prof. Dra. Conceição de Maria Almeida Vieira
Laboratório de Microbiologia ISPA/UFRA

Belém-PA, 20 de outubro de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, dedico.

EPÍGRAFE

“Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei, se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar, mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Agradeço às instituições e seus colaboradores, os quais deram apoio à realização deste estudo: UFRA, IEC e UFPa.

Ao meu orientador, Professor Casseb, pela orientação, paciência e compreensão, os quais foram muitos importantes para eu não desistir.

Ao meu Co-orientador, Dr. Sandro Patroca, pela paciência de me ensinar e repetir quantas vezes eu precisei aquilo que eu tinha (e tenho) dificuldade para entender.

À Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz e ao Dr. Pedro Fernando Costa Vasconcelos.

À Dra, Lívia Casseb, pelas preciosas contribuições, a ela, sou muito grata.

À Bruna Alves pela gentil co-participação neste estudo.

À amiga, Fernanda Martins (Fernandinha) pela disposição em me ajudar sempre.

A todos os colegas estagiários do Laboratório de Microbiologia ISPA/UFRA e do Laboratório de Biologia Molecular-Seção de Arbovirulogia e Febres Hemorrágicas/IEC.

À Isaura (colaboradora do LabMicro ISPA/UFRA) pela cortesia e gentileza, os sorrisos de “Bom dia”, os quais, muitas vezes, me impulsionaram.

Aos meus priminhos, Evelyn, Heitor e Saulo pelos momentos de alegria muito especiais que, muitas vezes, me renovaram.

Ao meu primo, Thales, pelo abraço e apoio de sempre.

Aos tios Margarida, Luciana, David e Andreza pelos conselhos, palavras de apoio e por sempre me receberem com carinho e cuidado.

À amiga, Emanuelle de Argôlo pelo incentivo, apoio e a generosa colaboração.

Aos amigos e colegas de trabalho, Cléo Leal carvalho e Agnaldo Barbosa pelo apoio e incentivo.

A todos os meus amigos pelos momentos de descontração reparadores da alma.

Ao meu esposo, Fábio Albuquerque, pelo carinho e paciência infinita.

Aos meus queridos, Simone Platino e Dr. Moisés Carvalho por cuidarem de mim.

Ao meus pais, Nailton e Maria da Conceição pelo amor e dedicação da vida toda.

A todos, a minha imensa gratidão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE POMBOS DOMÉSTICOS <i>Columba livia</i>	8
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE CLAMIDIOSE	8
2.3 ETIOLOGIA DA CLAMIDIOSE	9
2.4 EPIDEMIOLOGIA	10
2.5 SINAIS CLÍNICOS.....	11
2.6 DIAGNÓSTICO	12
2.7 BIOSSEGURANÇA	14
2.8 SAÚDE PÚBLICA.....	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 AMOSTRAS PARA PCR.....	17
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA.....	17
4.3 APLICAÇÃO DA <i>Semi-Nested</i> PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE <i>Chlamydia</i> sp.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS	24
8. ANEXOS.....	34

RESUMO

A inserção dos pombos, no Brasil, data de meados do século XVI, desde então, a aproximação destas aves com pessoas, seja por estimação seja por contato eventual nos centros urbanos, vem possibilitando a transmissão de diversos patógenos zoonóticos, entre eles, estão as bactérias do gênero *Chlamydia*. Dentro desse gênero, a *Chlamydia psittaci* é a espécie mais relacionada a infecção em aves e tem ocorrência frequentemente relatada em pombos, essa bactéria pode causar pneumonia grave em humanos. No entanto, a não comunicação aos órgãos de saúde da ocorrência de casos tanto em pombos como em humanos ocorre devido à falta de um diagnóstico preciso e eficaz, uma vez que, não se trata de uma doença de notificação obrigatória em ambas as espécies e ainda é uma enfermidade pouco conhecida pela população geral. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar a presença de *C. psittaci* em fezes e amostras de pulmão de pombos domésticos oriundos de Belém do Pará, através do diagnóstico molecular, pela *semi-nested* PCR, e estabelecer um protocolo diagnóstico a ser seguido na rotina do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto da Saúde e Produção Animal- ISPA, da Universidade Federal Rural da Amazonia-UFRA. Foram analisados 45 espécimes de pombos, dos quais 10 (22,2%) tiveram diagnóstico positivo para *C. psittaci*. Assim, estes resultados apontam que os pombos podem ser reservatórios e, em comparação com outros trabalhos, evidencia a importância de maiores investigações a fim de esclarecerem a dinâmica epidemiológica da doença e definir adoção de medidas de controle.

Palavras-chave: *Chlamydia psittaci*, pombos, *semi-nested* PCR.

ABSTRACT

The insertion of pigeons in Brazil, dating from the mid-16th century, since then, the approximation of these birds to people, whether by estimation or by occasional contact in urban centers, has enabled the transmission of several zoonotic pathogens, among them, are the bacteria of the *Chlamydia* genus. Within this genus, *Chlamydia psittaci* is the species most related to infection in birds and has an occurrence frequently reported in pigeons, this bacterium can cause severe pneumonia in humans. However, the failure to notify the health agencies of the occurrence of cases in both pigeons and humans is due to the lack of an accurate and effective diagnosis, since it is not a disease of mandatory notification in both species and yet it is a disease little known by the general population. Thus, the objective of this work was to identify the presence of *C. psittaci* in faeces and lung samples from domestic pigeons from Belém do Pará, through molecular diagnosis, by semi-nested PCR, and establish a diagnostic protocol to be followed in the routine of the Microbiology and Immunology Laboratory of the Institute of Health and Animal Production- ISPA, from the Federal Rural University of Amazonia-UFRA. 45 pigeon specimens were analyzed, of which 10 (22.2%) had a positive diagnosis for *C. psittaci*. Thus, these results indicate that pigeons can be reservoirs and, in comparison with other studies, it highlights the importance of further investigations in order to clarify the epidemiological dynamics of the disease and define the adoption of control measures.

Keywords: *Chlamydia psittaci*, pigeons, semi-nested PCR.

1. INTRODUÇÃO

O pombo doméstico (*Columba livia*), tem origem na Europa e foi introduzido no Brasil em meados do século XVI como ave doméstica (Sick, 2001). Adaptou-se facilmente à vida na cidade e ao convívio com humanos devido à facilidade de encontrar alimento e abrigo (Martins et al., 2015), entretanto eles podem estar associados a grandes prejuízos à população devido ao acúmulo de fezes, penas e ninhos, o qual favorece o entupimento de tubulações de drenagem das águas pluviais e apodrecimento de forros e telhados (Nunes, 2003).

Além disso, as doenças aviárias de caráter zoonótico tem sido motivo de preocupação para as autoridades sanitárias, porque o contato dessas aves com as pessoas é cada vez mais próximo, o que facilita a transmissão de diversos patógenos. Desta forma, doenças aviárias comuns, como a Clamidiose, possuem prevalência desconhecida, devido ao seu diagnóstico definitivo ser difícil em virtude da complexa fisiopatologia da infecção por *Chlamydia psittaci* (Raso, 2004).

Os casos de *C. psittaci* são subestimados, principalmente, em devido à ausência de testes e reagente comerciais padronizados, além de não ser uma doença de notificação obrigatória no Brasil (Raso et al., 2004; PROENÇA et al., 2011).

No estado do Pará, ainda são discretos os estudos acerca da epidemiologia da Clamidiose tanto em aves quanto em humanos. Assim, a dificuldade e a demora em reconhecer e tratar a enfermidade adicionado ao fato de não existirem políticas pública eficazes no controle da população de pombos nas grandes cidades, bem como o desconhecimento da população sobre a doença são considerados fatores de risco em pacientes humanos (Moschioni et al., 2001; Petrovay e Balla, 2008).

Diante do exposto e considerando, ainda, a falta conhecimento da população em geral sobre a doença, o desenvolvimento deste estudo se justifica pela necessidade de se compreender melhor a dinâmica epidemiológica da doença a fim de colaborar com a implementação de medidas de controle e de métodos de diagnóstico.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE POMBOS DOMÉSTICOS *Columba livia*

Os pombos (*Columba livia*) podem estar infectados com muitos organismos, dessa forma, são considerados uma ameaça para a saúde pública por serem reservatórios de pelo menos 70 diferentes microrganismos patogênicos para os humanos (Carrasco et al., 2011; Mancera et al., 2013; SILVA et al., 2014; Vaz et al., 2017; Alkharigy et al., 2018).

Portanto, devido ao hábito de se alimentarem no chão e pousarem em locais elevados, os pombos precisam deslocar-se constantemente de ponto de pouso até uma região inferior, onde se alimentam. Para isso, precisam voar e o bater das asas favorece a suspensão de partículas secas como fezes possibilitando a disseminação de agentes patogênicos existentes nas fezes dos animais (Schuller, 2003).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE CLAMIDIOSE

A Clamidiose é considerada uma das principais doenças infecciosas que acometem as aves da Ordem Psittaciforme. As aves são os hospedeiros primários de *C. psittaci* (Andersene Franson, 2007) e uma ampla variedade de espécies aviárias é susceptível à infecção (Kaleta e Taday, 2003). Além de acometer aves, esta bactéria também é reconhecida como um agente etiológico de pneumonia atípica grave em humanos e outros mamíferos (Lin et al., 2019).

Em geral, as aves infectadas, mesmo sem apresentar sinais clínicos da doença, podem eliminar o microrganismo nos excrementos de forma intermitente por longos períodos. Conseqüentemente, contaminam o meio ambiente e auxiliam na propagação do agente para outras aves e/ou humanos (Alkharigy et al., 2018). Assim, a Clamidiose é considerada uma das zoonoses mais importante transmitida por aves e os psitaciformes, os columbiformes e perus são as principais fontes de doenças humanas (Kaleta e Taday 2003; Casagrande et al., 2014).

A transmissão de *C. psittaci* entre espécies aviárias ocorre principalmente a partir de uma ave infectada para outra ave suscetível nas proximidades. O agente é excretado nas fezes e descargas nasais. A excreção fecal pode ser ativada por estresse causado por deficiências nutricionais, transporte prolongado, superlotação, oscilação da temperatura durante a reprodução, postura de ovos, e manuseio. Períodos de excreção bacteriana durante a infecção natural podem variar dependendo da dose de infecção, e do estado imunitário do hospedeiro, além da virulência da cepa (Raso et al., 2013).

2.3 ETIOLOGIA DA CLAMIDIOSE

O gênero *Chlamydia* atualmente inclui 11 espécies: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. abortus*, *C. felis*, *C. caviae*, *C. pecorum*, *C. avium*, *C. gallinaceae* e, finalmente, *C. psittaci*. Destas espécies, *C. abortus* ocasionalmente infecta aves, enquanto *C. psittaci*, e, atualmente, também as novas espécies descobertas, *C. avium* e *C. gallinacea* são frequentemente encontrados em pássaros. Diante disso, a etiologia da clamidiose aviária foi revisada recentemente, uma vez que, em teoria, *C. psittaci* pode não ser o único agente causador, pois, dependendo do hospedeiro aviário, duas espécies adicionais de *Chlamydia* sp. podem ser encontradas em aves (Sachse e Laroucau, 2015).

