



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E
DETECÇÃO DE *CHLAMYDOPHILA PSITTACI* EM
CALOPSITAS (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*) DO
DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

STELA SAMPAIO SILVA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E
DETECÇÃO DE *CHLAMYDOPHILA PSITTACI* EM
CALOPSITAS (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*) DO
DISTRITO FEDERAL, BRASIL**

STELA SAMPAIO SILVA

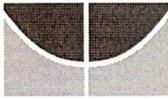
Orientador: Rafael Veríssimo Monteiro

Co-orientador: Simone Perecmanis

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 078/ 2013

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2013**



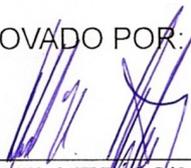
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E DETECÇÃO DE *CHLAMYDOPHILA PSITTACI* EM CALOPSITAS (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*) DO DISTRITO FEDERAL, BRASIL

STELA SAMPAIO SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADO POR:



RAFAEL VERÍSSIMO MONTEIRO, Professor Adjunto da Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB)
(ORIENTADOR)



GIANE REGINA PALUDO, Professor Adjunto da Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)



TÂNIA DE FREITAS RASO, Professor Doutor da Universidade de São Paulo (USP)
(EXAMINADOR EXTERNO)

Brasília, 15 de Fevereiro de 2013.

SILVA, S. S. Avaliação clínica, laboratorial e detecção de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Distrito Federal, Brasil. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 67 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Stela Sampaio
Avaliação e diagnóstico da ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) de criadores comerciais de Brasília-DF, Brasil. Stela Sampaio Silva.
Orientação de Rafael Veríssimo Monteiro – Brasília, 2013. 87 p.: il.
Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Clamidiose 2. Psitacídeos 3. Zoonose aviária

CDD ou CDU
Agris/FAO

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Saúde Animal em Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aos criadores e proprietários por aceitarem participar do projeto. Sem vocês esse projeto não seria possível.

Ao meu orientador pela paciência, conhecimento e dedicação. Por me ensinar a ter visão crítica e olhar de cientista. Obrigada por sempre estar disponível para me orientar e se desdobrando para conseguir o material para continuar o projeto. Obrigada pela oportunidade de atender como veterinária no Hospital Veterinário da UnB e poder participar de outros projetos. O conhecimento que adquiri nesses 2 anos vai muito além do meu mestrado.

Aos meus parceiros de coleta, mestrado e amigos Juliana Pigossi e Dênis Bonfim pela companhia, solidariedade, trabalho duro, dedicação, organização, compromisso e risadas. As coletas sem vocês não teria graça. Obrigada Juliana por sua ajuda com as anestésias, tem que ter muita calma para anestésiar esses pequenos animais. E obrigada Dênis por sempre me lembrar de passar os dados do experimento.

Aos colegas que me ajudaram nas coletas Ayisa Rodrigues e Rosana Thurler por serem minhas anestesistas e colegas de trabalho, e por disponibilizarem o seu escasso tempo livre em meio a uma residência para me ajudar.

Aos meus colegas residentes e funcionários do laboratório de patologia clínica veterinária da UnB: Thaís, Marcela Scalon, Wanessa Aparecida, Filipe Tavares, Daniela e Simone por sua paciência comigo mesmo quando isso significava parar a rotina e me ajudar. Em especial agradeço ao Filipe por ficar até 21 h comigo no laboratório para terminar as análises do sangue dos animais do meu projeto e a Thaís por me ajudar tanto com os bioquímicos. Obrigada também Marcela por me ensinar tanto sobre biologia molecular e sempre manter o laboratório pronto e organizado para usarmos, sem você as PCRs seriam uma dor de cabeça muito maior. Obrigada a todos pela ajuda e pelas brincadeiras, graças a vocês ir aos laboratórios sempre foi um prazer e tornou o processo do meu mestrado mais fácil.

À minha amiga, colega e parceira Aline Zorzan, por toda a ajuda que me ofereceu durante seu ano de residência, sem você eu nunca conseguiria fazer as

análises laboratoriais com o senso crítico e qualidade que fiz durante o projeto e pretendo continuar fazendo quando necessário durante a minha vida. Olho os exames com outros olhos agora graças a você. Obrigada pela companhia até tarde da noite fazendo os exames do projeto. Pela atenção, paciência e conversas. Obrigada por não ser só uma amiga de faculdade, mas uma colega, companheira e amiga por muito mais tempo que isso. Que nossa amizade vá ainda mais longe.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Veterinária pelas conversas e por me permitirem usar o espaço de vocês do laboratório e do freezer, não gosto nem de imaginar o que teria sido de mim sem esses espaços. Obrigada também por sempre me salvarem quando precisava de um material e não tinha tempo hábil para consegui-lo, isso agilizou as coletas. E pelas boas risadas e festas.

Ao professor Ricardo por liberar o material de anestésio, por nos ensinar a anestésiar e por liberar sempre que necessário sua residente Rosana.

À professora Simone, minha co-orientadora que vem me ajudando desde o primeiro semestre da graduação, por sempre me dar dicas e me incentivar. Por estar lá para conversas e dúvidas mesmo na correria do dia a dia. Obrigada por nunca me ter negado um favor e por me colocar no chão quando necessário.

À professora Giane pela imensa ajuda que me deu durante todo o projeto, não apenas me emprestando seu espaço, material e os orientados, como me auxiliando em todas as etapas de análises do material das coletas. Por disponibilizar parte do seu tempo para tirar minhas dúvidas sobre células e PCR. E agradeço também por aceitar participar da minha banca avaliadora.

À pesquisadora Tânia Raso por aceitar viajar até Brasília em pleno carnaval para participar da minha banca. Seus artigos aumentaram muito meu conhecimento sobre clamídiase.

Ao professor Gino por me ensinar um pouco de parasito, por me ajudar a analisar amostras e pela companhia e conversas.

Aos estagiários de silvestres Aline, Juliana Batista, Luciana Klüppel, Thamiris, Kássia, Marianne, Lorena e Rodrigo Koró pelo auxílio e esforço nas coletas e nos laboratórios. Sempre considerei o trabalho de vocês importante em todas as etapas e a companhia de vocês foi muito agradável, que a carreira de vocês seja excelente. Nunca desistam do que querem e contem comigo quando precisarem.

Aos estagiários do laboratório de patologia clínica Mauricio e Léo pelas brincadeiras, risadas e companhia e por quebrarem o galho quando necessário. Espero poder trabalhar com vocês um dia novamente.

Ao mestrando Rômulo pela companhia no laboratório quando ambos ficávamos plantados até tarde da noite por causa de nossos projetos e pelas dicas.

À minha família pela paciência e apoio durante o meu mestrado, sempre me incentivando a melhorar a minha educação.

Ao meu namorado Gustavo por não somente ser um namorado mais um amigo e colega de trabalho. Seu apoio e carinho sempre melhoraram meus dias, mesmo os mais difíceis.

Aos meus amigos de escola, graduação e mestrado por existirem, estarem comigo e serem pacientes com a minha ausência nos compromissos sociais e me perdoarem por sumirem alguns meses inteiros.

Aos animais por existirem e serem tão fascinantes a ponto de me fazerem dedicar a minha vida a vocês.

Sumário

CAPÍTULO I	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O animal hospedeiro: Calopsita.....	3
2.2 O agente: <i>Chlamydophila psittaci</i>	5
2.2.1 Classificação e histórico.....	5
2.2.2 Características morfológicas e de transmissão.....	5
2.2.3 Distribuição da <i>Chlamydophila psittaci</i>	6
2.3 A doença: Clamidiose.....	8
2.3.1 Patogenia.....	8
2.3.2 Sinais clínicos nas aves.....	9
2.3.3 Técnicas de Diagnóstico.....	12
Detecção do anticorpo anti- <i>Chlamydophila</i>	13
Detecção do agente <i>Chlamydophila</i>	14
Técnicas sorológicas.....	14
Técnicas Moleculares através da Reação em cadeia da polimerase.....	15
2.4 Ambiente: Criadores e proprietários.....	16
2.4.1 Prevenção.....	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO II.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
1.1.1 Locais de Coleta e espécie-alvo.....	29
1.1.2 Avaliação física.....	29
1.1.3 Contenção química e coleta do material biológico.....	29
1.1.4 Análise do material biológico.....	30
Hemograma e leucograma.....	31
Bioquímica sérica.....	31
1.1.5 Reação de cadeia da polimerase - PCR	32
Extração.....	32
PCR de sexagem das calopsitas.....	32
PCR de <i>Chlamydophila</i> das calopsitas.....	34
1.1.6 Análises estatísticas.....	35
2 RESULTADOS.....	36
3 DISCUSSÃO	44
3.1 Ocorrência de <i>C. psittaci</i> em calopsitas	44
3.2 Análise de hemograma e bioquímico das aves negativas na PCR.....	45
4 CONCLUSÃO.....	50
5 REFERÊNCIA.....	51
CAPÍTULO III.....	56
1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1: Número de machos e fêmeas totais das 106 calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>) analisadas.....	37
Tabela 2: Análise de hemograma e bioquímica sérica da calopsita (<i>Nymphicus hollandicus</i>) positiva na PCR para <i>C. psittaci</i> quando comparado com os negativos com a mesma faixa etária.	38
Tabela 3: Valores de hemogramas e bioquímicos das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>) negativas para <i>C. psittaci</i> de acordo com o fator faixa etária e sexo.....	40
Tabela 4: Valores médios, desvio padrão, máximo e mínimo dos valores paramétricos dos hemogramas e bioquímicos das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>) negativas para <i>C. psittaci</i>	43

Lista de Figuras

Figura 1: Calopsita (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	3
Figura 2: A) Contenção química; B) Swab cloacal; C) Coleta de sangue por punção da veia braquial; C) Sangue armazenado em microtubos com e sem anticoagulante.	30
Figura 3: A) Amostras após mistura de reagentes com o DNA extraído; B) Retirada de amostras do termociclador após ciclos da PCR; C) Aplicação do peso molecular padrão na primeira fileira do gel; D) Peso molecular na primeira fileira do gel.....	34
Figura 4: PCR de sexagem das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	36
Figura 5: PCR de <i>Chlamydophila psittaci</i>	39
Figura 6: Boxplot da variável proteína total quando analisado a interação entre sexo e faixa etária das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	41
Figura 7: Boxplot da variável fosfatase alcalina quando analisado a interação entre sexo e faixa etária das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	41
Figura 8: Boxplot da variável albumina quando analisado a interação entre sexo e faixa etária das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	42
Figura 9: Ficha de avaliação clínica utilizada durante a avaliação física e procedimento anestésico das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	57
Figura 10: Ficha de manejo sanitária utilizada para avaliar as condições sanitárias de cada criador ou propriedade aonde foram coletada amostra das calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>).....	58
Figura 11: Resultado da avaliação da condição sanitária dos criadores e proprietários das 106 calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>) analisadas.....	59
Figura 12: Resultado da avaliação da condição sanitária dos recintos das 106 calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>) dos criadores e proprietários analisados.....	60

RESUMO

Psitacídeos, como as calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), são frequentemente criados como animais de estimação. A ordem Psittaciforme é reconhecida como um dos principais reservatórios da bactéria *Chlamydophila psittaci*, causadora de uma zoonose. Essa bactéria por ser necessariamente intracelular, possui um diagnóstico difícil, normalmente sendo este por métodos sorológicos ou molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é considerada o método de maior sensibilidade e especificidade para detecção da clamídia. Essa pesquisa visou analisar a ocorrência de *C. psittaci* em calopsitas de criadores e proprietários do Distrito Federal, através de técnicas de biologia molecular (PCR). Para tal, foram coletadas amostras de sangue e swabs oral e cloacal de 106 aves. Análises sanguíneas foram realizadas para tentar caracterizar eventuais efeitos da infecção sobre a saúde dos animais. Na amostra analisada a ocorrência foi de 0,9%, resultante de apenas uma calopsita positiva. Este animal apresentava diarreia, e escore corporal baixo, sinais clínicos que podem caracterizar infecção por *C. psittaci*. Não houve alterações hematológicas e bioquímicas na ave positiva, quando comparado com os valores das demais aves analisadas. Ao analisar os valores de hemograma, leucograma e bioquímica sérica das aves negativas para clamídia, quando avaliados fatores: peso, faixa etária, sexo e interação entre esses dois fatores, foi possível notar diferenças estatística em algumas variáveis. As variáveis enzimáticas (FA, AST, proteína total) e heterófilos absolutos são influenciadas pelo sexo, e o hematócrito, hemoglobina e eosinófilos pela faixa etária. A baixa ocorrência de clamídia encontrada pode ser explicada pela boa qualidade sanitária dos locais de origem dessas aves.