Na abordagem veterinária, destaca-se *C. psittaci* como a espécie mais predominante e mais patogênica. Esta espécie possui nove genótipos diferentes identificados pela análise de proteínas de membrana (MOMP), sendo sete genótipos isolados de aves de várias espécies e dois isolados de mamíferos (Lent et al., 2012).

A membrana de *C. psittaci* apresenta estrutura comum à de bactérias gram-negativas, contendo fosfolipídeos, lipídeos, lipopolissacarídeos e proteínas. No seu ciclo biológico, há duas fases distintas de crescimento (intracelular e extracelular), apresentando morfologia e funcionalidades diferentes em ambas as fases (Francisco e Troncarelli, 2017).

Na fase extracelular, o microrganismo é denominado corpo elementar, e apresenta aspecto esférico e denso, com multiplicação por fissão binária. Já na fase intracelular, o agente é denominado corpo reticular, e possui morfologia oval, com parede celular flexível e fina. Como é metabolicamente inativo e incapaz de produzir ATP, a bactéria utiliza recursos da célula hospedeira para obter energia (Francisco e Troncarelli, 2017).

Dessa forma, a replicação ocorre dentro de um vacúolo não acidificado, denominado vacúolo de inclusão. Uma vez no interior do vacúolo de inclusão, *C. psittaci* passa por um ciclo de desenvolvimento alternado bifásico único entre o corpo elementar (CE), o qual garante a sobrevivência extracelular e infecção de células hospedeiras e o corpo reticular (CR), que é responsável pela replicação e geração intracelular de bactérias infecciosas progenitoras. Para a entrada na célula hospedeira, o CE se expande para formar o CR, a forma metabolicamente ativa intracelular (figura1).

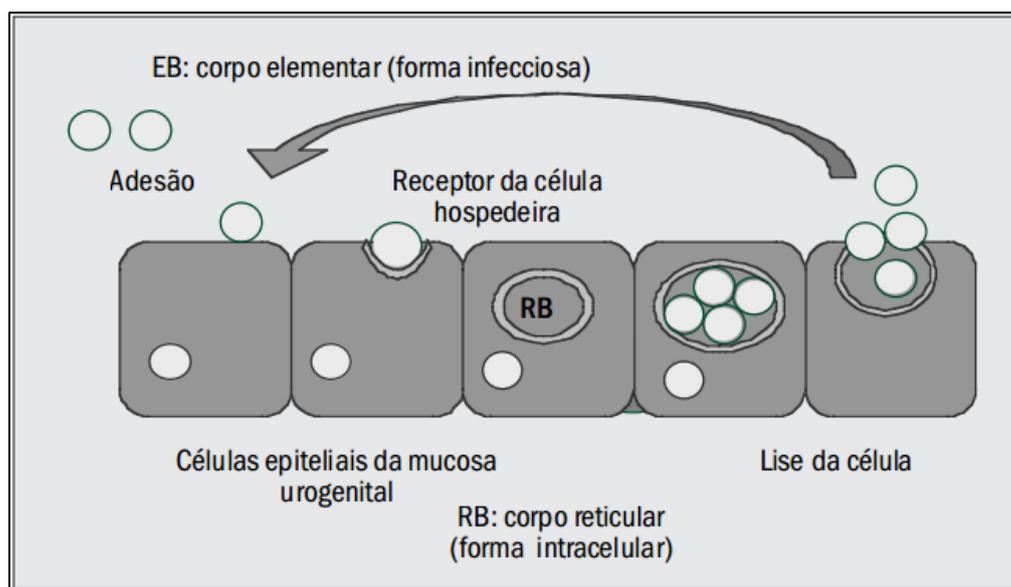


Figura 1. Ciclo biológico esquemático de *Chlamydia* sp. (Seadi et al., 2002)

A diferenciação de CE em CR é acompanhada pela dispersão da cromatina para tornar a bactéria transcricionalmente ativa. O CR é maior, de aproximadamente 0,0-1,5 μ m de diâmetro (Raso, 2014).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A *C. psittaci* pode ser encontrada em todos os continentes e tem sido reconhecida desde 1929, quando foram registrados cerca de 800 casos de pneumonias na América do Norte e Europa, a origem do surto foi rastreada até papagaios importados da Argentina. (Olsen et al., 1998; Andersen e Vanrompay, 2003).

O termo psitacose reflete a crença inicial de que a doença humana é adquirida exclusivamente a partir de psitacídeos. No entanto, durante os estudos de pneumonias frequentemente fatais nas Ilhas de Faroé, foi isolado *C. psittaci* tanto de aves marinhas, como o fulmar-glacial (*Fulmarus glacialis*), quanto das pessoas de Faroé. Desde então, *C. psittaci* foi isolado a partir de cerca de 140 espécies diferentes de aves (Burkhart e Page, 1971).

A Clamidiose tem sido observada em todo o mundo, a doença ocorre esporadicamente ou em surtos, relacionados a lojas de animais, parques de aves, instalações veterinárias e bandos de aves (Gaede et al., 2008; De Boeck et al., 2016)

A transmissão direta da Clamidiose pessoa a pessoa é possível, mas acredita-se ser rara (Hughes et al., 1997; Ito et al., 2002). Casos esporádicos de infecções por *Chlamydia* sp. foram relatados em répteis, crocodilos, bovinos, ovinos, suínos, cervídeos e cães

(Song et al., 2009; Sprague et al., 2009; Robertson et al., 2010; Schauttet e Vanrompay, 2011; Di Francesco et al., 2012).

Clamidiose aviária foi verificada em várias espécies de aves na Europa, acometendo particularmente columbiformes (Ordem Columbiformes), tais como as pombas colarinho (*Streptopelia decaocto*), pombos domésticos (*Columba livia*), e pombos madeira (*Columba palumbus*) (Bracewell e Bevan, 1986). Contudo, as aves mais estudadas e, por isso, citadas como de maior importância na epidemiologia da Clamidiose são os Psittaciformes e os Columbiformes (Bonello, 2003; Kaleta e Taday, 2003).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

Chlamydia psittaci é um patógeno aviário capaz de causar doença debilitante sistêmica em aves selvagens e espécies de produção como galinhas e patos (Knittler e Sachse, 2015). Além disso, em aves, os pais podem transmitir a infecção para a prole via regurgitação, causando assim a clamidiose crônica. A apresentação clínica da infecção em pássaros pode cursar com conjuntivite, rinite, e blefarite, pneumonia e distúrbios gastrointestinais. Aves infectadas frequentemente disseminam a bactéria por meio de descargas fecais ou nasais, o que representa risco sério de transmissão zoonótica por meio da inalação de gotículas de ar infecciosas ou poeira partícula (Andersen, 1996; Harkinezhad et al., 2009;). Isso leva a sintomas em humanos, como febre, calafrios, dor de cabeça, mialgia, e mal-estar com ou sem sintomas respiratórios (Beeckman e Vanrompay, 2009).

A Clamidiose provoca diversos sinais clínicos em seres humanos os quais vão desde infecção assintomática ou doenças leves a comprometimentos respiratórios graves, que, em alguns casos, podem ser fatais (Smith et al., 2011). Dentre os sintomas comuns em humanos, estão o início abrupto de febre, calafrios, dor de cabeça, mal-estar, mialgia, não produtivo tosse e dispnéia. Outras complicações incluem pericardite, endocardite ou miocardite, hepatomegalia e esplenomegalia. Casos fatais tornaram-se extremamente raros (cerca de 5%) desde o advento dos antibióticos (West, 2011). Contudo, se os primeiros sinais respiratórios superiores associados à Clamidiose não são tratados, podem progredir com doenças graves ou mesmo a morte. Casos humanos de infecção podem ocorrer por meio da inalação de aerossóis contaminados originários da urina, fezes ou outras excreções de aves infectadas (Hogerwerf et al., 2017). Contudo, o risco de ocorrência da doença não está associado apenas ao contato direto com os pássaros, mas

também é pertinente ao ambiente rural e às atividades de jardinagem (Szymanska-Czerwinska e NIEMCZUK, 2016).

As características distintas e únicas deste patógeno zoonótico de aves e mamíferos incluem o curso fulminante da doença clínica, a gama de hospedeiros notavelmente ampla e a alta proporção de infecções latentes que não estão levando à doença evidente. O conhecimento atual sobre as doenças associadas é bastante pobre, mesmo em comparação com outros agentes de clamídia (Knittler et al., 2014)

2.6 DIAGNÓSTICO

Em virtude da grande dificuldade de realizar cultura e isolamento da bactéria, foram desenvolvidas outras técnicas de diagnóstico. Há duas principais abordagens para o diagnóstico de uma infecção por *Chlamydia* sp. a detecção direta pela identificação da bactéria ou material genético e a indireta através de anticorpos anti-*Chlamydia* sp. (Sachse et al., 2009; Balsamo, 2017).

O teste de ELISA foi primeiramente desenvolvido para a detecção de *Chlamydia trachomatis* em humanos. No entanto, como se baseia no antígeno LPS da membrana clamidial, em teoria, é também aplicável à infecção em animais. Os testes de fluorescência são baseados nos antígenos MOMP e LPS da membrana da bactéria (Sachse et al., 2009; Sachse e Laroucau, 2015; Balsamo, 2017).

A partir de 1980, o protocolo de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por Clamídia, por ser mais rápida e sensível e por não depender da viabilidade da amostra. Estas técnicas detectam com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas em virtude de amplificarem pequenos fragmentos de DNA nas amostras, em um processo conhecido como Reação em Cadeia da Polymerase (PCR). A PCR é um processo, o qual consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de iniciadores de uma sequência de DNA alvo, os quais determinam a especificidade da técnica. (Quinn et al., 1996; Kritski et al., 1997).

A especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR dependem dos iniciadores utilizados, da técnica de referência, do tipo de material, da população a ser analisada, da preparação da amostra e do método de detecção do produto amplificado, considerando-se a presença de inibidores (Mahony et al., 1998; Toye et al., 1998).

Para identificar a presença de inibidores na amostra é necessário introduzir-se na reação controles de amplificação (Gaydos et al., 1998; Puolakkainen et al., 1998).

Recursos para detectar inibição, tais como repetição da PCR em amostras diluídas e reação em duplicata, contaminando propositalmente uma das amostras, não são adequados para serem introduzidos na rotina de laboratórios clínicos (Schachter e Stamm, 1999).