Palavras chave: PCR, hemograma, calopsitas, psitacídeos, clamídia, ocorrência.

ABSTRACT

Psittacines such as cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) are often raised as pet birds. The Order Psittaciforme is recognized as one of the main reservoirs of the *Chlamydophila psittaci* bacteria, the ethiological agent of a respiratory zoonosis. This bacteria is an obligate intracellular, usually diagnosed by serological or molecular methods, i.e. Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR is considered the test with the best sensitivity and specificity for chlamydia detection. The purpose of this dissertation is to analyse the *C. psittaci* occurrence in cockatiels from commercial and non commercial breeders in Distrito Federal, through molecular technique (PCR). For this objective 106 birds were screened by oral and cloacal swab and blood sample. Blood analysis were performed to try to characterize haematological alterations effects on infected birds health. On this sample the prevalence found is 0.9%, from one positive tested cockatiel. The positive bird showed diarrhea, low body score, clinical signs that may characterize infection for chlamydia. No haematological alterations were found on the positive bird in comparison to the other tested birds. The hemogram, leukogram, and serum biochemical on the chlamydia negative birds when compared with weight, age groups, sex and age-sex interaction in some variables shown statistical difference. The enzymatic variables alkaline phosphatase (ALP), aspartate transaminase (AST), total protein, absolute neutrophil count (ANC) are influenced by sex, haematocrit (HCT), haemoglobin and eosinophils by age. The occurrence of chlamydia found may be explained by the good sanitary condition of the breeders facilities.

Keywords: PCR, hemogram, cockatiel, Psittacines, Chlamydia, occurrence

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A criação de aves exóticas como animais de estimação vem crescendo em todo o mundo e no Brasil não tem sido diferente. Algumas espécies silvestres podem ser comercializadas legalmente, desde que estejam na lista oficial do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), órgão governamental do Brasil responsável por fiscalizar a fauna silvestre nacional e exótica, garantindo que eles sejam vendidos por criadouros comerciais autorizados.

A calopsita (*Nymphicus hollandicus*) é uma ave de origem australiana, pertencente à ordem Psittaciforme, família Psittacidae (IUCN, 2012). Atualmente, é a segunda espécie de psitaciforme mais criada no mundo como ave de estimação, só perdendo para os periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) (AUSTRALIAN MUSEUM, 2006) e, desde 1998, foi classificada pelo IBAMA como pertencente à fauna doméstica. Esta espécie pode então ser comercializada e vendida como animal de estimação. A comercialização desse animal cresceu ao longo dos anos, devido ao comportamento dócil quando domesticado e seu pequeno tamanho, além de sua facilidade de criação. No entanto, qualquer animal, inclusive os silvestres, podem carrear parasitos com potencial zoonótico. As aves silvestres participam do ciclo de doenças infectocontagiosas que colocam em risco a saúde pública, como por exemplo, a febre do Oeste do Nilo ("West Nile virus"), salmonella e influenza aviária altamente patogênica causada pelo vírus H5N1.

A clamidiose, uma doença causada pela bactéria *Chlamydophila psittaci* é uma destas doenças de psitacídeos com potencial zoonótico (GERLACH, 1994). Muitas aves tornam-se infectadas cronicamente, não demonstrando sinais clínicos até um momento de queda de imunidade, como por exemplo, quando são submetidas a altos níveis de estresse. Estas carreadoras de *Chlamydophila psittaci* eliminam a forma infectante do micro-organismo intermitentemente, representando uma fonte significativa de infecção para humanos e outras aves (FUDGE, 1996). As calopsitas, eventualmente infectadas nos criatórios, são uma fonte importante de infecção para aqueles que venham a adquirir ou criar esse animal, ou mesmo para os trabalhadores dos criatórios.

Sendo assim essa pesquisa analisou a ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em

calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) de criadores comerciais do Distrito Federal, visto que esta é uma zoonose que pode colocar em risco a saúde das pessoas que irão adquirir esse animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O animal hospedeiro: Calopsita

A calopsita (*Nymphicus hollandicus*) é uma ave originária da Austrália, que pertence à ordem Psittaciforme, família Psittacidae, subfamília Cacatuinae (Figura 1). Esta ave foi inicialmente descrita pelo escritor e naturalista escocês Robert Kerr, em 1792, como *Psittacus hollandicus*. Em 1832, Wagler propôs a re-classificação da espécie em um novo gênero, *Nymphicus*, em homenagem às ninfas da mitologia (ITIS, 2013; IUCN, 2012).



Figura 1: Calopsita (*Nymphicus hollandicus*)
Fonte: Drew Avery. <http://www.flickr.com>.

Estas aves apresentam, em média, 30 a 33 cm de comprimento, 45 cm de envergadura e o peso varia de 80 a 150 gramas. Elas habitam regiões áridas e semi-áridas da Austrália, próximas a fontes de água, e possuem hábitos nômades, acompanhando o ciclo das chuvas, em busca de alimentos (FORSHAW; COOPER, 1981; HIGGINS, 1999). Na natureza, as calopsitas se alimentam principalmente de sementes, sendo a semente de sorgo a mais comumente ingerida. Possuem o hábito de se alimentar no solo e em bandos (JONES, 1987).

Em cativeiro, o sistema social dessas aves pode ser alterado quando comparado a natureza. O tamanho e comportamento dos grupos formados variam de acordo com o habitat e sazonalidade. Indivíduos jovens tendem a ser estritamente aglomerados, comumente permanecendo em grupos compactos como uma forma de

defesa. Os indivíduos adultos apresentam comportamento social mais agressivo quando em ambientes pequenos e com pouca disponibilidade de comida e água, permanecendo menos agregados e, em alguns casos os casais podem brigar constantemente. Porém, apesar desse comportamento mais agressivo, se forem amansadas desde filhotes, podem vir a apresentar um comportamento dócil. Animais jovens e adultos de ambos os sexos podem formar grandes grupos ou ainda subgrupos (RUPLEY, 1999).

Em 1838, John Gould, ornitólogo inglês, visitou a Austrália objetivando conhecer a fauna local e realizar ilustrações de aves. Ao retornar à Inglaterra, em 1840, Gould levou consigo 800 espécimes de aves e ninhos e ovos de mais de 70 espécies distintas. Acredita-se que esse pesquisador tenha sido a primeira pessoa a levar calopsitas para fora da Austrália, contribuindo para a divulgação da espécie (RUSSEL, 2011; HETHERINGTON).

Por volta de 1884, as calopsitas já se encontravam bem estabelecidas nos aviários europeus. Entretanto, a disseminação dessa ave ocorreu após o surgimento da primeira mutação de cor, o Arlequim, na Califórnia em 1949. Posteriormente, outros padrões de cores foram sendo fixados e a espécie foi se tornando cada vez mais popular, representando, atualmente, a segunda espécie de psitaciforme mais popular no mundo, como animal de estimação, ficando atrás somente dos periquitos australianos (AUSTRALIAN MUSEUM, 2006). A espécie passou a ser criada e comercializada no Brasil e de acordo com o Anexo 1 da Portaria no 93, de 07 de julho de 1998, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), a espécie *N. hollandicus*, incluindo suas mutações, é considerada como pertencente à fauna doméstica em todo o território nacional (IBAMA, 1998).

A criação de calopsitas no Brasil cresce a cada ano, se tornando um dos psitacídeos mais vendidos atualmente, sendo seus exemplares encontrados, em sua grande maioria, em criadouros comerciais particulares e em estabelecimentos comerciais (BENEZ, 2001). O Brasil é um país tropical, com temperaturas médias elevadas, altos índices de umidade e com grandes quantidades e variedades de frutas e sementes. Esta riqueza ambiental proporciona condições favoráveis para que muitas doenças em aves, especialmente respiratórias e digestivas

desenvolvam-se rapidamente, o que não acontece nos ambientes semi-áridos ou desérticos (VERSTAPPEN; LUMEIJI; BRONNERBERG, 2002).

2.2 O agente: *Chlamydophila psittaci*

2.2.1 Classificação e histórico

A clamidiofilose ou clamidiose é uma doença infecciosa causada por um parasita intracelular obrigatório, a *Chlamydophila psittaci* pertencente a família *Chlamydiaceae*. Essa bactéria infecta muitas espécies de aves silvestres, domésticas e exóticas. De acordo com Calnek et al. (1991) os psitacídeos são os hospedeiros preferenciais dessa bactéria, mas esta pode infectar também mamíferos domésticos e seres humanos quando este entra em contato com animais portadores. Kaleta & Taday (2003) compilaram dados de *C. psittaci* em 460 espécies aviárias e apontaram a ordem Psittaciforme com o maior percentual de espécies positivas (45%). A clamidiose foi descrita inicialmente em humanos por Morange (1895). À época, foi constatada a presença de um agente infeccioso, confirmadamente transmitido por papagaios, por isso recebeu o nome inicial de psitacose, da palavra grega *psittacus*, que significa papagaio (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995).

Inicialmente essa bactéria foi classificada como vírus e por algum tempo como riquetsia, sendo denominada anteriormente como *Chlamydia psittaci*. Atualmente, o gênero *Chlamydia* é dividido em *Chlamydia* e *Chlamydophila* e a bactéria passou a se chamar *Chlamydophila psittaci*. Esta possui pelo menos quinze genótipos registrados, alguns relacionados às aves nas quais foram isolados (OIE, 2012). Genótipos A, B, C, D, E são alguns exemplos, sendo que de acordo com Harkinezhad (2007), o genótipo A é endêmico em psitacídeos e um dos mais virulentos para aves e humanos.

2.2.2 Características morfológicas e de transmissão

A *C. psittaci* é um cocobacilo Gram-negativo, com 200 x 1.500 nm, ou mais, de tamanho. Seu envoltório celular é semelhante à parede celular de outras bactérias Gram-negativas, exceto por não possuírem peptidoglicano (PROENÇA; FLAGLIARI; RASO 2011; BIBERSTEIN; HIRSH, 2003). Esta bactéria possui em sua membrana externa uma proteína imunodominante denominada “principal proteína

externa de membrana” (major outer membrane protein), denominada MOMP, com aproximadamente 60% do peso do envoltório. Outro importante constituinte da membrana é o lipopolissacarídeo clamidial (LPS). Ambos representam importantes antígenos de superfície de membrana com uso para diagnósticos específicos (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003).

As clamídias possuem 3 formas distintas, de acordo com o momento de seu ciclo de desenvolvimento. O Corpúsculo Elementar (CE), que é a forma infectante, pequena (200-300 nm), densa, metabolicamente inativa, resistente no ambiente externo. O Corpúsculo intermediário (CI) tem 300 -1.000 nm, é uma forma transitória entre o CE e o CR. O Corpúsculo Reticulado (CR), forma não infectante, metabolicamente ativa, 500 - 1.000 nm, sensível às condições ambientais e menos eletrodensa na microscopia eletrônica (MOULDER, 1991; ANDERSEN; VONROMPAY, 2003; CARDOSO, 2006).

O ciclo de desenvolvimento inicia-se com a endocitose do CE pelas células eucarióticas. Os CE então permanecem no interior de inclusões intracitoplasmáticas, sofrem transformação para a forma ativa (CR) e se multiplicam por divisão binária. Durante este processo, a *C. psittaci* passa por uma fase transitória, sendo classificada como CI durante o processo de maturação para se tornarem novos CEs. Após 24-48 horas, dependendo da espécie, novas formas infectantes (CEs) podem ser liberadas por ruptura celular e iniciam um novo ciclo em uma nova célula hospedeira (MOULDER, 1991; ANDERSEN; VONROMPAY, 2003, LONGBOTTOM; COULTER, 2003). A infecção persistente pode ocorrer com a permanência dos CEs no citoplasma do hospedeiro (ANDERSEN; VONROMPAY, 2003).

A *C. psittaci* é uma bactéria que depende da energia e de aminoácidos das células infectadas para se desenvolver (WYRICK; RICHMOND, 1989), sendo esses requisitos o que dificulta sua cultura extracelular (GERLACH, 1994; GYLSTORFF, 1987; GRIMES, 1991). Esta bactéria infecta preferencialmente células epiteliais de mucosas e macrófagos mononucleares (WYRICK; RICHMOND, 1989).

2.2.3 Distribuição da *Chlamydophila psittaci*

Os psitacídeos são considerados por alguns autores o principal reservatório de *C. psittaci*, devido a esta bactéria ser encontrada frequentemente nestas aves. Entretanto, pesquisas mostram que existem diversas outras espécies de aves que

podem infectar-se com essa bactéria. Yang e colaboradores (2011) encontraram 60% (12/20) de pavões (*Pavo cristatus*) soropositivos para a bactéria. Deem e colaboradores (2012) encontraram DNA de *C. psittaci* em 2,32% (2/86) em amostras de falcões-do-galápagos (*Buteo galapagoensis*) analisados. Dickx et al. (2010a), encontraram DNA de *C. psittaci* em 87% (11/13) e 57% (4/7) em amostras de swabs de galinhas e perus respectivamente.

Travineck et al. (2002), encontraram uma soroprevalência de 37,4 % (103/275) em faisões, enquanto que encontrou em pombos (*Columba livia*) uma prevalência de 61,5% (168/273). Alguns autores encontraram prevalências menores em pombos do que este autor, ao utilizar o PCR como teste diagnóstico, como Geigenfeind e colaboradores (2011) que encontraram uma prevalência de 8,4% (17/202) na cidade da Basiléia, Suíça . Em Gent, Bélgica, Dickx et al. (2010b) encontraram uma prevalência de 1,6% (1/61) e em Lucerna na Suíça, Zweifel (2009) encontrou resultado semelhante ao de Dicx et al. (2010b), sendo 3,3% (2/60) de pombos positivos para *C. psittaci*.

Através desses estudos mencionados é possível notar que a clamídia não só pode ocorrer em aves que não são Psitaciformes, como também tem distribuição mundial. Assim como a Europa e China, a clamídia foi encontrada em várias regiões da América. Na Colômbia, uma pesquisa com 138 *Amazonas sp.* em diferentes zoológicos, utilizando ELISA para detecção da proteína de membrana (MOMP) de *C. psittaci* como teste sorológico, foi detectado 85% (118/138) de animais soropositivos; nessa mesma pesquisa foi realizada a coleta de amostras de 39 trabalhadores desses mesmos zoológicos, sendo encontrado 30 (78%) trabalhadores soropositivos para o agente (MONSALVE; MIRANDA; MATTAR, 2011). Em contraste, na Bolívia na zona de Gran Chaco, não foi encontrado anticorpos anti-clamídia em 54 papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) analisados (DEEM et al., 2005). No Peru, no parque Nacional do Manu ("Parque Nacional del Manú"), também não foi encontrado soropositividade para *C. psittaci* em 35 periquitos-da-cabeça-suja (*Aratinga weddellii*) e em 13 periquito-testinha (*Brotogeris sanctithomae*) analisados (GILARDI et al., 1995).

No Brasil, um estudo realizado na zona do Pantanal obteve uma prevalência em papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) de 6,3% (2/32) e em Araras azuis

(*Anodorhynchus hyacinthinus*) de 37% (17/45) das aves avaliadas (RASO et. al., 2006). Enquanto em papagaios (*Amazona sp.*) em cativeiro no Brasil, foi encontrada uma soroprevalência de 16 a 56% (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002). Monsalve e colaboradores (2011) discutem que a ausência de anticorpos nas aves avaliadas na Bolívia e Peru pode ser devido as condições em vida silvestre do local onde são capturados os exemplares estudados, e possivelmente a altitude e variabilidade do clima dessas regiões durante o ano (MONSALVE; MIRANDA; MATTAR, 2011). No entanto, a comprovação da presença de *C. psittaci* no Brasil e na Colômbia contradizem Monsalve e colaboradores (2011), pois assim como o Peru e a Bolívia, esses países pertencem a América do Sul, possuindo semelhanças em sua fauna e clima.

2.3 A doença: Clamidiose

2.3.1 Patogenia

A suscetibilidade à *C. psittaci* pode variar de acordo com a espécie hospedeira. Aves jovens são geralmente mais suscetíveis à infecção que adultos. Arara e papagaios do gênero *Amazona*, como por exemplo o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), parecem ser mais susceptíveis que Psittaciformes do sul da Ásia, Austrália, e ilhas relacionadas. A virulência e toxicidade de cepas mais adaptadas à um determinado hospedeiro podem ser mais severas quando esta infecta uma espécie diferente (GERLACH, 1994). Muitas aves podem permanecer persistentemente infectadas e não apresentarem sinais clínicos até um momento de queda de imunidade.

A patogenia aviária da clamidiose ocorre principalmente pela liberação de toxinas presentes na superfície da clamídia, que afetam diversos órgãos como os do sistema respiratório, coração, rins e fígado. A superfície do corpúsculo elementar (CE) contém componentes hepatotóxicos e nefrotóxicos que desaparecem uma vez que este entra na célula hospedeira. Esses componentes induzem a produção de anticorpos que neutralizam as toxinas e impede a infectividade (GERLACH, 1994). O resultado da infecção é determinado pelos macrófagos mononucleares, se um CE é fagocitado e não está coberto por opsonina, moléculas que facilitam e aumentam a capacidade do englobamento pelos fagócitos, este pode sobreviver e replicar no

interior do macrófago. Linfocinas secretadas pela ativação de linfócitos T inibem a replicação da clamídia encontrada em fagossomos; para manter essa inibição as linfocinas devem ser secretadas continuamente. Durante infecções persistentes, a clamídia permanece dentro de um fagossomo ligado à membrana e libera progênie infecciosa e antígenos via exocitose, tornando difícil a remoção do microorganismo pelo hospedeiro de uma célula infectada (BYRUE, 1982). Além disso, antígenos liberados da célula na exocitose podem não serem processados de uma forma que sejam reconhecidos por citotoxina classe I restrita a linfócitos T (“class I-restricted cytotoxic T-lymphocytes”). Isso permite que infecção e provavelmente reinfeção ocorram e sejam mantidas na presença de altos níveis de resposta humoral dos anticorpos (WYRICK; RICHMOND, 1989).

Quando uma cepa virulenta de clamídia é inalada, a propagação inicial ocorre dentro de células epiteliais de pulmões e sacos aéreos, propagando dos sacos aéreos para membranas serosas adjacentes podendo levar à inflamação da serosa e pericardite (KRAUSS; SCHMEER, 1992). Se o agente for ingerido, acredita-se que este comece a replicação no trato intestinal (GERLACH, 1994). O período de incubação para esta bactéria é difícil de determinar devido à tríade epidemiológica em cada situação; virulência da cepa infectante, hospedeiro e condições do ambiente do mesmo. O tempo mínimo encontrado de incubação em Psittaciformes é de 42 dias (MEYER et al., 1958). Guzman et al. (2010) encontraram em sua pesquisa o antígeno de *C. psittaci* em animais infectados com a bactéria apenas no 16º dia após sua inoculação, período em que surgiram os sinais clínicos. Page (1959), em estudo com perus infectados experimentalmente por meio de aerosol contaminado com *C. psittaci*, detectou a bactéria no sistema respiratório após 4 horas, no sangue, rins, fígado e baço após 48 horas e nas fezes depois de 72 horas, com sinais clínicos aparentes apenas 5 a 10 dias após a infecção.

2.3.2 Sinais clínicos nas aves

Os animais infectados com *C. psittaci* podem estar assintomáticos ou sintomáticos. Psitacídeos podem viver infectados com clamídia durante muitos anos sem apresentar sinais clínicos evidentes da doença, ou seja, são assintomáticos, representando muitas vezes um desafio para o diagnóstico. Estas aves permanecem como portadoras, podendo eliminar o agente de forma intermitente, representando

uma fonte significativa de infecção para humanos e outras aves (FUDGE, 1996; GERLACH, 1994). Algumas aves assintomáticas podem se tornar sintomáticas por uma queda de imunidade e, se esta for restabelecida, podem voltar a serem assintomáticas. Gerlach (1994) considera que animais jovens e debilitados são mais susceptíveis ao agente e frequentemente são sintomáticos. No caso de animais sintomáticos, esses podem apresentar três formas de apresentação clínica que variam de acordo com a virulência da cepa infectante de *C. psittaci* e da espécie hospedeira, sendo essas formas: aguda, subaguda ou crônica (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003; GERLACH, 1994).

Na forma aguda o animal desenvolve a doença rapidamente, normalmente em aves expostas à uma cepa de alta virulência e em animais muito debilitados que não conseguem combater a doença. As formas subagudas e crônicas ocorrem principalmente em espécies de aves adultas expostas à uma cepa de baixa virulência, estas podem ser carreadores do agente por meses de forma assintomática, mostrando-os apenas em um momento de queda de imunidade, causada por exemplo por infecção por outro parasito e/ou estresse. Nessa condição, as aves permanecem como portadoras, podendo eliminar o agente de forma intermitente (GERLACH, 1994; ANDERSEN; VANROMPAY, 2003).

Os sinais da doença são inespecíficos e a bactéria causa lesões em órgãos de diversos sistemas, como o sistema respiratório, digestório, renal e em casos mais severos também podem atingir o sistema nervoso. O sistema respiratório normalmente é afetado quando a infecção ocorre através de inalação do agente, mas pode ocorrer em casos mais avançados da doença mesmo quando a infecção for primariamente no trato digestório. As lesões causadas nas células pulmonares e nos sacos aéreos levam à inflamação e acúmulo de secreção serosa e/ou caseosa, causando congestão pulmonar, aerosaculite e broncopneumonia. O animal com essas lesões irá apresentar dificuldade respiratória, normalmente caracterizada por dispneia, taquipneia, balançar aumentado de cauda, abertura frequente do bico, secreção nasal e intolerância ao esforço (GERLACH, 1994; NASPHV, 2010).

O sistema digestório é afetado normalmente em casos de infecção através de ingestão do agente ou em casos mais severos da doença quando a infecção for primariamente no sistema respiratório. O órgão mais afetado desse sistema é o

fígado, mas outros tecidos do trato gastro intestinal também podem ser atingidos. Lesões no fígado ocorrem devido às hepatotoxinas presentes na superfície da clamídia. Estas toxinas causam lesões nos hepatócitos aumentando o extravasamento de aspartato aminotransferase (AST) na corrente sanguínea e consequente redução dos níveis de albumina sérica. Essas lesões podem progredir para uma hepatomegalia e/ou hepatite. Enterites também ocorrem em infecções por clamídia, levando ao aumento do fluxo gastro intestinal e consequentemente a uma diarreia e desidratação por perda constante de líquido nas fezes. A coloração dos uratos pode se tornar esverdeada devido à lesão hepática (GERLACH, 1994; PROENÇA; FLAGLIARI; RASO, 2011).

O sistema renal pode ser atingido tanto em infecções por via aérea quanto digestiva. As nefrotoxinas liberadas pelo agente causam lesões renais, podendo chegar à nefrose. Essas lesões levam ao aumento sérico de ácido úrico e consequente aumento da excreção de urato, além de poliúria por deficiência de filtração pelos túbulos renais lesionados. Lesões renais causadas pela *C. psittaci* reduzem a produção de eritropoetina e consequentemente ocorre uma menor produção de hemácias levando à uma anemia hipoplásica. O comprometimento do sistema renal, digestório e/ou respiratório leva a ave apresentar depressão, letargia e plumagem eriçada consequente de febre causada por infecção sistêmica (GERLACH, 1994; PROENÇA; FLAGLIARI; RASO, 2011).

O sistema nervoso central é atingido mais raramente, sendo afetado quando a doença está em um estágio muito avançado e a ave está próxima da morte. Danos cerebrais e edema causam convulsões, opistótono e tremores. Além desses sistemas, a clamídia frequentemente atinge o globo ocular, causando inflamações e levando a ceratoconjuntivite e blefarite (GERLACH, 1994; RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002). Ceratoconjuntivite, muitas vezes recorrente, pode ser em alguns casos o único sinal clínico aparente (GERLACH, 1994; NASPHV, 2010).