A sensibilidade dos vários sistemas de detecção de *Chlamydia* sp. pode ser determinada pela verificação da quantidade mínima de células infectadas com as sorovariedades mais frequentes, que, em diluições seriadas obtidas de suspensões de cultura, ainda produzem sinal de amplificação de DNA. Para aumentar a sensibilidade, pode-se utilizar o recurso da reação de *nested*-PCR, a qual também pode ser útil como teste confirmatório do PCR plasmidial (Lan et al., 1993), porém aumenta o risco para resultado falso-positivo devido à facilidade de contaminação das reações negativas pelas positivas.

Outra importante vantagem do emprego da reação de PCR é a genotipagem, que pode ser realizada por *restriction fragmente length polymorphism* (RFLP) ou por sequenciamento de nucleotídeos direto da amostra clínica submetida a reações de amplificação do gene MOMP, diferente da sorotipagem, que é realizada a partir de cultura seguida de aplicação de um painel de anticorpos monoclonais (Morré et al., 2000).

O diagnóstico por detecção do ácido nucleico, por meio da PCR, com sequências específicas para detecção do agente etiológico, é o único método comercial disponível para diagnóstico de *C. psittaci* no país, apresentando alta sensibilidade e especificidade. O material a ser colhido dependerá da técnica utilizada pelo laboratório de escolha. Amostras de fezes, swabes de cloaca ou de orofaringe são as mais utilizadas (Raso, 2004).

A extensa variedade de espécies hospedeiras persistentes e de portadores inaparentes dificultam a eficácia das medidas no controle da doença (Raso, 2007).

Como não há vacina disponível, o controle e prevenção da Clamidiose são baseados em práticas adequadas de biossegurança que visam controlar a introdução e propagação do agente etiológico. Medidas de limpeza e desinfecção do ambiente e de utensílios, isolamento e tratamento das aves infectadas, quarentena, manejo nutricional e sanitário adequados, destino correto das carcaças e dejetos contaminados e o vazio sanitário realizado como medidas fundamentais para prevenir a disseminação do agente (Raso, 2007).

Apesar de existirem estudos experimentais demonstrando uma boa proteção induzida pela vacina em perus, ainda não há vacina comercial para Clamidiose em aves (Vanrompay et al., 1999; Zhou et al., 2007; Verminnen, et al., 2010).

Nos Estados Unidos da América, diferentemente do Brasil, a Clamidiose aviária é uma doença de notificação obrigatória aos órgãos de saúde pública. Recomendações de prevenção, controle e tratamento para a doença disponibilizadas por meio de compêndio, a fim de orientar o médico veterinário nas ações a serem tomadas de acordo com cada caso. O compêndio também possui um roteiro para a definição de casos clínicos, levando em consideração as dificuldades diagnósticas inerentes à complexa fisiopatologia da infecção pela bactéria (Balsamo et al., 2017).

2.7 BIOSSEGURANÇA

Devido ao potencial zoonótico da Clamidiose, assim como, da existência de portadores assintomáticos, ausência de sinais clínicos evidentes, das dificuldades de se ter um diagnóstico definitivo, ausência de testes comerciais específicos para a doença, práticas de biossegurança específicas são necessárias para controlar a introdução e disseminação do agente etiológico em empreendimentos avícolas, em locais com aves em cativeiro e de vida livre (Khan, 2006; Proença et al., 2011). No Brasil, conforme o Ministério da Saúde, o conceito de biossegurança tem sido associado à perspectiva de integração da saúde humana, saúde animal e meio ambiente, a saúde única

Com o exposto, observa-se que *Chlamydia* sp., pela inserção transversal no contexto de saúde única ou “*One Health*”, proposto já na década de 90, remete à estratégias interdisciplinares nas áreas de saúde animal, humana e ambiental de promoção à saúde, em que a saúde humana, saúde dos animais domésticos e de vida selvagem são interdependentes e vinculadas à saúde da fauna, flora e ao ambiente, no qual nós também estamos inseridos, para que possam ser construídos sistemas de vigilância e resposta as mudanças ambientais e as doenças zoonóticas emergentes, as quais podem levar a pandemias ou mortalidades (humana ou animal) (Gibbs, 2014; Nguyen-Viet et al., 2017).

Considerando o alto risco individual na manipulação, o moderado risco para comunidade e meio ambiente, a bactéria *Chlamydia psittaci* está incluída no grupo de patógenos de classificação de risco 3. O nível de biossegurança do laboratório é definido, na maioria das vezes, de acordo com a classificação de risco do patógeno. No entanto, para manipulação de *C. psittaci*, utilizando os EPIs recomendados (jaleco, luvas, óculos e máscara) é possível realizar em laboratório com nível de biossegurança 2 (NB2) (Brasil, 2017).

2.8 SAÚDE PÚBLICA

A Clamidiose em humanos representa uma das principais zoonoses de origem aviária e sua ocorrência está geralmente relacionada ao risco ocupacional ou cultural daqueles que trabalham diretamente com aves (Saito et al., 2005; Laroucau et al., 2009; Dickx et al., 2010; Raso et al., 2010) ou pessoas que criam aves de estimação (Cipriano et al., 2019).

Devido às dificuldades em se estabelecer um diagnóstico e por falta de comunicação aos órgãos competentes, não há dados oficiais sobre a ocorrência da Clamidiose na maioria dos países. Suspeita-se que casos de Clamidiose humana podem não estar sendo reconhecidos, em vista dos sintomas respiratórios serem semelhantes a uma virose respiratória sazonal e outros resultarem em infecções assintomáticas (Petrovay e Balla, 2008; Harkinezhad et al., 2009).

A maioria dos pacientes com pneumonia é tratada na atenção primária, em geral profissionais e diretrizes profissionais atuais não recomenda testes microbianos para pacientes com quadro moderada a grave e, portanto, os pacientes são tratados, mas o agente causador permanece desconhecido (Raeven et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar a presença de *C. psittaci*. em amostras fezes e amostras de pulmão de pombos domésticos oriundos de Belém do Pará.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência de *C. psittaci*. em fezes e amostras de pulmão de pombos domésticos;
- Estabelecer Procedimento Operacional Padrão (POP) para rotina diagnóstica no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Instituto da Saúde e Produção Animal-ISPA, da Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS PARA PCR

Para este estudo foram utilizadas amostras de tecido pulmonar e amostras de fezes, de pombos domésticos gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia-ISPA/UFRA, conforme autorização em anexo.

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA

Para a extração do material genético bacteriano das amostras de pulmão, foram utilizados 10 mg de tecido pulmonar de cada ave adicionados de 1 mL de solução tampão de lise proveniente do kit de extração iPrepTMChargeSwith gDNA Tissue Kit, (InvitrogenTM), e macerados em agitador Tissue Lyser II (Quiagen Ltd.) a 25 Hz/5 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo individual, onde foram adicionados 10µL de RNase, com posterior incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, e 20 µL de proteinase K. Após isso, os tubos foram incubados a 55 °C/1 hora. A purificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit iPrepTM gDNA Tissue (InvitrogenTM) e equipamento iPrepTMInstrument, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de fezes foram agitadas durante 2 minutos e depois centrifugadas a 20.000xg durante 30 min a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 40µL de tampão (0.1 M NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA; 5% Triton x 100) e 9U de proteinase K (Invitrogen, EUA), em seguida, foram incubadas a 56°C, durante 90 min e em seguida foi centrifugado a 2000xg durante 2 min. A extração de DNA foi realizada a partir do sobrenadante utilizando GFX Genomic DNA Purification Kit de sangue (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi feita com Qubit dsDNA HS Assay kit 500 assays Invitrogen Life Technologies

4.3 APLICAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Chlamydia* sp.

Foram utilizados iniciadores que flanqueiam o gene MOMP, o qual é conservado na família Chlamydiaceae (BUXTON *et al.*, 1996) para a reação de PCR.

Na primeira reação foram utilizados os iniciadores A (5'CAGGATATCTTGTCTGGCTTTAA3') e B (5'GCAAGGATCGCAAGGATC3').

Para cada amostra, foram utilizados 15,15 μL de água ultra pura, 2,5 μL de PCR Buffer minus mixture Mg_2 , 0,5 μL de dNTP mixture a 10 mM, 0,75 μL de MgCl_2 a 50 mM, 0,5 μL da solução a 10 μM contendo o iniciador A, 0,5 μL da solução a 10 μM contendo o iniciador B, 0,1 μL de Taq DNA polimerase e 5 μL da solução resultante da extração de DNA da amostra, compondo 25 μL de volume final. Esta reação produziu um fragmento de 260 pb na PCR. Na segunda reação, seguiu-se de forma semelhante à primeira, exceto que, em vez de adicionar 5 μL amostra de DNA, foram adicionados 5 μL do produto amplificado na primeira reação e, em substituição aos iniciadores A e B respectivamente, utilizou-se os iniciadores B (5'GCAAGGATCGCAAGGATC3') e C (5'TTAGAGGTGAGTATGAAAAACTC3'), os quais amplificaram um fragmento de 165 pb na *semi-nested* PCR.

Condições dos ciclos de PCR foram 10 min a 94°C; 34 ciclos a 94°C durante 1 min, 52°C durante 1 min e 72°C durante 1 min; e uma extensão final a 72°C durante 4 min.. Amostras de controle positivas e negativas foram incluídos em cada série, sendo as duas reações de PCR submetidas às mesmas condições de tempo, temperatura e número de ciclos. Como controle positivo, foi utilizada a vacina comercial Nobivac® Feline 1-HCPCh+FeLV e o controle negativo foi feito utilizando água ultrapura. Os produtos da *semi-nested* PCR foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2% corado com Sybr® Safe e visualizado sob luz ultravioleta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise molecular para C. psittaci:

Foram analisadas amostras de 45 pombos domésticos (*Columba livia*, das quais 5 (11,1%) das amostras de fezes e 5 (11,1%) das amostras de pulmão tiveram resultado positivo na *semi-nested* PCR para *C. psittaci*, totalizando 10 (22,2%) de amostras positivas, uma vez que, não houve coincidência de positivities entre amostras de fezes e pulmão. Nenhuma ave positiva apresentou sinais característicos de Clamidiose durante a avaliação clínica.

A presença de cepas virulentas de *C. psittaci* associadas a condições de estresse tais como: superpopulação, período reprodutivo, carência nutricional, migração e alterações ambientais bruscas são fatores que favorecem a manifestação clínica da Clamidiose em pombos domésticos, podendo também ativar a eliminação intermitente do agente infeccioso nas fezes (SALINAS *et al.*, 1993; HARKINEZHAD *et al.*, 2009; PROENÇA *et al.*, 2011; BALSAMO *et al.*, 2017) e favorecer a infecção em humanos. Dessa forma, os nossos resultados confirmam a possibilidade de contaminação ambiental e risco de infecção para humanos visto que as aves deste estudo, por serem de vida livre, possivelmente, foram submetidas a um ou mais fatores de estresse e, assim, foi a tívada a eliminação da bactéria via fezes.