Esplenomegalia, pericardite e peritonite fibrinosa também podem ocorrer na forma aguda da doença. Em infecções crônicas é comum que as aves apresentem anemia, secundárias às pan-mielopatias (“panmyelopathy”) e lesões renais. Danos musculares e hepáticos ocasionam o aumento sérico das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e AST, respectivamente, podendo os níveis séricos destas

enzimas estarem 5-10 vezes acima dos valores padrões da espécie (GERLACH, 1994; GYLSTORFF, 1987). Além disso, nessa forma crônica podem ocorrer cirrose e fibrose renal (GERLACH, 1994).

Na necropsia os achados para clamídia são inespecíficos e normalmente limitados ao fígado, baço, pulmão, sacos aéreos e coração (LONGBOTTOM; COULTER, 2003; GERLACH, 1994). Algumas anormalidades que podem ser encontradas são: congestão nos pulmões, pneumonia fibrinosa, aerosaculite fibrinosa, esplenomegalia, lesões necróticas multifocais no fígado, peri-hepatites, pericardites e peritonites. Esplenomegalia é discutida como um achado frequente em clamidiose, no entanto, aerosaculite é mais indicativa de clamidiose em Psittaciformes. Em machos podem ser encontradas também orquites ou epididimites levando a infertilidade; ooforites são raras (GERLACH, 1994).

Raso e colaboradores (2002), descreveram os sinais clínicos de clamidiose em 95 filhotes de *A. aestiva* durante um surto da doença em São Paulo provenientes de tráfico, sendo submetidos a manejo inapropriado. Os animais apresentavam sinais clínicos condizentes com o descrito na literatura para a doença, sendo esses: letargia, dispneia, penas eriçadas, anorexia, diarreia esverdeada, poliúria, desidratação, emagrecimento e conjuntivite. Nesse estudo os autores encontraram uma taxa de mortalidade de 96,5%. A taxa de morbidade varia de acordo com a patogenicidade da cepa envolvida, de 50 a 80% em cepas muito patogênicas e de 5 a 20%, nas pouco patogênicas. O mesmo ocorre com a taxa de mortalidade, que pode variar de 10 a 30%, quando a cepa é muito virulenta, e de 1 a 4% no caso de cepa menos virulenta (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003).

2.3.3 Técnicas de Diagnóstico

O diagnóstico de clamidiose em aves é dificultado pela ausência de sinais clínicos patognomônicos que associados aos exames complementares (radiológico, hematológico e bioquímico), são apenas sugestivos da doença (FUDGE, 1996; RASO et al., 2004). Porém um diagnóstico rápido e definitivo é necessário, devido ao potencial zoonótico da infecção. O aumento na contagem de leucócitos, alterações nas atividades de enzimas hepáticas, imagens radiográficas ou ultrassonográficas mostrando aumento de fígado e baço, bem como alteração em sacos aéreos são indicativos da infecção por *C. psittaci* (LONGBOTTOM;

COULTER, 2003).

Podem ser realizados outros testes complementares para confirmação da presença da bactéria. O isolamento da bactéria através da inoculação em ovos embrionados ou linhagens celulares permite avaliar a viabilidade da bactéria e a posterior identificação através de técnicas moleculares e bioquímicas. Porém, os cuidados referentes à coleta da amostra para evitar contaminações, e a necessidade de transporte adequado, somados à necessidade de laboratórios com biossegurança nível três para a manipulação da *C. psittaci*, dificulta a realização do procedimento na rotina clínica (LEY et al., 1993; FUDGE, 1997; SACHSE et al., 2009). Por essa razão outras técnicas são mais utilizadas como forma de detecção da bactéria (SACHSE et al. 2009; NASPHV, 2010, COOPER, 2002).

Detecção do anticorpo anti-Chlamydomphila

O diagnóstico sorológico é um procedimento auxiliar aos testes de detecção de *Chlamydomphila*. Os anticorpos anti-*C. psittaci* são regularmente produzidos pelo hospedeiro infectado, embora tenham pouco ou nenhum fator protetor, já que CEs podem ser liberados mesmo na presença de elevado título de anticorpos. Um resultado positivo é evidência de que a ave foi infectada com a bactéria em um dado momento, mas não indica, necessariamente, que a ave tenha uma infecção ativa. Resultados sorológicos falso-negativos podem ocorrer em infecções agudas ou iniciais, em que ainda não houve tempo para soroconversão. Uma sorologia negativa pode acontecer em aves jovens ou com imunossupressão. O tratamento com antimicrobianos pode diminuir a resposta imune. Vale ressaltar que o título de IgG pode permanecer alto mesmo após tratamento bem sucedido (RASO et al., 2004; SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010).

A sorologia é mais confiável quando associada ao histórico, sinais clínicos e exames complementares. A comparação da excreção do antígeno e anticorpo mostra que aves infectadas com sinais clínicos de clamidiose possuem altas titulações de anticorpos e excretam clamídia em maior quantidade que aves assintomáticas. Porém, a sorologia é considerada diagnóstica quando a titulação encontra-se aumentada quatro vezes em amostras pareadas (com intervalo de duas a quatro semanas entre coletas) ou quando associada à presença do antígeno, mesmo em animais assintomáticos (RASO et al., 2004; NASPHV, 2010). Os

principais testes sorológicos para clamidiose incluem o teste de aglutinação dos corpos elementares, teste de imunofluorescência indireta, ELISA e teste de fixação do complemento direto e modificado (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003; RASO et al., 2004; SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010).

Entre os testes de fixação de complemento (FC) direto e modificado, o modificado é o mais sensível para detecção sorológica de *Chlamydia*; porém, falso-negativos são descritos em algumas espécies de aves (ANDERSEN; VANROMPAY, 2003; RASO et al., 2004; SACHSE et al., 2009; NASPHV, 2010). Certas aves, positivas em testes de ELISA, podem produzir resultados positivos ou negativos no teste de fixação de complemento. Gerlach (1994), cita um experimento com infecção por clamídia por dez meses em que os anticorpos de FC decrescem consideravelmente, enquanto ELISA demonstra um crescimento contínuo. Essa pesquisa sugere que a composição dos anticorpos detectados varia e apenas os anticorpos detectados por ELISA são estimulados pela permanente presença da clamídia dentro da célula. Resultados falso-negativos podem ocorrer em testes sorológicos em infecção recente (“janela imunológica”), pela falta de anticorpos produzidos até o momento do teste, ou em casos de animais em tratamento, pela inibição de produção de anticorpos e em reações cruzadas com outras bactérias (GERLACH, 1994).

Detecção do agente *Chlamydia*

Técnicas sorológicas

O 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 a infecção em animais, pois detecta todas as espécies de *Chlamydiaceae* (OIE, 2012). Comparações entre kits e culturas celulares indicam que resultados falsos-negativos ocorrem em ELISA quando há um número insuficiente de partículas bacterianas na amostra (menos de 2,5 ng [600 corpos elementares]), ou no caso de excreção intermitente da bactéria (BIENDL, 1992; THIELE, 1990; PROENÇA; FLAGLIARI; RASO, 2011).

Um dos problemas com esse tipo de teste deve-se ao fato de a LPS da clamídia

dividir epitopos com outras bactérias Gram-negativas e esses epitopos podem causar reação cruzada, resultando em um elevado número de resultados falsos-positivos. Por causa do grande número de resultados falsos-positivos, um indivíduo sem sinais clínicos da doença com resultado positivo na ELISA não é considerado significativo, mas é indicado a realização de mais testes nesse indivíduo utilizando outros métodos diagnósticos. Os testes de imunofluorescência são baseados nos antígenos MOMP e LPS da membrana da bactéria e têm as mesmas vantagens e desvantagens citadas anteriormente (SACHSE et al. 2009; NASPHV, 2010).

Técnicas Moleculares através da Reação em cadeia da polimerase

A detecção direta do DNA da *Chlamydomphila* é considerado um dos métodos mais confiáveis de diagnóstico, devido a alta sensibilidade e especificidade do método. A PCR amplifica exponencialmente uma porção alvo da molécula de DNA, formando milhões de amplicons. Esta característica explica a sensibilidade e especificidade da PCR, bem como a capacidade dos testes diagnósticos que usam esse método para detectar patógenos presentes em número reduzido. Essa sensibilidade também explica o grande cuidado que deve-se tomar ao trabalhar com DNA amplificado, pois cada um dos produtos da PCR podem contaminar um espécime clínico caso seja liberado no ambiente, ocasionando uma reação falso positiva, sendo esta uma das desvantagens dessa técnica (KONEMAN et al., 2006). O diagnóstico através da PCR é o único método comercial disponível para diagnóstico de *C. psittaci* no país (PROENÇA; FLAGLIARI; RASO, 2011).

O material a ser colhido para a PCR dependerá da metodologia utilizada. Amostras de fezes, swabs de cloaca ou de orofaringe são as mais utilizadas. Porém, a excreção intermitente do microrganismo pode prejudicar a detecção da bactéria, favorecendo a ocorrência de falsos-negativos (RASO et al., 2004; GODOY, 2007). Para tanto, sugere-se a colheita de material durante dois ou três dias consecutivos, o qual deve ser mantido em meio de transporte adequado (RASO et al., 2004).

Testes usando PCR para detecção de *C. psittaci* utilizam como alvo o gene *ompA* ou o gene 16S-23S rRNA (EVERETT; HORNING; ANDERSEN, 1999; GEENS et al., 2005; MESSMER et al., 1997; PANTCHEV et al., 2009; SACHSE; HOTZEL, 2003; VAN LOOCK et al., 2005). A sensibilidade e especificidade variam de acordo com a preparação da amostra e o teste de PCR (DEGRAVES; GAO;

KALTENBOECK, 2003). A extração de DNA pode ser feita através de kits comerciais de extração de acordo com a amostra utilizada ou reagentes mais baratos, como por exemplo o fenol-clorofórmio (ANDERSEN; VANROMPAY 2005). A sensibilidade pode ser aumentada utilizando como alvo um segmento de DNA relativamente curto, usando nested PCR ou a técnica da PCR em tempo real (real-time PCR). No entanto, o risco de contaminação é aumentado se não for tomado maiores cuidados na manipulação das reações (OIE, 2012).

Nos últimos anos, a PCR em tempo real, tem se tornado o método preferencial para diagnósticos laboratoriais por rapidez, alto rendimento e fácil padronização (SACHSE, 2009). Essa tecnologia requer uma sonda molecular marcada com um fluorescente (“fluorescent-labelled probe”) e um equipamento especial, que elevam o custo da PCR. Sua sensibilidade pode ser equivalente a nested PCR, mas os problemas de contaminação e trabalho são reduzidos quando baseados em uma única reação em um sistema fechado (EVERETT; HORNING; ANDERSEN, 1999; GEENS et al., 2005 ; PANTCHEV et al., 2009).

2.4 Ambiente: Criadores e proprietários

2.4.1 Prevenção

A transmissão ocorre através da forma infectante, o CE, eliminados em secreções orais, e/ou nasais, e nas fezes. Animais não-infectados podem se infectar ao inalar e/ou ingerir esses CE eliminados por aves infectadas, que podem estar presentes em poeira fecal aerossolizada, comedouros e bebedouros. Além disso, pais infectados podem infectar seus filhotes por via oral no momento da alimentação no ninho (PAGE, 1959; ANDERSEN & VANROMPAY, 2003; RASO et al., 2004). A alta densidade de animais por recinto aumenta as chances de transmissão da doença, devido ao maior contato físico entre eles e a utilização do mesmo bebedouro e comedouro por animais infectados e não infectados (GERLACH, 1994).

Devido aos riscos epidemiológicos da *C. psittaci* e por sua característica zoonótica é necessário um controle e profilaxia rígido e constante para evitar a presença e disseminação da doença entre e dentro dos criadouros, além de tentar evitar a transmissão da doença para humanos. Uma das principais maneiras de prevenir a transmissão de *C. psittaci* quando existe uma ave infectada no local, é a

manutenção de uma boa qualidade sanitária nos recintos. Os CEs possuem baixa resistência à desinfetantes, calor e luz solar, mas são viáveis por um longo período em secreções secas de animais ou água a temperatura ambiente (ANDERSEN; VAMROMPAY, 2003), por isso uma boa qualidade sanitária auxilia na prevenção da transmissão da doença.