Geigenfeind *et al.* (2012) em suas pesquisas sobre a prevalência de *C. psittaci* em populações de pombos de vida livre na Suíça, detectaram a presença da bactéria em fezes de aves jovens e adultas, demonstrando que esses animais podem eliminar o agente etiológico no ambiente durante toda a vida. Kaleta e Taday (2003) descrevem que a principal via de transmissão da *C. psittaci* entre aves é a horizontal, isto é, por meio da inalação de aerossóis liberados nas secreções e fezes ressecadas, pó de pena e carcaças contaminadas.

Porém, a transmissão vertical da fêmea para o ovo, com nascimento de filhotes contaminados, pode ocorrer eventualmente. De certo modo, aves adultas apresentam muito mais chances de entrarem em contato com *C. psittaci* presente no ambiente que as aves jovens, uma vez que apresentam ampla capacidade de vôo e estão frequentemente em contato direto com outras aves, mamíferos e humanos (Wang *et al.*, 2018).

Diversos estudos descrevem a ocorrência de *C. psittaci* em psitacídeos mantidos em cativeiro em vários países. No Brasil, estudo realizado em 2002 investigando a infecção por *C. psittaci* em 20 psitacídeos do gênero *Amazona* criados em cativeiro nos

estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, reportou uma prevalência média entre os Estados de 35,8% (34/95) e 77,3% (34/44) utilizando a imunofluorescência direta (IFD) e o dot-blot ELISA, respectivamente (Raso et al., 2002).

Em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) provenientes de aviários privados no Estado de São Paulo, um estudo demonstrou a presença de *C. psittaci* em 90,6% (29/32) e 53,1% (17/32) das amostras de swabes cloacais e de sangue, respectivamente, analisadas pela técnica de PCR (Raso et al., 2011). Ecco et al. (2009) descreveram um surto de clamidiose em psitacídeos apreendidos do tráfico ilegal e mantidos no CETAS no Estado de Minas Gerais.

Os pombos de vida livre são a segunda categoria de aves mais estudada e mais incriminada como fonte de infecção para humanos, em vista do estreito convívio com o homem e com aves domesticadas nas áreas urbanas (Kaleta e Taday, 2003).

Estudo realizado em parques de aves no Japão observou casos de Psitacose em 12 visitantes, além de três trabalhadores e dois estudantes que lidavam com as aves do parque. Os funcionários que entraram em contato com aves doentes ou suspeitas sem qualquer proteção apresentaram um risco maior de infecção por *C. psittaci*, além disso, apenas 38% dos trabalhadores tinham conhecimento sobre a Clamidiose e sobre os riscos de transmissão antes da ocorrência desse surto, evidenciando que o desconhecimento sobre a doença, subestima seu risco e resulta na negligência das medidas de prevenção (Matsui et al., 2008). A doença é raramente fatal em humanos com diagnóstico precoce e corretamente tratados, o que justifica a pesquisa e a difusão necessária à ampliação do conhecimento sobre a epidemiologia da doença.

Na região Amazônica, em especial o estado do Pará, há carência de estudos sobre a dinâmica epidemiológica de *C. psittaci*, apesar da relevância do ponto de vista de saúde pública. Diversos estudos descrevem a ocorrência de *C. psittaci* em psitacídeos mantidos em cativeiro em vários países (Raso et al., 2002).

No entanto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a presença de infecção por *C. psittaci* em 22,2% dos pombos de vida livre capturados no parque Zoobotânico (Mangal das Graças) de Belém do Pará. Essa frequência é maior que a registrada por Lima et al. (2011), Ferreira (2012), Leal et al. (2015) e Ferreira et al. (2016) que observaram uma prevalência de infecção por *C. psittaci* de 16,8 (40/238), 13% (31/240) e 11,7% (16/137), e 13% (31/240) em pombos de vida livre, respectivamente.

Em comparação aos estudos que avaliaram a infecção de *Chamydia* sp. em aves silvestres de criadouros, nossa frequência é semelhante à registrada por Raso (2006), o

qual observou uma prevalência de infecção *C. psittaci* de 23,38% (18/77), bem como à registrada por um estudo de Vanrompay et al. (2007), no qual 19,2% (59/308) dos psitacídeos eram infectados por *C. psittaci*, porém, maiores em comparação aos achados de Casagrande et al. (2014), Ribas et al. (2014) e Santos et al. (2014) que relataram prevalências de *C. psittaci* 5,09% (11/26), 1,2% (1/117), e 10,16% (33/311) em psitacídeos, respectivamente. Estes resultados revelam um perfil oposto ao descrito por Bonorino et al. (2020) e Bento e Guimarães (2020), os quais apontam a ocorrência negativa deste agente etiológico em papagaios mantidos em cativeiro.

Recentemente, no estado do Pará, Araújo et al. (2019) avaliaram, utilizando o teste semi-nested PCR a ocorrência de *C. psittaci* em amostras de aves (psitacídeos) provenientes de quatro criadouros (Região Metropolitana de Belém, Nordeste paraense e Baixo Amazonas). Na referida pesquisa, a infecção por *C. psittaci* foi observada em todos os criadouros, com uma prevalência superior aos nossos resultados 31,84%, (64/201) de aves infectadas. Também, foram encontradas diferenças significativas entre a incidência de infecção por *C. psittaci* em aves provenientes dos criadouros situados na região metropolitana de Belém e Nordeste paraense ($p=0,029$). Além disso, 13,93% das aves eliminaram o agente infeccioso pela cloaca, enquanto 11,44% eliminaram o agente pela orofaringe e 6,47 eliminaram o agente por ambas as regiões. A maioria dos animais (27,86%) foram consideradas portadoras não aparente de infecção por *C. psittaci*., e apenas 3,98% das aves produziram um diagnóstico positivo e sinais clínicos da doença.

No entanto, deve-se considerar o estado de cativeiro das aves, o manejo nutricional, a densidade e demais fatores ambientais os quais podem interferir no estado imunológico e influenciar a infecção por *C. psittaci* entre as aves e explicar uma prevalência maior que a encontrada no presente estudo, o qual avaliou aves de vida livre (Andersen, 1996; Raso, 2007; Vasconcelos et al., 2013; Leal et al., 2015; Araújo et al., 2019).

De acordo com Proença et al. (2011) os fatores que levam a doença em humanos a ser subestimada estão relacionados com a ausência de sinais clínicos característicos, pela dificuldade de se ter um diagnóstico definitivo e pela ausência de testes comerciais específicos para a doença. Os casos de infecções humanas ocorrem principalmente em pessoas que estão diretamente ligadas as criações e manejos dos pássaros, provavelmente pelo fato de que as aves não apresentavam sintomas da enfermidade (Jorgensen, 1997; Heddema et al., 2006; Kaibu et al., 2006; Kováčová et al., 2007), semelhantes às aves positivas diagnosticadas neste trabalho.

Embora a infecção por *C. psittaci* apresente uma boa taxa de recuperação, a dificuldade de reconhecer a Clamidiose, o atraso no diagnóstico e o tratamento inadequado, podem levar a complicações graves e até o óbito dos pacientes. A dificuldade no diagnóstico pode ser em razão de os sintomas serem semelhantes aos de outras doenças como a Influenza (gripe) e a quadros clínicos que podem variar de infecção respiratória grave a um quadro de pneumonia e ou doença sistêmica (Hammerschlag, 2000; Donati et al., 2002; Smith et al., 2005; Petrovay e Balla, 2008; Cipriano et al., 2019).

Ainda que os relatos sobre as infecções de *C. psittaci* e a alta mortalidade entre pombos e outras aves silvestres (Vilela et al., 2019), tornando-os um risco a saúde pública (Longbottom e Coulter, 2003; Raso et al., 2002; Raso et al., 2004; Raso, 2007; Proença et al., 2011; Lima et al., 2011; Vasconcelos et al., 2013; Casagrande et al., 2014; Braz et al., 2014; Leal et al., 2015; Araújo et al., 2019), poucos trabalhos relatam a transmissão entre pombos e humanos (Haag-Wackernagel et al., 2004; Petrovay e Balla, 2008; Vázquez et al., 2010; Travaglino et al., 2020; Cipriano et al., 2019).

Apesar disso, a interação de pessoas próxima à parques, praças públicas, centros urbanos, onde os pombos geralmente fazem ninhos e estão presentes em grande quantidade, além do hábito de alimentar os pombos frequentemente observados na cidade Belém-PA, adicionado ao fato de a Clamidiose ser uma enfermidade desconhecida, tem-se traduzido em um risco à saúde pública.

Neste aspecto o Parque Zoobotânico do Mangal das Garças, onde os pombos deste estudo foram capturados, apresenta intensa circulação de pessoas, sendo ponto turístico importante da cidade de Belém-PA, e, portanto, um local de exposição ao risco de infecção por *C. psittaci*.

Até hoje, os estudos têm sido inconclusivos ou insuficientes para o completo entendimento da dinâmica dos fatores de risco epidemiológicos e das tendências na incidência de doenças (Balsamo et al., 2017).

6. CONCLUSÃO

Com base nos dados supracitados, é possível afirmar que os pombos de vida livre em Belém-PA podem ser reservatórios de *C. psittaci*. Foi evidenciada neste estudo, uma prevalência de infecção próxima aos dos demais trabalhos realizados por outros autores. Este resultado sugere riscos de infecção para humanos visto que tanto em cativeiro quanto em vida livre o contato entre aves e pessoas é bastante próximo e o potencial de propagação da bactéria é preocupante. Diante destes resultados é urgente a necessidade de controle da população de pombos de vida livre na cidade de Belém-PA, pois, a possibilidade de disseminação da bactéria e ocorrência da doença é inestimada visto que há interação frequente dos pombos domésticos com outras aves silvestres dentro dos parques ecológicos da cidade e com aves de estimação, além do contato direto evidente com pessoas nos espaços públicos

Além disso, considerando os poucos trabalhos desenvolvidos na região, é importante expandir o monitoramento dos pombos de vida livre a fim de esclarecer a dinâmica epidemiológica da doença, bem como estabelecer medidas de controle.

7. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, A.A. Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.8, p.448-450, 1996.
- ANDERSEN, A.A.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: SAYF, Y.M. **Disease of poultry**. 11.ed. Ames: Iowa State University, p.863-879, 2003.
- ANDERSEN, A. A. FRANSON, J. C. Avian chlamydiosis. In: **Infectious Diseases of Wild Birds**, Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT (editors), Oxford: Blackwell, pp 303–31, 2007.
- ALKHARIGY, F. A.; NAAS, A. S. EL.; MAGHRBI, A. A. EL. Survey of parasites in domestic pigeons (*Columba livia*) in Tripoli, Libya. **Open Veterinary Journal**, v. 8, n. 4, p. 360-366, 2018.
- ARAUJO, S. A. A.; PEREIRA, W. L. A.; SILVA, S. P.; CARDOSO, J. F.; FILHO, E. S.; BERNAL, M. K. M.; MENDES, F. F.; NUNES, M. R. T. Clinical and molecular diagnosis of *Chlamydophila* in captive parrots in Pará State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, n. 6, p. 2603-2612, 2019.
- BALSAMO, G.; MAXTED, A. M.; MILDA, J. W.; MURPHY, J. M.; WOHRLE, R.; EDLING, T. M.; FISH, P. H.; FLAMMER, K.; HYDE, D.; KUTTY, P. K.; KOBAYASHI, M.; HELM, B.; OIULFSTAD, B.; RITCHIE, B. W.; STOBIERSKI, M. G.; EHNERT, K.; TULLY Jr., T. N. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (Psittacosis) and pet birds (Avian Chlamydiosis), 2017. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 31, n. 3, p. 262-282, 2017.
- BENTO, M. A.; GUIMARÃES, J. P. Análise de presença de *Chlamydophila psittaci* em papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) mantidos em cativeiros em Cuvatão-SP e seu potencial zoonótico. **Unisanta Bioscience**, v. 9, n. 2, p. 137-143, 2020.
- BEECKMAN, D.S.A.; VANROMPAY, D.C.G. Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. **Clin. Microbiol. Infect.** 15, 11–17, 2009.
- BONELLO, F. L. Clamidiose: Uma importante zoonose adquirida de aves silvestres e exóticas. **Ciências Agrárias e Saúde**, v.3, n.2, 41-47, 2003.
- BONORINO, R. P.; FRAGA, A. A. Estudo do agente *Chlamydophila Psittaci* por PCR em *Calopsita Nymphicus Hollandicus*, **Ciência e Saúde Animal**, v. 2, n. 2, p. 50-61, 2020.
- BRACEWELL, C. D.; BEVAN, B. J.; Chlamydiosis in birds in Great Britain: 1. Serological reactions to *Chlamydia* in birds sampled between 1974 and 1983. **The Journal of Hygiene**, v. 96, n. 3, p. :447–451, 1986.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. **Classificação de risco dos agentes biológicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. – 3. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 48 p.
- BRAZ, M. A.; SILVA, D. C.; SANTIAGO, M. E. B.; GARCIA, S. D.; NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Detecção e classificação molecular de *Chlamydophila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 161-167, 2014.
- BUXTON, D.; RAE, A. G.; MALEY, S. W.; THOMSON, K. M.; LIVINGSTONE, M.; JONES, G. E.; HERRING, A. J. Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. **Journal of Comparative Pathology**, v. 114, n. 3, p. 221–230, 1996.
- BURKHART, R. L.; PAGE, L. A. Chlamydiosis (ornithosis- psittacosis). In: Davis, J. W.; ANDERSON, R. C.; KARSTAD, L.; TRAINER, D. O. eds. **Infectious and parasitic diseases of wild birds**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1971 pp.11840.
- CARRASCO, A. de O. T.; ISSAKOWICZ, J. C.; De MORAIS, M. T. G. F.; FATORETTO, L. A.; PANDOLFI, J. R. C.; SILVA, L. C.; PINTO, A. A. Levantamento Sorológico de *Mycoplasma* spp., *Salmonella* sp. e Doença de Newcastle em Pombos Domésticos (*Columba livia*) de Vida Livre. **UNOPAR Científica. Ciência Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 23-27, 2015.
- 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 885-890, 2014.
- CIPRIANO, A.; MACHADO, A.; SANTOS, F. V.; ABREU, M. A.; CASTRO, R. S. Psitacose: A propósito de um caso clínico, **Acta Médica Portuguesa**, v. 32, n. 2, 2019.
- KOVÁCOVÁ, E.; MAJTÁN, J.; BOTEK, R.; BOKOR, T.; BLASKOVICOVÁ, H.; ONDICOVÁ, M.; KAZÁR, J. A fatal case of psittacosis in Slovakia, January 2006. **Euro Surveill**, v. 12, n. 31, p. 3244, 2007.
- De BOECK, C.; DEHOLLOGNE, C.; DUMONT, A.; SPIERENBURG, M.; HEIJNE, M.; GYSSENS, I.; VAN DER HILST, J.; VANROMPAY, D. Managing a cluster outbreak of psittacosis in Belgium linked to a pet shop visit in The Netherlands. **Epidemiology & Infection**, v. 144, n. 8, p. 1710-1716, 2016.
- DICKX, V.; GEENS, T.; DESCHUYFFELEER, T.; TYBERGHIEN, L.; HARKINEZHAD, T.; BEECKMAN, D. S. A.; BRAECKMAN, L.; VANROMPAY, D. *Chlamydophila psittaci* Zoonotic Risk Assessment in a Chicken and Turkey Slaughterhouse. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n.9, p. 3244-3250, 2010.

- Di FRANCESCO A.; DONATI M.; NICOLOSO S.; ORLANDI L.; BALDELLI R.; SALVATORE D.; SARLI G.; CEVENINI R.; MORANDI F. Chlamydiosis: Seroepidemiologic Survey in a Red Deer (*Cervus elaphus*) Population in Italy. **Journal of Wildlife diseases**, v. 48, n. 2, p 488-491, 2012.
- DONATI, M.; POLLINI, G. M.; SPARACINO, M.; FORTUGNO, M. T.; LAGHI, E.; CEVENINI, R Comparative in vitro activity of garenoxacin against *Chlamydia* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 407–410, 2000.
- 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.
- FERREIRA, V. L. **Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- FERREIRA, V. L.; DIAS, R. A.; RASO, T. P. Screening of feral pigeons (*Columba livia*) for pathogens of Veterinary and medical importance. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 18, n. 4, p. 701-704, 2016.
- FRANCISCO, A. R; TRONCARELLI, M. Z. Clamidiose em aves: uma revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**-ISSN 1679-7353 Ano XIV - Número 29 – Julho de 2017 – Periódico Semestral.
- GAEDE, W.; RECKLING, K.-F.; DRESENKAMP, B.; KENKLIES, S.; SCHUBERT, E.; NOACK, U.; IRMSCHER, H.-M.; LUDWIG, C.; HORTZEL, H.; SACHSE, K. *Chlamydophila psittaci* infections in humans during an outbreak of psittacosis from poultry in Germany. **Zoonoses Public Health**, v. 55, n. 4, p. 184-188, 2008
- GAYDOS, C. A.; HOWELL, M. R.; QUINN, T. C.; GAYDOS, J. C.; McKEE Jr. Use of ligase chain reaction with urine versus cervical culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in an asymptomatic military population of pregnant and nonpregnant females attending Papanicolaou smear clinics. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1300-1304, 1998.
- GEIGENFEIND, I; VANROMPAY, D.; HAAGWACKERNAGEL, D. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in the feral pigeon population of Basel, Switzerland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 261–265, 2012
- GIBBS, E.P.J. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. **Veterinary Record**, v. 174, p. 85-91, 2014.
- HAMMERSCHLAG, M. R. Activity of gemifloxacin and other new quinolones against *Chlamydia pneumoniae*: a review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 1, 35–39, 2000.

- HUGHES, C.; MAHARG, P.; ROSARIO, P.; HERRELL, M.; BRATT, D.; SALGADO, J.; HOWARD, D. Possible nosocomial transmission of psittacosis. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 18, p. 165–168, 1997.
- HOGERWERF, L.; DE GIER, B.; BAAN, B.; HOEK, W. V. D. *Chlamydia psittaci* (psittacosis) as a cause of community-acquired pneumonia: a systematic review and meta analysis. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 15, p. 3096-3105, 2017.
- HAAG-WACKERBAGEL, D.; MOCH, H. Health hazard posed by feral pigeons. **Journal of Infection**, v. 48, n. 4, p. 307-313, 2004.
- HEDDEMA, E. R.; HANNEN, E. J. V.; DUIM, B.; JONGH, B. M.; KAAAN, J. A.; KESSEL, R. V.; LUMEIJ, J. T.; VISSER, C. E.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. An outbreak of psittacosis due to *Chlamydophila psittaci* genotype A in a veterinary teaching hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1571-1575, 2006.
- HARKINEZHAD, T.; GEENS, T.; VANROMPAY, D.; *Chlamydophila psittaci* infectiona in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. **Veterinary Microbiology**, v. 135 p. 68-77, 2009.
- ITO, I.; ISHIDA, T.; MISHIMA, M.; OSAWA, M.; ARITA, M.; HASHIMOTO, T.; KISHIMOTO, T. Familial cases of psittacosis: possible person-to-person transmission. **Internal Medicine**, v. 41, p. 580–583, 2002.
- JORGENSEN, D. M. Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 191–194, 1997.
- KAIBU, H.; LIDA, K.; UEKI, S.; EHARA, H.; SHIMASAKI, Y.; WATANABE, S.; ANZAI, H.; TAKEBU, W.; MUTA, T.; KUSABA, T.; KISHIMOTO, T.; ANDO, S. Psittacosis in all four members of a family in Nagasaki, Japanese **Journal of Infectious Diseases**, v.59, n. 5, p. 349–350, 2006.
- KALETA, E. F.; BALDAUF, C. Newcastle disease in free-living pet birds. In: Alexander, D.J. **Newcastle Disease**. Boston: Kluver Academic. p. 197-246, 1988.
- KALETA E. F.; TADAY, E. M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. **Avian Pathology**, v. 32, n. 5, p. 435–462, 2003.
- KHAN, C. M. (Ed.) **The Merck Veterinary Manual**. 9th ed. Whitehouse Station: MERCK & Co., 2006.
- KNITTLER, M. R., and SACHSE, K. Chlamydia psittaci: update on an underestimated zoonotic agent. **Pathog. Dis.** 73, 1–15.,2015.