Outras medidas devem ser tomadas em conjunto com a limpeza dos recintos para um melhor controle sanitário. A manutenção de um número aceitável de aves por recinto de acordo com o tamanho do mesmo, evitando uma alta densidade de aves no mesmo local, auxilia a reduzir as chances de transmissão da doença de aves infectadas para não-infectadas (SMITH et. al., 2005). As aves infectadas devem ser isoladas e tratadas ou eutanasiadas, pois ainda não é comprovado a total eficácia dos tratamentos existentes para eliminação completa da clamídia.

Aves recém-chegadas nos criadouro e/ou propriedade devem serem realizadas quarentena, avaliação clínica e teste de doenças infectocontagiosas, como a clamidiose. Se essas novas aves não possuírem doenças infectocontagiosas e estiverem saudáveis poderão ser colocadas junto com as outras aves do local. Além do controle de novas aves que entram no criador e/ou propriedade, deve-se realizar exames periódicos por metodologias confiáveis nas aves já existentes no local, pois aves silvestres de vida livre infectadas também podem infectar as aves do plantel (SMITH et. al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos geral

Avaliação e diagnóstico da ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) de criadores comerciais de Brasília, DF.

3.2 Objetivos específicos

a) Verificar a ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas nos criadores comerciais e de proprietários do DF.

b) Avaliar a condição física das aves amostradas comparando entre animais negativos e positivos no teste de PCR.

c) Realizar a sexagem por meio da técnica de PCR de todas as aves para diferenciação por gênero.

c) Comparação hematológica e bioquímica de animais negativos para *C. psittaci* entre sexos, faixa etária e entre locais de criação.

4 REFERÊNCIAS

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.; VANROMPAY, D. Chlamydiosis. *In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, Fifth Edition. Submitted USA, 2005.

BENEZ, S.M. Aves: Criação, Clínica, Teoria, Prática. São Paulo – SP: Robe Editorial, 2001, 522 p.

BIENDL, A. Chlamydia psittaci Diagnostik bei Psittaciformes: Schnelltest zum Antikörpernachweis mittels LatexAgglutination bzw. zum Antigennachweis mittels eines kommerziellen Latextestes (Clearview Chlamydia®). **Vet Diss**, München, 1992.

BIRCHARD, S.J., SHERDING, R.G. Clinica de pequenos animais. Manual Saunders, ed. Roca, p.1406-08, 1998.

BirdLife International 2012. *Nymphicus hollandicus*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 19 Fev. 2013.

BYRUE, G., et al: Lymphokine mediated microbiostatic mechanisms restrict Chlamydia psittaci growth in macrophages. **J Immunol**, v. 128, p. 469-473, 1982.

CALNEK, B.W., JOHN, B.H., BEARD, C.W., REID, W.M., YODER, H.W. Diseases of poultry. Ed. 9, Chlamydiosis (Ornithosis), cap. 14, p.311-25, 1991.

CARDOSO, M.V. Clamidofiloses (clamidioses) em pequenos ruminantes. **Biológico**, São Paulo, v.68, n.1/2, p.11-12, 2006.

COOPER, J.E.; Birds of Prey: Health & disease. 3a Ed, Blackwell, 345p, 2002.

DEGRAVES, F. J.; GAO, D.; KALTENBOECK, B. High-sensitivity quantitative PCR platform. **Biotechniques**, vol. 34, n. 1, p.106 –115, 2003.

DEEM, S. L.; NOSS, A. J.; CUELLAR, R. L.; KARESH, W. B. Health evaluation of free-ranging and captive Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolivia. **J. Zoo Wildlife Med.**, v. 36, p. 598-605, 2005.

DEEM, S. L.; RIVERA-PARRA, J. L.; PARKER, P. G. Health evaluation of Galapagos Hawks (*Buteo galapagoensis*) on Santiago Island, Galapagos. **J Wildl Dis.** v. 48, n. 1, p. 39 - 46, 2012.

DICKX, V.; GEENS, T., DESCHUYFFELEER, T. ; TYBERGHEIN, L.; HARKINEZHAD, T.; BEECKMAN, D.S.; BRAECKMAN, L.; VAMROMPAY, D. Chlamydophila psittaci zoonotic risk assessment in chicken and turkey slaughterhouse. **J Clin Microbiol.** v. 48, n. 9, p. 3244-3250, 2010a.

DICKX, V.; BEECKMAN, D. S. A.; DOSSCHE, L.; TAVERNIER, P.; VONROMPAY, D. Chlamydophila psittaci in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. **J Med Microbiol**, v. 59, p. 1348–1353, 2010b.

EVERETT, K. D. E.; HORNUNG, L. J.; ANDERSEN, A. A. Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. **J. Clin. Microbiol.**, vol 37, p. 575 – 580, 1999b.

FORSHAW, J. M.; COOPER, W. T. Australian Parrots. Melbourne: Lansdowne Press. 1981.

FUDGE, A. M. Clinical application of the Chlamydia ELISA procedure. VII. **DVG Tagung Vogelkrht**, München, p. 290-293, 1990.

FUDGE, A.M. Avian chlamydiosis. In: ROSSKOPF, W.J.Jr., WOERPEL, R.W. (Eds.), Diseases of Caged and Aviary Birds. Williams and Wilkins Company, Malvern, p. 572–585, 1996.

FUDGE, A. M. A review of methods to detect *Chlamydia psittaci* in avian patients. *J Avian Med Surg*, v. 11, p. 153–165, 1997.

GEENS, T.; DEWITTE, A.; BOON, N.; VANROMPAY, D. Development of a *Chlamydia psittaci* species-specific and genotype-specific Real-Time PCR. **Vet. Res.**, vol 36, p. 1 – 11, 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.

GEIGENFEIND, I.; VAMROMPAY, D.; HAAG-WACKERNAGEL, D. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in the feral pigeon population of Basel, Switzerland. **J Med Microbiol.** Vol. 61 (Pt 2), p. 261-5. 2011.

GILARDI, K.V.; LOWENSTINE, L. J.; GILARD, J. D.; MUNN, C. A. A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. **J. Wildlife Dis.**, v. 31, p. 523-528, 1995.

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

GRIMES, J. E., *et al*: Chlamydiosis (ornithosis). In: CALNEK, B.W, et al (eds): **Diseases of Poultry 9th Edition.** Wolfe Publishing, p. 311-325, 1991.

GUZMAN, D.S; DIAZ- FIGUEROA, O.; JÚNIOR 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.

GYLSTORFF, I:Chlamydiales. In: GYLSTROFF, I., GRIMM, F.: Vogelkrankheiten. **Verlag Eugen Ulmer Stuttgart**, p. 317-322, 1987.

HARKINEZHAD, T. *Chlamydophila psittaci* genotype E/B transmission from African grey parrots to humans. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1097-1100, 2007.

HETHERINGTON, M. John Gould's birds of Australia. National Library of Australia. Disponível em: <http://www.nla.gov.au/collect/treasures/apr_treasure.html>. Acesso em: 18 Nov. 2010

HIGGINS, P. J. Handbook of Australian, New Zealand, and Antarctic Birds. Parrots to Dollarbirds. Victoria: Oxford University Press. Vol. 4, 1999.

IBAMA. Portaria IBAMA Nº 93, de 7 de Julho de 1998. Disponível em: <<http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/042200.htm>>. Acesso em: 18 Fev. 2013.

Integrated Taxonomic Information System on-line database. *Nymphicus hollandicus*. In: ITIS 2013. Disponível em: < <http://www.itis.gov>>. Acesso em: 18 Fev. 2013

JONES, D. Feeding ecology of cockatiel, *Nymphicus hollandicus*, in a grain growing area. Australian Wildlife Research, v. 14, n. 1, p. 105 – 115, 1987.

KALETA, E.F.; TADAY, 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.

KONEMAN, E.W. Microbiologia molecular. In: KONEMAN, E.W., Diagnóstico microbiológico, ed.6. Rio de Janeiro, p. 139-154, 2006.

KRAUSS, H., SCHMEER, N. Aviare chlamydiosis. In: Heider, Monreal: Krankheiten des Wirtschaftsgesflügels Bd II. Jena Stuttgart, Verlag Gustav Fischer, p. 282-283, 1992.

LEY, D.H.; FLAMMER, K.; COWEN, P.; WHITT, D. Performance characteristics of diagnostic tests for avian chlamydiosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.7, p.203-207, 1993.

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

MATHIAS, J. M. Como criar calopsitas. Revista Globo Rural, São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1257601-4530,00.html>>. Acesso em: 18 Nov. 2010

MESSMER, T. O.; SKELTON, S. K.; MORONEY, J. F.; DAUGHARTY, H.; FIELDS, B. S. Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. **J. Clin. Microbiol.**, vol. 35, p. 2043 – 2046, 1997.

MEYER, K.F., et al. In: BEAUDETTE, F. R. (ed): Progress in Psittacosis Research and Control. New Brunswick NJ, Rutgers University Press, 1958.

MONSALVE, S.; MIRANDA, J.; MATTAR, S. First evidence of *Chlamydophila psittaci* circulation in Colombia: a possible public health risk. **Rev. salud pública**, v. 13, p. 314-326. 2011.

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

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

NASPHV – NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. **Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* infection among humans (psittacosis) and pet birds (avian chlamydiosis)**. 2010.

OIE. Avian Chlamydiosis. In: Section: Aves. **OIE Terrestrial Manual**, 2012.

PAGE, L. A. Experimental ornithosis in turkeys. **Avian Diseases**, v.3, p.51-66, 1959.

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. J.**, vol. 181, p. 145 – 150, 2009.

PROENÇA, 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.; JÚNIOR, A. B. PINTO, A.A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrots in Brazil. *J Zoo Wildl Med.*, vol. 33, n.2, p.118-121, 2002.

RASO, T.F.; GODOY, MILANENO, L.; SOUZA, C. A. I.; MATUSCHIMA, A. R.; JÚNIOR J. P. A.; PINTO, A. A. et al. 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 Bluefronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**. vol.117, p. 235-241, 2006;

RUPLEY, A.E. Manual de clínica aviária. São Paulo – SP: Editora Roca, 1999, 582 p.

RUSSEL, R. The Business of Nature. *John Gould and Australia*. National Library Australia, 2011

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

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

SMITH, K.A.; BRADLEY, K.K; STOBIERSKI, M. G.; TENGELSEN, L. A. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psitacosis) and pet birds, 2005. *JAVMA*, vol. 226, N. 4, 2005.

THIELE, D. Capture ELISA/ELIFA zum Direktnachweis von *Chlamydia psittaci* unter Verwendung biot inylierter monoklonaler Antikörper. **DVG-Tagung Fachgruppe Bakteriologie**, p. 251-258, 1990.

TRÁVNICEK, M.; CISLAKOVA, L.; DEPTULA, W.; STOSIK, M.; Bhide, M. R. Wild pigeons and pheasants – a source of *Chlamydophila psittaci* for humans and animals. **Ann Agric Environ Med**, v. 9, p. 253–255, 2002.

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.**, vol. 5, n. 76, 2005.

VANROMPAY, D.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. et al. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. **Veterinary Microbiology**,

v.45, p.93-119, 1995.

VERSTAPPEN, F.A.L.M.; LUMEIJ, J.T.; BRONNEBERG, G.G. Plasma chemistry reference values in Ostriches. **Journal of Wildlife Disease**, v.38, p.154–159, 2002.

ZWEIFEL, D. HOOP, R.; SACHSE, K.; POSPISCHIL, A.; BOREL, N. Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in wild birds—potential risk for domestic poultry, pet birds, and public health? **Eur. J. Wildl. Res.** 2009.

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

YANG, J.; LING, Y.; PANG, W.; HE, C. Isolation and characterization of peacock *Chlamydophila psittaci* infection in China. **Avian Dis.** v. 55, n. 1, p. 76 - 81, 2011.

CAPÍTULO II

1 INTRODUÇÃO

As aves silvestres participam do ciclo de vários parasitos e são hospedeiros de muitos com potencial zoonótico tais como a febre do Oeste do Nilo (“West Nile virus”), influenza aviária e a clamidiose. A transmissão desse agente para humanos pode ocorrer por aves de vida livre, mas as aves silvestres criadas como animais domésticos possuem maiores chances de transmitir essas zoonoses por seu maior contato e proximidade com seres humanos. Diversas aves podem ser criadas como animais domésticos, como psitacídeos e passeriformes. Os psitacídeos estão ganhando espaço nesse novo mercado como “pet”, por serem animais inteligentes e de fácil criação.

A clamidiose, uma das doenças infectocontagiosas citadas, foi descoberta inicialmente em psitacídeos, sendo nomeada como psitacose. Esta é uma doença que pode atingir diversos órgãos das aves infectadas como pulmões, sacos aéreos, trato gastro intestinal, reprodutivo, rins e encéfalo. As aves podem ser assintomáticas e portadoras do agente por muitos anos de suas vidas, no entanto quando um ser humano é infectado este pode desenvolver quadros respiratórios que progridem para problemas cardíacos, hepáticos e se não tratado pode vir à óbito (GERLACH, 1994).

Oitenta e quatro espécies da Ordem Psittaciformes são encontradas no Brasil (CRBO, 2011). Pesquisas mostram a ocorrência de clamidiose na fauna de vida livre no Brasil, como no caso de Arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) e papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) (RASO et. al., 2006). As calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), um psitacídeo originado na Austrália, também é um hospedeiro da clamidiose e tem se tornando o psitacídeo mais criado e vendido no Brasil.

A *Chlamydophila psittaci*, a bactéria causadora da clamidiose, é uma bactéria intracelular obrigatória, essa é uma das razões que torna seu diagnóstico difícil. O diagnóstico da clamidiose pode ser realizado por meio de técnicas que utilizam cultura celular, ELISA, Imunofluorescência e a reação de cadeia de polimerase (PCR). A PCR está se tornando a técnica mais utilizada para diagnóstico da *C. psittaci* por sua alta sensibilidade e especificidade e por ser rápida e econômica. No

entanto, essa técnica exige cuidados para se evitar falsos positivos nos resultados causados pela contaminação dos laboratórios e das amostras.

Apesar de vários estudos sobre clamidiose em aves brasileiras e exóticas (RASO et. al., 2006; RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002), pouco se sabe sobre a ocorrência de clamidiose na região do Distrito Federal (DF). A população humana dessa região está cada vez maior devido ao crescimento da urbanização, o que aumentou a procura de aves silvestres e exóticas para serem criadas como pet. Dessa forma, essa maior proximidade entre humanos e aves torna o DF e o Brasil um local propício para a disseminação da clamídia.

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) em criadores comerciais do Distrito Federal, visto que esta é uma zoonose que pode colocar em risco a saúde e a vida da ave infectada e das pessoas que irão adquirir esse animal.

1.1 MATERIAIAS E MÉTODOS

1.1.1 Locais de Coleta e espécie-alvo

Foi realizada a coleta de material de 106 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), sendo 85 de criadores (G1 – G6) e 21 de proprietários (G7-G16) do Distrito Federal (DF). Foi utilizado como local da coleta a estrutura física dos próprios criadores ou do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (Hvet-UnB). Antes do início da coleta, foram analisados as condições sanitárias do local e manejo das aves, nos criadores e os proprietários passavam por uma entrevista de avaliação sanitária de criação e manejo de suas aves (ANEXO II).

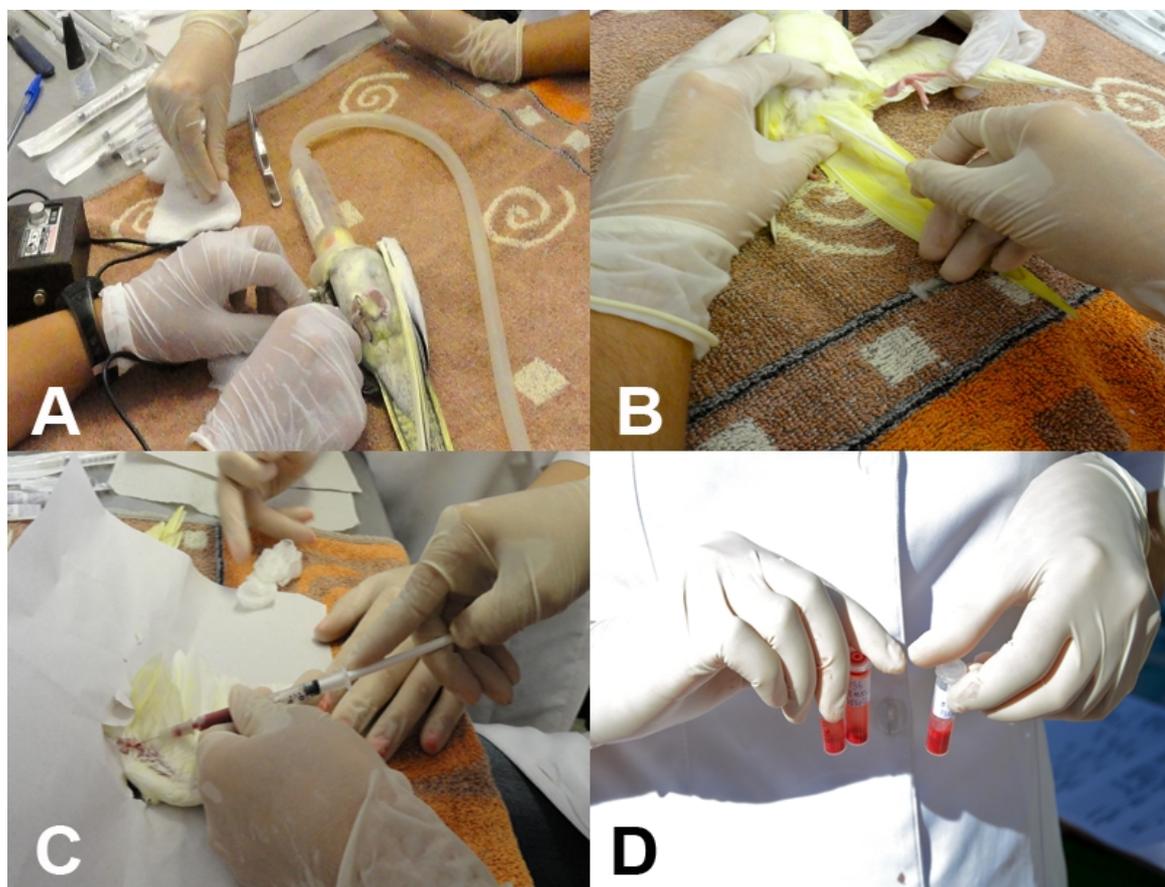
1.1.2 Avaliação física

Todas as aves passaram por uma avaliação física antes da coleta. A avaliação física consistiu nas seguintes variantes: escore corporal (magro, bom e gordo), inspeção visual e palpação das penas e sistema músculo-esquelético, além da inspeção visual das narinas, cloaca, olhos, ouvidos e cavidade oral. Todos os animais eram pesados antes do início da coleta e foram avaliados também aparência e comportamento do animal. Animais com menos de 12 meses foram classificados como jovens e aves com mais de 12 meses foram classificadas como adultos.

1.1.3 Contenção química e coleta do material biológico

Todos os animais foram anestesiados para a realização das coletas por meio de anestesia inalatória por máscara com Isoflurano por sistema aberto e vaporizador universal, para uma leve sedação (Figura 2), sendo que após o término das coletas, a anestesia era finalizada e o animal foi supervisionado até estar completamente desperto. Durante a anestesia foram coletadas amostras de swab cloacal e oral dos animais (Figura 3), conforme sugerido por Raso (2006). Os swabs utilizados eram estéreis e foram colocados após a coleta em microtubos do tipo eppendorf contendo PBS com pH 7,2 previamente esterilizado. Os microtubos foram identificados com número do animal, data e tipo de amostra (swab oral ou cloacal), sendo em seguida colocados em isopor com gelo para transporte e conservação da amostra. Além dos swabs, também foi coletado até 1% do sangue de cada ave através da veia jugular

ou veia braquial, com seringas de 1 mL e agulhas estéreis de 20 X 0,55 mm (Figura 4). O sangue foi dividido em 2 microtubos do (tipo Eppendorf®) sendo um com anticoagulante, a heparina, e o outro sem, ambos os tubos foram colocados em isopor com gelo para serem armazenados e transportados (Figura 5).



1.1.4 Análise do material biológico

As amostras de swab e de sangue foram transportadas para o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária e Laboratório de Patologia e Microbiologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB). Os swabs foram armazenados em caixas de plástico identificadas com o nome do projeto, dentro do freezer (- 4°C) do laboratório até o momento da análise do material, sendo a análise realizada no mesmo laboratório. O sangue foi processado e analisado logo após sua chegada ao laboratório, sendo essas análises o hemograma completo, proteína plasmática total (PPT), plaquetas e

exames bioquímicos: Proteína total (PT), albumina, Aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e creatinina, sendo esses exames realizados na medida do possível, dependendo do tamanho da amostra biológica coletada do animal e nessa ordem de preferência.

Hemograma e leucograma

O hemograma foi feito manualmente utilizando para contagem total de hemácias, leucócitos e trombócitos a câmara de Neubauer após uma única diluição de 1:200 com corante Natt e Herrick, sendo que leucócitos e trombócitos foram contados juntos e posteriormente diferenciados na lâmina no momento da contagem diferencial de leucócitos. O volume globular (VG) foi realizado por meio da técnica do microhematócrito utilizando-se tubos capilares Perfecta® e centrífuga de microhematócrito CELM® por 5 minutos a 12.000 rpm. As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram estimadas em plasma, resultante da centrifugação do capilar, por refratometria por meio de refratômetro de manual (CAMPBELL, 1995; ALMONSNY; MONTEIRO, 2006; CAMPBELL, 1994).

A contagem diferencial de leucócitos, assim como a diferenciação de leucócitos e trombócitos totais, foi realizada em esfregaço sanguíneo em lâmina para microscópio óptico e corado com May-Grunwald-Giemsa (MGG). Foi utilizado aumento de 1000x com óleo de imersão para visualização das células. Foram contadas 100 células de leucócitos e trombócitos diferenciando-as, para posteriormente realização de proporção com a contagem total realizada anteriormente na câmara de Neubauer, da seguinte forma: contagem de leucócitos na lâmina multiplicado pelo número de células contadas na câmara de Neubauer e dividido por 100 (total de células trombócitos e leucócitos contadas na lâmina). O mesmo procedimento e cálculo foi feito com os trombócitos. Após a diferenciação de leucócitos e trombócitos foi realizada a contagem de 100 células para o diferencial de leucócitos, para identificação da proporção de heterófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Bioquímica sérica

As dosagens bioquímicas foram feitas utilizando-se o soro do sangue após a centrifugação dos microtubos em centrífuga para microtubos MicroCentaur® por

12.000 rpm/ 5 min. para separação de soro e coágulo. Para cada dosagem bioquímica foi utilizado um kit comercial da marca Labtest®. Sendo as diluições seguidas de acordo com as recomendadas pelo fabricante. Após a diluição, o resultante era lido por um espectrofotômetro Bio2000® (Bioplus) e o resultado anotado.

1.1.5 Reação de cadeia da polimerase - PCR

Extração

Os swabs orais e cloacais coletados das 106 aves que estavam conservadas à -4°C em microtubos com PBS estéril, eram descongeladas em temperatura ambiente por aproximadamente 40 minutos, colocadas 1 minuto no vórtex para homogeneização da amostra e em seguida passavam pelo processo de extração do DNA. A extração era realizada com a utilização do Kit comercial de extração de sangue da GEHealthcare® e de acordo com as especificações do fabricante.