- KNITTLER M. R.; BERNDT A., BÖCKER S.; DUTOW, P.; HÄNEL F.; HEUER, D.; KÄGEBEIN, D.; KLOS, A.; KOCH, S.; TENORIO, E.L.; OSTERMANN, C.; REINHOLD, P.; SALUZ, H. P.; SCHÖFL, G.; SEHNERT, P.; SACHSE, K. *Chlamydia psittaci*: new insights into genomic diversity, clinical pathology, host-pathogen interaction and anti-bacterial immunity. **International Journal of Medical Microbiology** 304 877–893, 2014
- KRITSKI, L. A.; ROSSETTI, M. L.; BONFIM, G.; CASTELO, A. MELLO, F. C. Q. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. **Jornal de Pneumologia**, v. 23, n. 1, p. 33-42, 1997.
- LAN, J.; WALBOOMERS, J. M. M.; ROOSENDAAL, R.; DOORNUM, G. J. J. V.; MACLAREN, D. M.; MEIJER, C. J. L. M.; BRULE, A. J. C. V. D. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 1060-1065, 1993.
- LAROUCAU, K.; BARBEYRAC, B.; VORIMORE, F.; CLERC, M.; BERTIN, C.; HARKINEZHAD, T.; VERMINNEN, K.; OBENICHE, F.; CAPEK, I.; BEBEAR, C.; DURAND, B.; ZANELLA, G.; VANROMPAY, D.; GARIN-BASTUJI, B.; SACHSE, K. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 1-2, p. 82-89, 2009.
- LEAL, D. C.; NEGRÃO, V. B.; SANTOS, F.; RASO, T. F.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. R. Ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em pombos (*Columba livia*) na cidade de Salvador, Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 771-776, 2015.
- LENT, S. V.; PIET, J. R.; BEECKMAN D.; ENDE, A. V. D.; NIEUWERBURGH, P. B.; MYERS, G.; VANROMPAY, D.; PANNEKOEK, Y. Full genome sequences of all nine *Chlamydia psittaci* genotype reference strains. **Journal Bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6930–6931, 2012.
- LIMA, V. Y.; LANGONI, H.; SILVA, A. V.; PEZERICO, S. B.; CASTRO, A. P. B.; SILVA, R. C.; ARAÚJO Jr, j. p. *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 09-14, 2011.
- LIN, W.; CHEN, T.; LIAO, L.; WANG, Z.; XIAO, J.; LU, J.; SONG, C.; QIN, J.; CHEN, F.; CHANG, Y.; XIE, Q. A parrot-type *Chlamydia psittaci* strain is in association with egg production drop in laying ducks. **Transbound and Emerging Diseases**, v. 66, n. 5, p. 2002-2010, 2019.
- LONGBOTTOM, D.; COULTER, L. J. Animal Chlamydiosis and zoonotic implications. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 217-244, 2003.
- MAHONY, J.; CHONG, S.; JANG, D.; LUINSTRA, K.; FAUGHT, M.; DALBY, D.; SELLORS, J.; CHERNESKY, M. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction and transcriptase-mediated amplification: identification of

- urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3122-3126, 1998.
- MATSUI, T.; NAKASHIMA, K.; OHYAMA, T.; KOBAYASHI, J.; ARIMA, Y.; KISHIMOTO, T.; OGAWA, M.; CAI, Y.; SHIGA, S.; ANDO, S.; KURANE, I.; TABARA, K.; ITAGAKI, A.; NITTA, N.; FUKUSHI, H.; MATSUMOTO, A.; OKABE, N. An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan. **Epidemiology & Infection**, v. 136, p. 492-495, 2008.
- MANCERA, V. M. M.; JIMÉNEZ, L. C. V.; MEDINA, D. A. B.; SOLER-TOVAR, D. La paloma (*Columba livia*) en la transmisión de enfermedades de importancia en salud pública. **Revista Ciência Animal**, [S.l.], n. 6, p. 177-194, 2013.
- MARTINS, C. M.; BIONDO, A. W.; BRAGA, K. F.; OLIVEIRA, S. T. Percepção de usuários de espaços públicos de Curitiba, Paraná, sobre a presença de pombos (*Columba livia*). **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 4, p. 10-9, 2015.
- MORRÉ, S. A.; OSSEWAARDE, J. M.; SAVELKOUL, P. H. M.; STOOFF, J.; MEIJER, C. J. L. M.; VAN DER BRULE, A. J. C. Analysis of genetic heterogeneity in *Chlamydia trachomatis* clinical isolates of serovars D, E and F by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 3463-3466, 2000.
- MOSCHIONI, C.; FARIA, H. P.; REIS, M. A. S.; SILVA, E. U. Pneumonia grave por *Chlamydia psittaci*. **Journal Pneumology**, v. 27, n. 4, p. 219-222, 2001.
- NGUYEN-VIET H.; CHOTINUN S.; SCHELLING E.; WIDYASTUTI W.; KHONG N. V.; KAKKAR M.; BEECHE A.; JING F.; KHAMLOME B.; TUM S.; ADISASMITO W. Reduction of antimicrobial use and resistance needs sectoral-collaborations with a One Health approach: perspectives from Asia. **Int J Public Health**, v. 62, n. Suppl 1, p. 3-5, 2017.
- NUNES, V. F. P. Pombos urbanos: O desafio de controle. **Biológico**, v. 65, n. 1-2 p. 89-92, 2003.
- OLSEN, B.; PERSON, K.; BROHOLM, K. A. PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerines birds in Sweden. *Epidemiology Infectology*. Short Paper. Printed in the United Kingdom. **Cambridge University Press**. v. 121, p. 481-483, 1998.
- PETROVAY, F.; BALLA, E. Two fatal cases of psittacosis caused by *Chlamydophila psittaci*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1296-1298, 2008.
- PROENÇA, L.M.; FAGLIARI, J.J.; RASO, T.F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 841-847, 2011.
- PUOLAKKAINEN, M.; HILTUNEN-BACK, E.; REUNALA, T.; SUHONEN, S.; LÄHTEENMÄKI, P.; LEHTINEN, M.; PAAVONEN, J. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain

- reaction test, in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1489-1493, 1998.
- QUINN, T. C.; GAYDOS, C.; SHEPHERD, M.; BOBO, L.; HOOK, E. W.; VISCIDI, R.; ROMPALO, A. Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. **Jama**, v. 276, n. 21, p. 1737-42, 1996.
- RAEVEN, V. M.; SPOORENBERG, S. M. C.; BOERSMA, W. G.; GARDE, E. M. W. V.; CANNegiETER, S. C.; VOOM, G. P. P.; BOS, W. J. W.; STEENBERGEN, J. E. V. Atypical aetiology in patients hospitalized with community-acquired pneumonia is associated with age, gender and season; a data-analysis on four Dutch cohorts. **BMC Infectious Disease**, v. 17, n. 16, p. 1-9, 2016.
- 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.; JUNIOR, A. B.; PINTO, A. A.; Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive amazon parrots in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.32, p.118-121, 2002.
- RASO, T. F.; GODOY, S. N.; MILANELO, L.; SOUZA, C. A. I.; MATUSCHIMA, E. R.; ARAÚJO, 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. De 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.; CARRASCO, A. O. T.; SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; PINTO, A. A. Seroprevalence of Antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo Workers in Brazil. **Zoonoses and Public Health**. v.57, n. 6, p.411-416, 2010.
- RASO, T. F.; GRESPAN, A.; FERREIRA, V. L.; PINHEIRO, S. R. *Chlamydophila psittaci* infection in pet cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) in Brazil. 1st International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface (ICOPHAI): Impact, Limitations and Needs in Developing Countries, United Nations Center, Addis Ababa, Ethiopia. Proceedings. p. 41, 2011.
- RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R. et al. *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 2-4, p. 235-241, 2006.
- RASO, T. F.; TEIXEIRA, R. H. F.; CARRASCO, A. O. T.; JÚNIOR, J. P. A.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* infections in hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) confiscated in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 1, p. 169–172, 2013.

- RASO, T. F. Clamidiose - Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. v. 2. cap. 67. p. 1369-1379.
- ROBERTSON, T.; BIBBY, S.; O'ROURKE, D.; BELFIORE, T.; AGNEW-CRUMPTON, R.; NOORMOHAMMADI, A. H. Identification of chlamydial species in crocodiles and chickens by PCR-HRM curve analysis. **Veterinary Microbiology**, v. 145, p. 373-379, 2010.
- RIBAS, J. M.; SIPINSKI, E. A. B.; SERAFINI, P. P.; FERREIRA, V. L.; RASO, T. F.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* assessment in threatened red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*) parrots in Paraná, Brazil. **Ornithologia**, v. 6, n. 2, p. 144-147, 2014.
- SACHE, K.; VRETOU, E.; LIVINGSTONE, M.; BOREL, N.; POSPISCHIL, A.; LONGBOTTOM, D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 2-21, 2009.
- SACHSE, K.; LAROUCAU, K. Two more species of *Chlamydia*—does it make a difference? **Pathogens and Diseases**, v. 73, n. 1, p. 1-3, 2015.
- SANTOS, F.; LEAL, D. C.; RASO, T. F.; SOUZA, B. M. P. S.; CUNHA, R. M.; MARTINEZ, V. H. R.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. R. Risk factors associated with *Chlamydophila psittaci* infection in psittacine birds. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 458-463, 2014.
- SALINAS, J.; CARO, M. R.; CUELLO, F. Comparison of different serological methods for the determination of antibodies to *Chlamydia psittaci* in Pigeon Sera. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 40, n. 1-10, p. 239-244, 1993.
- SCHAUTTEET, K.; VANROMPAY, D. Chlamydiaceae infections in pig. **Veterinary Research**, v. 42, n. 29, p. 1-10, 2011.
- SCHULLER, M. **Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presente nas excretas de pombo doméstico (*Columbalivia domestica*), 2003**. 93f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2003.
- SEADI, C. F.; ORAVEC R.; POSER, B. V.; CANTARELLI, V. V.; ROSSETTI, M. L. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection: advantages and disadvantages of the tests. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, 2002.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 4 ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. p. 912. 2001
- SILVA, R. C. R.; MACIEL, W. C.; TEIXEIRA, R. S. C.; SALLES, R. P. R. O pombo (*Columba livia*) como agente carreador de *Salmonella* spp. e as implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 189-194, 2014.
- SMITH, K. A.; CAMPBELL C. T.; MURPHY J.; STOBIERSKI M. G.; TENGELSEN 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, p. 32–45, 2011.
- SMITH, K. A.; BRADLEY, K. K.; STOBIERSKI, M. G.; TENGELSEN, L. A. Compendium of measures to control *Chlamydomphila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 4, p. 532–539, 2005.
- SACHSE, K.; VRETOU, E.; LIVINGSTON, M.; BOREL, N.; POSPISCHIL A.; LONGBOTTOM, D; Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 1-2, p. 2- 21, 2009.
- SAITO, T.; OHNISHI, J.; MORI, Y.; IINUMA, Y.; ICHIYAMA, S.; KOHI, F. Infection by *Chlamydomphilia avium* in an Elderly Couple Working in a Pet Shop. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.6, p. 3011-3013, 2005.
- SCHACHTER, J.; STAMM, W. E. *Chlamydia*. In: **Manual of clinical microbiology**. 7.ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1999, p. 795-806.
- SONG, L.; LI, Y.; LIU, G.; HE, J.; ZHU, H.; DUAN, Q. Genotyping of *Chlamydomphila psittaci* strains derived from avian and mammalian species. **Veterinary Research Communications**, v.33, p.577-580, 2009.
- SPRAGUE, L. D.; SCHUBERT, E.; HOTZEL, H.; SCHARF, S.; SACHSE, K. The detection of *Chlamydomphila psittaci* genotype C infection in dogs. **The veterinary Journal**, v. 181, p. 274-279, 2009.
- SZYMANSKA-CZERWINSKA, M.; NIEMCZUK, K. Avian Chlamydiosis zoonotic disease. **Vector-Borne and Zoonotic Disease**, v. 16, n. 1, p. 1-3, 2016.
- TOYE, B.; WOODS, W.; BOBROWSKA, M.; RAMOTAR, K. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2356-2358, 1998.
- TRAVAGLINO, A.; PACE, M.; VARRICCHIO, S.; PEPA, R. D.; LULIANO, A.; PICARDI, M.; PANE, F.; STAIBANO, S.; MASCOLO, M. Prevalence of *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia trachomatis* determined by molecular testing in Ocular Adnexa Lymphoma Specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 153, n. 4, p. 427-343, 2020.
- VASCONCELOS, T. B.; NOGUEIRA, D. M.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, E. R.; BRUNO, S. F. *Chlamydomphila psittaci* em aves silvestres e exóticas: uma revisão com ênfase em saúde pública. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 2462-2477, 2013.
- VANROMPAY, D.; COX, E.; VOLCKAERT, G.; GODDEERIS, B. Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. **Clinical and Experimental Immunology**. v.118, p. 49-55, 1999.