Foram realizados dois tipos de exames moleculares em cada amostra obtida. Após as extrações, todas as amostras foram submetidas a PCR para a determinação do sexo e detecção de clamídia, utilizando diferentes conjuntos de oligonucleotídeos. Foi utilizado o mesmo aparelho termociclador (Figura 3) em todas as reações de PCR e os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídio 5 mg/mL, por 40 minutos e observado sob transiluminador de fluorescência ultravioleta. Um marcador molecular de 100 pares de base (Invitrogen®) foi incluído em cada eletroforese para a determinação do tamanho dos produtos da PCR amplificados em cada reação (Figura 3). O surgimento de produtos na altura dos pares de bases esperados foi considerado o parâmetro para classificar as amostras como positivas.

PCR de sexagem das calopsitas

Os oligonucleotídeos utilizados para sexagem das calopsitas 2550F (5'GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA 3') e 2718R (5'ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG 3'), amplificavam os genes CHD1 – W e CHD1-Z. Para a realização do PCR de sexagem das calopsitas amostradas a concentração dos reagentes na mistura para cada amostra foram: 2,0 µL de DNA, 1X tampão de PCR, 2 mM MgCl₂ (Invitrogen®),

0,2 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 U de *Taq* DNA Polimerase platinum (Invitrogen®) e água miliQ para um volume final de 25 μ L. As condições da PCR de sexagem utilizadas foram conforme o descrito por Quintana e colaboradores (2008) com adaptações.

A realização das reações da PCR foi feita seguindo o seguinte ciclo: desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos seguido de 35 ciclos (desnaturação à 95 °C por 30 segundos, anelamento à 54 °C por 45 segundos, extensão à 72 °C por 30 segundos), a extensão final à 72 °C por 5 minutos e resfriamento à 4 °C. Essa PCR pode gerar dois produtos finais com diferença de aproximadamente 200 pares de bases de diferença, sendo o gene CDH1 - W e CDH1-Z devem apresentar 450 e 650 pares de base respectivamente. Quando os dois tamanhos de pares de base foram observados o animal foi considerado como fêmea (ZW) e quando somente houve a visualização de um produto, a ave foi considerada como macho (ZZ) (QUINTANA et al., 2008). Em caso de banda expúria ou contaminação, a mistura dos reagentes e a PCR era refeita, ou dependendo do caso a extração era repetida também.

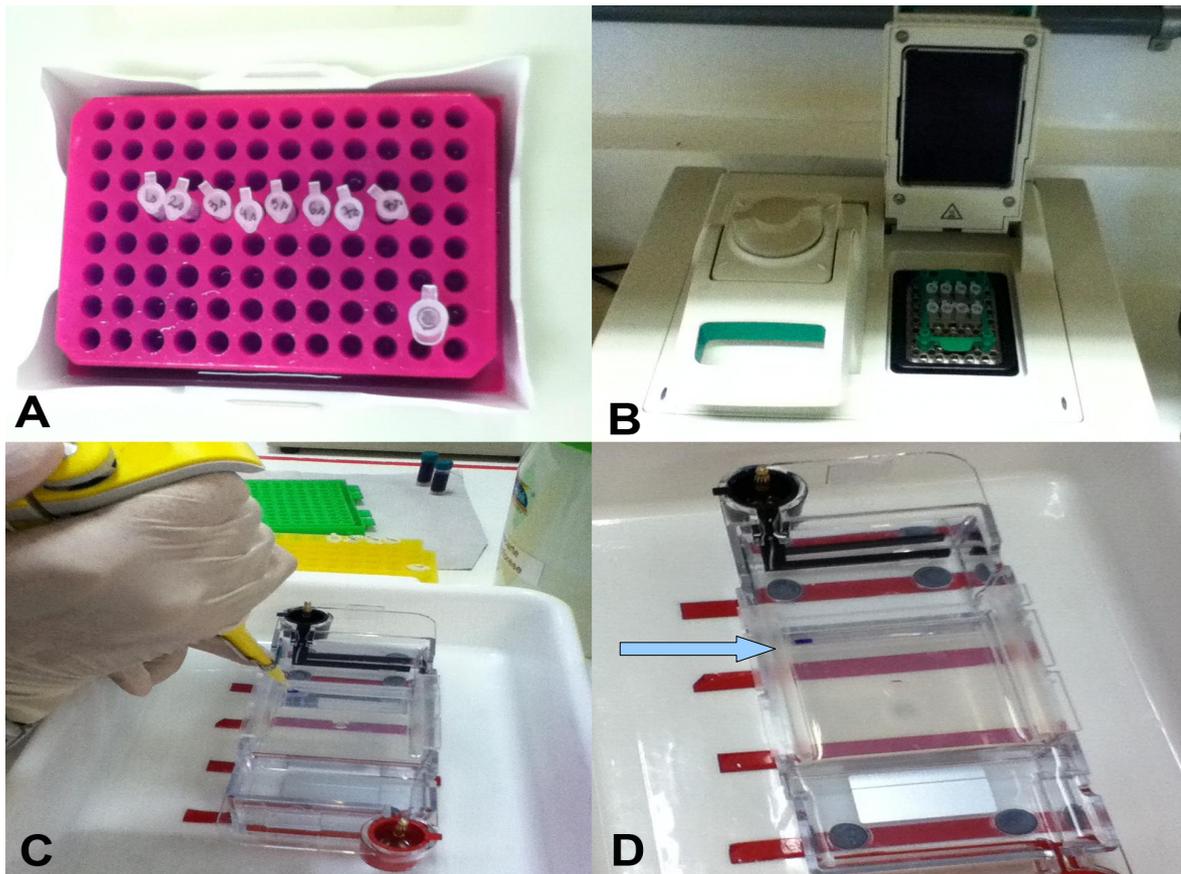


Figura 3: A) Amostras após mistura de reagentes com o DNA extraído; B) Retirada de amostras do termociclador após ciclos da PCR; C) Aplicação do peso molecular padrão na primeira fileira do gel; D) Peso molecular na primeira fileira do gel

PCR de *Chlamydomophila* das calopsitas

Os oligonucleotídeos utilizados na PCR de detecção de *Chlamydomophila* ChISA (5' CAG GAT ATC TTG TCT GGC TTT AA 3') e ChISB (5' GCAAGG ATC GCAAGG ATC 3'), amplificam o gene MOMP de *Chlamydoaceae*. Para realização da PCR de detecção de *Chlamydomophila* foi utilizado a seguinte concentração dos reagentes para cada amostra: 2,0 μ L de DNA, 1X tampão de PCR, 2 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 0,1 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 U de Taq DNA Polimerase platinum (Invitrogen®) e água miliQ para um volume final de 25 μ L. As condições da PCR de *Chlamydomophila* utilizadas foram conforme o descrito por Raso (2006) com adaptações.

A realização das reações da PCR seguiu o seguinte ciclo: desnaturação inicial à 94 °C por 10 minutos seguido de 34 ciclos (desnaturação à 94 °C por 1 minuto,

anelamento à 54 °C por 1 minuto, extensão à 72 °C por 1 minuto), a extensão final à 72 °C por 4 minutos e resfriamento à 4°C. Essa PCR quando realizada com uma amostra positiva deve apresentar um produto de 260 pares de base. O controle positivo da PCR de *Chlamydophila* utilizado foi a vacina quántupla felina da Fort Dodge® para comparação e confirmação da presença ou não de *Chlamydophila psittaci* nas amostras e o controle negativo foi a H₂O Milli-Q.

1.1.6 Análises estatísticas

Após a análise de todo o material no laboratório, foi determinada a ocorrência de aves positivas (número de aves positivas / número de aves amostradas). Com os resultados dos valores de hemograma e bioquímica sérica foi inicialmente realizada a verificação da normalidade das amostras com o teste de normalidade de Cramer-von Mises (ZARS, 2009). As variáveis que não possuíram distribuição normal foram logaritimizadas, e testadas novamente para normalidade. As amostras que permaneceram não-normais foram analisadas por ANOVA normalmente, pois como o conjunto de dados era composto por mais de 100 indivíduos, nós consideramos o teorema do limite central.

Com o auxílio do software R® (R SOFTWARE, 2011) foram utilizadas análises de variância multifatorial (ANOVA) para testar a influência dos seguintes fatores: (a) sexo (macho ou fêmea), (b) faixa etária (jovem e adulto) e (c) interação entre estes dois fatores. Como os níveis séricos de algumas enzimas são correlacionados ao peso do animal, nós testamos tanto modelos com e sem peso como co-variado; o modelo mais parcimonioso foi considerado no resultado final. Todos os testes consideraram um nível α de 0,05.

2 RESULTADOS

Na PCR para sexagem das amostras de 106 calopsitas em que foram utilizados os oligonucleotídeos 2550F e 2718R houve amplificação dos genes *CHD1-W* e *CHD1-Z* que resultaram em produtos com tamanho de aproximadamente 450 pb e 650 pb, respectivamente. As fêmeas apresentaram dois produtos de ambos os tamanhos (ZW) e os machos apenas o produto de 650 pb (ZZ) (Figua 4). Das 106 calopsitas foram identificadas 42 fêmeas e 64 machos. O peso das aves variou de 65 a 109 g, com média (\pm desvio padrão) de $87 \pm 9,74$ gramas. A distribuição das aves por faixa etária e gênero por criador está representado na tabela 1.

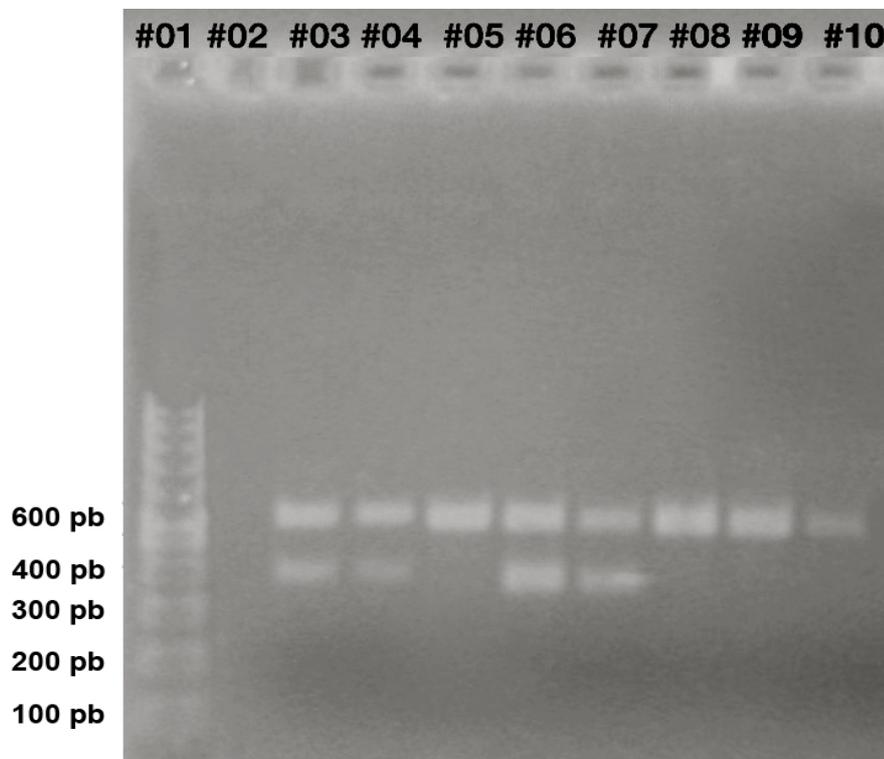


Figura 4: PCR de sexagem das calopsitas (*Nymphicus hollandicus*).
#1 = Ladder; #2 = controle negativo; #3 = Fêmea; #5 = macho

Tabela 1: Número de machos e fêmeas totais das 106 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) analisadas.

Criador ou Proprietário	Jovens		Adultos		Total
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	
G1	12	18			30
G2	2	4	4	7	17
G3			5	7	12
G4			5	7	12
G5			4	3	7
G6			1	6	7
G7			1	3	4
G8			1	2	3
G9			1	2	3
G10			1	1	2
G11			1	1	2
G12			1	1	2
G13			2		2
G14		1			1
G15				1	1
G16			1		1
Total	14	23	28	41	106

No momento da coleta, foram coletadas amostras de swab oral de 71 aves e swab cloacal de todas as calopsitas (106). No exame da detecção da *C. psittaci* apenas uma calopsita de um criador foi positiva, ou seja 1,2% (1/85) de ocorrência observada; nenhuma ave de proprietário foi positiva para o teste, 0% (0/21) de ocorrência observada. O animal positivo era jovem, fêmea e pertencia ao criador C1. A amostra positiva foi resultante de um swab oral, enquanto que o swab cloacal do mesmo animal apresentou resultado negativo (Figura 5).