- 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, n. 7, p. 1108- 1110, 2007.
- VAZ, F. F.; Da SILVA, L. A. F.; FERREIRA, V. L.; Da SILVA, R. J.; RASO, T. F. Gastrointestinal helminths of two populations of pigeons (*Columba livia*) in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 446-450, 2017.
- VÁZQUEZ, B.; ESPERON, F.; NEVES, E.; JUAN, L.; BALLESTEROS, C.; MUÑOZ, M. J. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 1-6, 2010.
- VERMINNEN, K.; BEECKMAN, D. S. A.; SANDERS, N. N.; SMEDTC, S.; VANROMPAY, D. C. G. Vaccination of turkeys against *Chlamydophila psittaci* through optimised DNA formulation and administration. **Vaccine**, v. 28, p.3095-3105, 2010.
- VILELA, D. A. R.; MARÍN, S. Y.; RESENDE, M.; COELHO, H. L. G.; RESENDE, J. S.; FERREIRA-JÚNIOR, F. C.; ORTIZ, M. C.; ARAÚJO, A. V. Phylogenetic analyses of *Chlamydia psittaci ompA* gene sequences from captive *Amazona aestiva* (Aves: Psittaciformes) with hepatic disease. **Revue Scientifique Et Technique Office International des Epizooties**, v. 38, n. 3, p. 1-20, 2019.
- WANG, X.; ZHANG, N. Z.; MA, C. F.; ZHANG, X. X.; ZHAO, Q.; NI, H. B. Epidemiological investigation and genotype of *Chlamydia* exposure in pigeons in three provinces in Northern China. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 3, p. 181-184, 2018.
- WEST A. A Brief review of *Chlamydophila psittaci* in birds and humans. **J Exot Pet Med** 20:18–20,2011.
- ZHOU, J.; QIU, C.; CAO, X-A.; LIN, G. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila psittaci* in chicks. **Vaccine**, v.25, p. 6367-6372, 2007.

8. ANEXOS



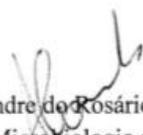
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

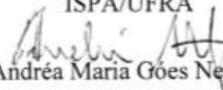
AUTORIZAÇÃO

Autorizamos a utilização das amostras biológicas de pombos procedentes do laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Medicina Veterinária do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia a fim de desenvolver a dissertação de mestrado intitulada “**DIAGNÓSTICO DE *Chlamydofila* sp. EM POMBOS DOMÉSTICOS (*Columba livia*, Gmelin 1789) CAPTURADOS NO PARQUE MANGAL DAS GARÇAS, BELÉM-PA**”, pela aluna de pós-graduação Kelly Cristiny Gomes da Paixão Albuquerque, sob orientação do Professor Drº Alexandre do Rosário Casseb, da Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA. Os materiais foram coletados no projeto intitulado Avaliação da Ocorrência e da Frequência de Salmonelose, Micoplasmose e Doença de Newcastle em pombos domésticos (*Columba livia*-Gmelin 1789) no Estado do Pará. A coleta deste material foi previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA, com o protocolo 022/2013 (CEUA)-23084.006334/2013-32 (UFRA).

Belém, Pará, 19 de agosto de 2015.

Atenciosamente,


Alexandre do Rosário Casseb
Responsável pelo laboratório de Microbiologia e Imunologia do Curso de Medicina Veterinária

ISPA/UFRA

Andréa Maria Goes Negrão
Responsável pelo Projeto



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

ATESTADO

Protocolo 022/2013 (CEUA) – 23084.006334/2013-32 (UFRA)

Título do Projeto/Plano de Aulas: **Avaliação da ocorrência e da frequência de Salmonelose, Micoplasmose e Doenças de Newcastle em pombos domésticos (Columba livia) de vida livre no Estado do Pará.**

Docente/Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andrea Maria Goes Negrão

Instituição: UFRA

Data do Parecer: 27 de maio de 2013.

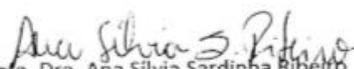
PARECER

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, 31 de maio de 2013.


Profa. Dra. Ana Sílvia Sardinha Ribeiro
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 www.comissao.ufra.edu.br/ceua

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 36 de 9

SUMÁRIO:

- 1. Siglas**
- 2. Objetivo**
- 3. Campo de Aplicação**
- 4. Princípio da técnica**
- 5. Condições Gerais**
- 6. Condições Específicas**
- 7. Procedimento Detalhado**
- 8. Critérios para repetição da técnica**
- 9. Referências Bibliográficas**
- 10. Definições**

1 – SIGLAS

POP – Procedimento Operacional Padrão

LABMICRO- Laboratório de Microbiologia

UFRA- Universidade Federal Rural da Amazônia

ISPA- Instituto da Saúde e Produção Animal

EPI's – Equipamentos de Proteção Individual

DNA – Ácido desoxirribonucléico

PCR – Reação em Cadeia mediada pela Polimerase

C+ – Controle positivo (Cepa vacinal)

C- - Controle negativo (água ultrapura)

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 2 de 9

TA- Temperatura ambiente

rpm – Rotação por minuto

2 – OBJETIVO

Extração e purificação de DNA total a partir de amostras biológicas para posterior utilização em técnicas de biologia molecular.

3 – CAMPO DE APLICAÇÃO

Diagnóstico molecular por meio da Técnica da Polimerase em Cadeia-PCR de diversos agentes etiológicos e identificação biológica de qualquer espécie.

4 – PRINCÍPIO DA TÉCNICA

Os kits de DNA genômico PureLink® são baseados na ligação seletiva de DNA à membrana à base de sílica e na presença de sais caotrópicos. O lisado é preparado a partir de uma variedade de materiais biológicos, como tecidos, células ou sangue. As células ou tecidos são digeridos com Proteinase K a 55°C usando uma formulação de tampão de digestão otimizada que auxilia na desnaturação da proteína e melhora a atividade da Proteinase K. Qualquer RNA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 3 de 9

residual é removido por digestão com RNase A antes da ligação das amostras à membrana de sílica. O lisado é misturado com etanol e com o tampão de ligação genômica PureLink® que permite a coluna de rotação PureLink® de alta ligação ao DNA (Mini Kit) ou placa de ligação (Kit 96). O DNA se liga à membrana à base de sílica na coluna ou placa e as impurezas são removidas por lavagens cuidadosas com tampões de lavagem. O DNA genômico é então eluído em tampão de eluição com baixo sal.

5 – CONDIÇÕES GERAIS

5.1- Amostra

Células e tecidos de mamíferos, cauda de camundongo / rato, amostras de sangue e bactérias.

5.2- Controles

O controle positivo se fez com amostra vacinal e o controle negativo fez-se com água ultrapura.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 4 de 7

5.3- Seleção das Amostras Controles

O controle positivo obtem-se a partir de amostra vacinal (Nobivac® Feline 1-HCPCh+FeLV) e, como controle negativo, utiliza-se água ultra-pura.

5.4- Manipulação das Amostras no Ensaio

5.4.1 – Para que não ocorra contaminação e comprometimento do resultado da extração, faz-se necessários os seguintes procedimentos:

- (a) fazer desinfecção da bancada e da capela a serem utilizadas;
- (b) usar luvas descartáveis em todas as etapas do procedimento para evitar a contaminação;
- (c) usar material plástico descartável e livre de contaminantes, e pipetas automáticas reservadas especialmente para o trabalho;

5.5 – Vidraria

Toda vidraria utilizada deve ser lavada, montada e esterilizada conforme procedimentos adotados pelo Laboratório de Microbiologia ISPA/UFRA.

5.6- Cuidados Pessoais

5.6.1 – Antes de iniciar o ensaio, tirar qualquer tipo de ornamento (anéis, pulseira, relógios e demais acessórios).

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 5 de 9

5.6.2 – Antes de iniciar o ensaio, e após o seu término, lavar as mãos com água e sabão;

5.6.3 – Utilizar os EPI's (jaleco, luvas descartáveis, máscara, touca e óculos de proteção) para o manuseio do equipamento;

5.7 – Cabine de Segurança Biológica

Todos os procedimentos do ensaio são executados em cabine de segurança biológica.

5.8 – Área de Trabalho

Antes do início da execução da técnica toda área deverá ser limpa e descontaminada com hipoclorito de sódio 0,1% (exceto superfícies metálicas) ou álcool 70%.

6 – CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1 - Soluções, Reagentes e Insumos

6.1.1- Kit de extração de DNA PureLink Mini Kit (Invitrogen)

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 6 de9

6.2 - Equipamentos, Material Permanente e de Consumo

6.2.1 – Equipamentos:

- A) Agitador de tubos;
- B) Banho maria ou termobloco;
- C) Microcentrífuga para tubos de 1,5 ml;
- D) Capela;

6.2.2 - Material Permanente

- A) Micropipetas automáticas de 20 µl, 200 µl e 1000 µl;
- B) Tubos de 50 ml cônicos graduados de polipropileno;
- C) Caneta para identificação;
- D) Estante para tubos de 1,5ml;
- E) Termômetro de máxima de mínima para geladeira e freezer;
- F) Gral e pistilo de porcelana ou de vidro;
- G) Tesoura ponta fina;
- H) Pinça anatômica e dente de rato;

6.2.3 - Material de Consumo

- A) Ponteiros ajustáveis às pipetas automáticas, novas, estéreis;
- B) Tubos para microcentrífuga de 1,5 ml de polipropileno, novos estéreis;

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 7 de 9

C) Gaze;

D) Banho de gelo;

7 – PROCEDIMENTO

7.1 – Lise e homogeneização

- a. Para Tecido pulmonar: para cada 10 mg de tecido, devem ser adicionados de 1 mL de solução tampão de lise proveniente do kit de extração iPrep™ChargeSwith gDNA Tissue Kit, (Invitrogen™), e macerados em agitador Tissue Lyser II (Quiagen Ltd.) a 25 Hz/5 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para um novo microtubo individual, onde foram adicionados 10µL de RNase, com posterior incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, e 20 µL de proteinase K. Após isso, os tubos foram incubados a 55 °C/1 hora. A purificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit iPrep™ gDNA Tissue (Invitrogen™) e equipamento iPrep™Instrument, de acordo com as recomendações do fabricante.
- b. Para amostras de conteúdo intestinal: utilizou-se o mini kit de purificação Purelink (Invitrogen™), de acordo com as recomendações do fabricante, considerou-se seguir o protocolo recomendado para amostras de sangue.

Importante-1: Quando for usar o Tampão de Lavagem II (Wash Buffer II) pela primeira vez: Adicionar 60 mL de Etanol 96-100% datar e marcar o frasco para indicar que o etanol já foi adicionado.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação	Página: 8 de 9

Importante-2: Preparo do Tampão de Lise fresco contendo 1% de 2-mercaptoetanol: adicionar 1 µL de 2-mercaptoetanol para cada 100 µL de Tampão de Lise (Lysis Buffer). Calcular quanto vai ser necessário de tampão de lise multiplicando a quantidade necessária por amostra pelo número total de amostras. Acrescentar 1% do volume total obtido de 2-mercaptoetanol. Sempre preparar o Tampão de Lise na hora, nunca armazenar.

Nota 1: Para extração de DNA de conteúdo intestinal, preconizou-se seguir o protocolo recomendado para sangue.

7.1.1 - Adicionar um volume de etanol a 100% e homogeneizar em vortex por 15 segundos.

7.1.2 - Transferir até 640 µL de amostra (incluindo qualquer precipitado que tenha se formado) para a coluna e centrifugar a 10.000 x g por 1 minuto a T.A.

7.1.3 - Descartar o líquido do tubo coletor e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.

7.1.4 - Repetir as etapas 7.1.2 e 7.1.3 até que toda a amostra tenha sido processada.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO				
TÍTULO	Extração de DNA PureLink™ Mini Kit (Invitrogen)			
01. Laboratório de Microbiologia e Imunologia ISPA/UFRA	Revisão 00	Data da Elaboração	Data Aprovação .	Página: 9 de 9

7.1.5 - Adicionar 500 µL de Tampão de Lavagem I (Wash Buffer I) à coluna e centrifugar a 10.000 x g por 1 minuto a T.A. Descartar o tubo coletor e inserir a coluna em um novo tubo coletor.

7.1.6 - Adicionar 500 µL do Tampão de Lavagem II (Wash Buffer II) à coluna e centrifugar a 10.000 x g por 1 minuto a T.A. Descartar o líquido do tubo coletor e reinsserir a coluna no mesmo tubo coletor;

7.1.7 - Centrifugar a 12.000 x g por 3 minutos a T.A. para secar a coluna. Descartar o tubo coletor e inserir a coluna em um tubo de microcentrífuga (1,5 ml).

7.1.8 – Transfira a coluna para um microtubo de 1,5 mL devidamente identificado e descarte a coluna, em seguida adicione 30 - 100 µL de água livre de nucleases.

7.1.9 – Incubar por 1 minuto a T.A. e Centrifugar a 12.000 x g por 2 minutos a T.A.

7.1.10 – Descartar a coluna e estocar o tubo contendo o DNA a -70°C para posterior uso ou usar imediatamente.

Nota: Múltiplos descongelamentos diminuem a viabilidade do DNA, por isso preferencialmente faça alíquotas do seu material antes de congelar.

8- QUANTIFICAÇÃO DE DNA OU REALIZAÇÃO DE ELETROFORESE A FIM DE VERIFICAR A PRESENÇA DE DNA

Mensuração da concentração de DNA resultante da extração com Qubit dsDNA HS Assay kit 500 assays Invitrogen Life Technologies ou submissão do protuto da extração de DNA a eletroforese.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Na elaboração deste POP tomou-se como referência o manual do fabricante: Invitrogen Corporation cat# 10296-010 (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_genomic_man.pdf).

O método foi descrito inicialmente por: Chomczynski P; Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem, 162 (1): 156, 1987.

10 - DEFINIÇÕES: Vide manual

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
Procedimento para a realização de SEMI-NESTED	PÁGINA: 46 de 4

1. OBJETIVO: Estabelecer procedimentos para realizar testes de biologia molecular a fim de detectar a presença do genoma de *Chlamydia* sp.

2. RESPONSÁVEIS: Atividade restrita aos técnicos, pesquisadores e/ou colaboradores do laboratório de biologia molecular devidamente treinados.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES:

- a) Antes de iniciar, paramentar-se: uso de jaleco, luvas descartáveis, máscara, touca e óculos de proteção;
- b) Ligar a máquina de gelo;
- c) Limpar a cabine de bancada (Vide POP para o uso da cabine) da Sala NESTED com álcool 70%;
- d) Separar e limpar com álcool 70% as pipetas (20 µl, 200 µl e 1000 µl), caixas de ponteiros e frascos contendo os tubos de microcentrifuga, guardados no armário.
- e) Organizar os materiais listados em “c” e ligar a UV por 10 minutos.
- f) Identificar os tubos de microcentrifuga 0,2 mL e 0,5 mL seguindo a ordem do protocolo contendo os controles positivo e negativo.
- g) c) Na cabine de bancada, distribuir água livre de DNase nos tubos de 0,5mL na proporção de 1:99 e fechá-los.
- h) Preparar banho de gelo na cabine;
- i) Pegar os reagentes (PCR buffer minus, mix dNTP, MgCl₂, Taq Polimerase) e oligonucleotídeos (MOMP A 5' CAGGATATCTTGTCTGGCTTTAA 3' /MOMP B (5'GCAAGGATCGCAAGGATC 3' /MOMP C 5'TTAGAGGTGAGTATGAAAAACTC 3') no freezer -20°C da Sala de Amplificação, na gaveta da Rotina e levá-los a Sala NESTED e preparar a mix da reação:

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
Procedimento para a realização de SEMI-NESTED	PÁGINA: 2 de 4

Para *Chamydia* sp., cada amostra de DNA extraído utiliza:

1. 15,15 µl de água ultrapura;
2. 2,5 µl de PCR buffer minus Mg₂;
3. 0,5 µl de 10mM dNTP mixture;
4. 0,75 µl de 50mM MgCl₂;
5. 0,5 µl de primer MOMP A (10 µM each);
6. 0,5 µl de primer MOMP B (10 µM each);
7. 0,1 µl de Platinum Taq Polimerase;
8. 5,0 µl de amostra de DNA.

g) Fazer os cálculos de acordo com o número de amostras seguindo os volumes da reação, conforme tabela abaixo:

<i>semi-nested</i> PCR (reação 1) volume final de 25 µl	Unit (µl)	Total (µl)
Água	15,15	15,15
10X PCR Buffer minus Mg ₂	2,5	2,5
10 mM dNTP mixture	0,5	0,5
50 mM MgCl ₂	0,75	0,75
Primer MOMP A (10 µM each)	0,5	0,5
Primer MOMP B (10 µM each)	0,5	0,5
Platinum Taq DNA polymerase	0,1	0,1
Template DNA	5,0	-
TOTAL DE AMOSTRAS	1	

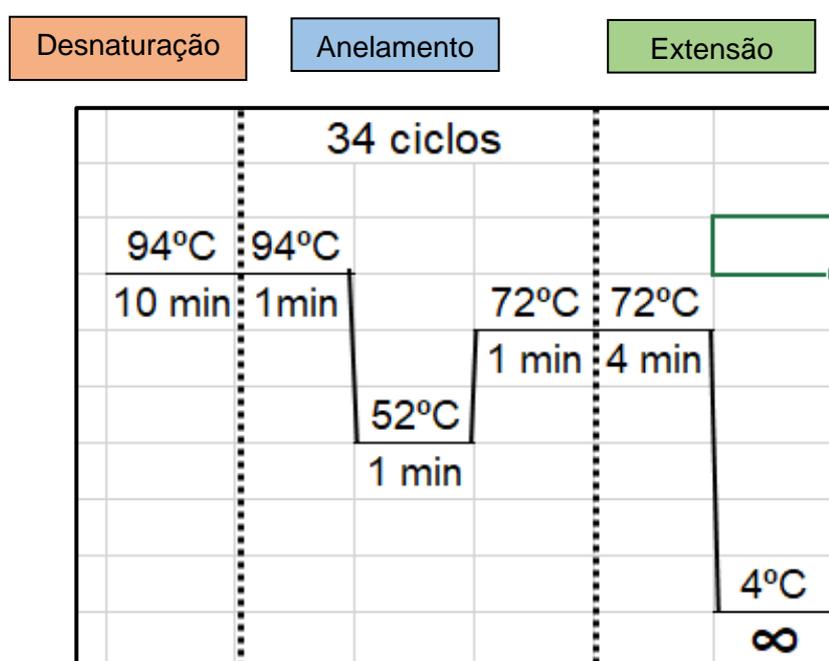
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
Procedimento para a realização de SEMI-NESTED	PÁGINA: 3 de 4

h) Em um tubo de microcentrífuga (1,5-2,0 mL), adicionar os reagentes e por último a enzima (Taq polimerase). Deixar o tubo de mix pronto em estante com gelo e distribuir em tubos de 0,2mL para um volume final de 25 μ l, de 20 μ l de mix e 5 μ l da amostra de DNA.

g) Ligar o termociclador e escolher o programa de semi- Nested *Chamydia* sp.

h) Distribuir 25 μ l da diluição nos tubos de 0,2mL contendo a mix.

i) Colocar os tubos no termociclador e iniciar o programa de amplificação:



j) Guardar os reagentes e oligonucleotídeos assim como a estante com gelo no freezer -20°C da Sala de Amplificação na gaveta da Rotina. Também as pipetas e as caixas de ponteiros no armário próprio na Sala NESTED.

Observação: Por se tratar de uma reação de semi-nested PCR, haverá uma segunda reação. A primeira, já descrita, possui 34 ciclos de 17 minutos cada. Ao

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
Procedimento para a realização de SEMI-NESTED	PÁGINA: 4 de 4

término da primeira reação, seguem os passos descritos em “f”, substituindo a amostra de DNA pelo produto da primeira reação e o primer “MOMP A” pelo primer “MOMP C” . A segunda reação também possui 34 ciclos, de 17 minutos cada. Ao final, o produto será submetido à migração em gel mediado por eletroforese a fim de verificar a presença ou não do DNA alvo na amostra.

q) Limpar a cabine previamente com álcool 70% e ligar a UV por 10 minutos.

4. REFERÊNCIAS: RASO T. R., 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* 117 (2006) 235–241 DOI:10.1016/J.vetmic.2006.06.025.

5. DEFINIÇÕES: Vide manual