Na avaliação clínica da ave positiva, este apresentou sinais de diarreia e escore corporal baixo (magro) pesando 70 gramas. Na anamnese, havia histórico de morte dos filhotes da mesma ninhada dessa ave na semana anterior a data da coleta, após apresentarem diarreia líquida e constante. Apesar de dois indivíduos dessa ninhada participarem do projeto apenas esse indivíduo apresentou resultado positivo na PCR de *C. psittaci*. O hemograma e bioquímicos da ave positiva quando comparado com

os parâmetros encontrados em calopsitas negativas, com a idade aproximada ao do animal, não apresentou diferença nos resultados quando considerado duas vezes o desvio padrão, ou seja, os resultados de 94,49% das amostras (Tabela 2).

Tabela 2: Análise de hemograma e bioquímica sérica da calopsita (*Nymphicus hollandicus*) positiva na PCR para *C. psittaci* quando comparado com os negativos com a mesma faixa etária.

Hemograma	Positivo (1/37)	Negativos (36/37) X ± DP (mín - máx)
VG(%)	50,00	52,72 ± 5,02 (38 - 60)
Hemácias (.10 ⁶ . µL ⁻¹)	3,30	2,97 ± 0,69 (1,86 – 5,06)
Hemoglobina (g/dL)	9,20	9,59 ± 1,58 (5,4 – 13,7)
VCM (fL)	151,52	186,39 ± 41,22 (114,35 – 301,08)
CHCM (g/dL)	18,40	18,23 ± 3,5 (9,64 – 27,05)
Trombócitos (.10 ³ . µL ⁻¹)	3,12	10,1 ± 6,07 (2,02 – 32,62)
PPT (g/dL)	3,00	3,27 ± 0,53 (2 – 4,2)
Leucócitos (.10 ³ . µL ⁻¹)	8,88	6,93 ± 5,9 (1,33 – 28,22)
Heterófilos (.10 ³ . µL ⁻¹)	7,19	3,50 ± 3,59 (0,47 – 18,3)
Linfócitos (.10 ³ . µL ⁻¹)	1,24	2,21 ± 2,01 (0,58 – 0,81)
Eosinófilos (.10 ³ . µL ⁻¹)	0,13	0,08 ± 0,11 (0 – 0,56)
Monócitos (.10 ³ . µL ⁻¹)	0,17	0,43 ± 0,54 (0,06 – 0,27)
Basófilos (.10 ³ . µL ⁻¹)	0,00	0,11 ± 0,13 (0 – 0,6)
Bioquímica sérica		
PT (g/dL)	2,00	2,08 ± 0,33 (1,4 – 2,8)
Albumina (g/dL)	0,70	0,75 ± 0,26 (0,5 – 2,09)
AST (UI/L)	272,00	285,41 ± 134,21 (125 - 749)
FA (UI/L)	-	94,58 ± 48,68 (37 - 220)
Creatinina (mg/dL)	-	0,13 ± 0,09 (0 – 0,3)

Média (X), Desvio Padrão (DP), Mínimo (mín), Máximo (máx). Volume globular (VG), PPT (Proteínas Plasmáticas Totais); Proteínas totais séricas (PT), Aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina (FA).

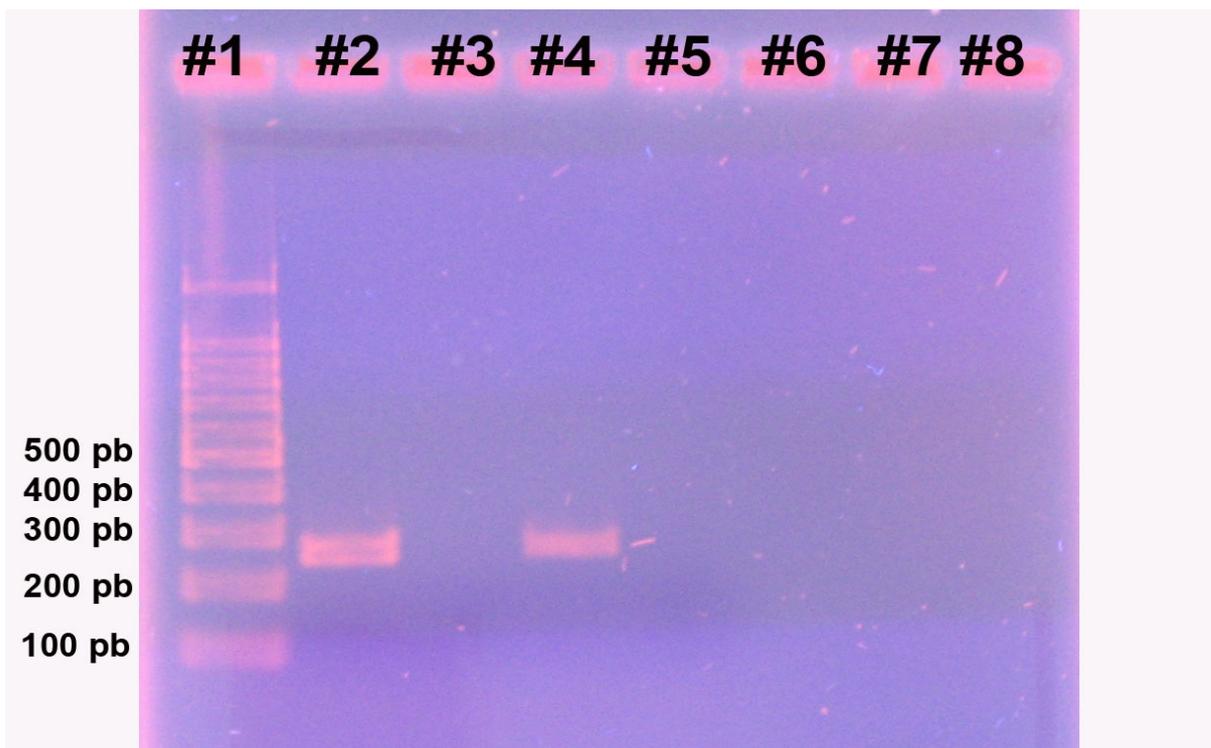


Figura 5: PCR de *Chlamydophila psittaci*.

#1 = Ladder; #2 = Controle positivo; #3 = Controle negativo; #4 = Swab oral da calopsita (*Nymphicus hollandicus*) positiva; #5 = Swab cloacal da calopsita positiva

Na análise estatística realizada entre os hemogramas e bioquímicos das aves negativas para *C. psittaci* a maioria dos parâmetros mostrou distribuição normal, entretanto nos resultados os valores de peso, VG e creatinina não foi observado distribuição normal (ZARS, 2009). Ao analisar a relação entre as variáveis com o peso, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) em valores de VG, creatinina e FA, mostrando que o peso é fator de efeito nessas variáveis. Quando avaliado o fator sexo, só foi observada diferença nos valores de AST, leucócitos, heterófilos absolutos e basófilos absolutos (Tabela 3). Houveram outras diferenças encontradas ao avaliar o fator faixa etária, que estão representadas na tabela 3.

Tabela 3: Valores de hemogramas e bioquímicos das calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) negativas para *C. psittaci* de acordo com o fator faixa etária e sexo.

Hemograma	Faixa etária	
	Jovem X ± DP (mín - máx)	Adulto X ± DP (mín - máx)
Hemácias (.10 ⁶ . L ⁻¹) ***	2,97 ± 0,69 (1,86 – 5,06)	3,65 ± 0,62 (2,26 – 5,15)
Hemoglobina (g/dL) ***	9,59 ± 1,58 (5,4 – 13,7)	12,57 ± 2,05 (8,8 – 19,2)
VCM (fL)***	186,39 ± 41,22 (114,35 – 301,08)	149,41 ± 29,58 (106,64 – 257,51)
CHCM (g/dL)***	18,23 ± 3,5 (9,64 – 27,05)	23,32 ± 4,34 (17,14 – 33,68)
Eosinófilos (.10 ³ . L ⁻¹) *	0,08 ± 0,11 (0 – 0,56)	0,02 ± 0,02 (0 – 0,14)

Hemograma	Sexo	
	Fêmeas X ± DP (mín - máx)	Machos X ± DP (mín - máx)
Leucócitos (.10 ³ . L ⁻¹) §*	8,41 ± 6,07 (1,33 – 28,22)	6,53 ± 3,89 (1,59 – 20,80)
Heterófilos (.10 ³ . L ⁻¹) §*	4,74 ± 4,28 (0,47 – 19,36)	3,56 ± 2,69 (0,47 – 12,96)
Basófilos (.10 ³ . L ⁻¹) §*	0,02 ± 0,02 (0 - 1,0)	0,01 ± 0,01 (0 – 0,06)
Bioquímica sérica		
AST (UI/L) *	239 ± 105 (89 - 602)	294 ± 113 (131 - 749)

*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; § = Análise com peso como co-variado.

Média (X), Desvio Padrão (DP), Mínimo (mín), Máximo (máx). Volume corpuscular médio (VCM), Concentração de hemoglobina Corpúscular Médio (CHCM), Proteínas Séricas Totais (PT), Aspartato aminotransferase (AST).

Na análise dos valores bioquímicos quando avaliados a interação entre sexo e faixa etária o teste ANOVA demonstrou que a proteína total é maior em fêmeas adultas quando comparadas com machos jovens e adultos e fêmeas jovens, havendo assim uma diferença entre as fêmeas adultas e os outros 3 grupos (p<0,05) (Figura 6). Ao avaliar a fosfatase alcalina os machos adultos tiveram menores valores de FA do que as fêmeas adultas (Figura 7), enquanto os valores da albumina foram maiores em fêmeas adultas do que fêmeas jovens (Figura 8).

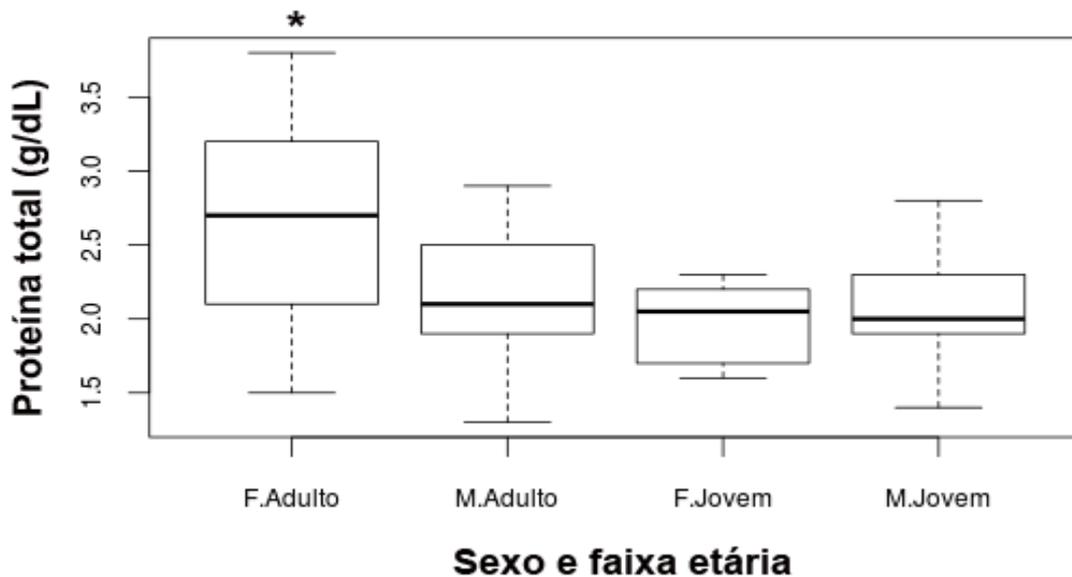


Figura 6: Boxplot da variável proteína total quando analisado a interação entre sexo e faixa etária das calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). F = Fêmea; M = Macho; *p < 0,05; o = outliers; caixa do boxplot = quartil 25 – 75 %; Linha central = mediana; Amplitude = Quartil 2,5 – 97,5 %.

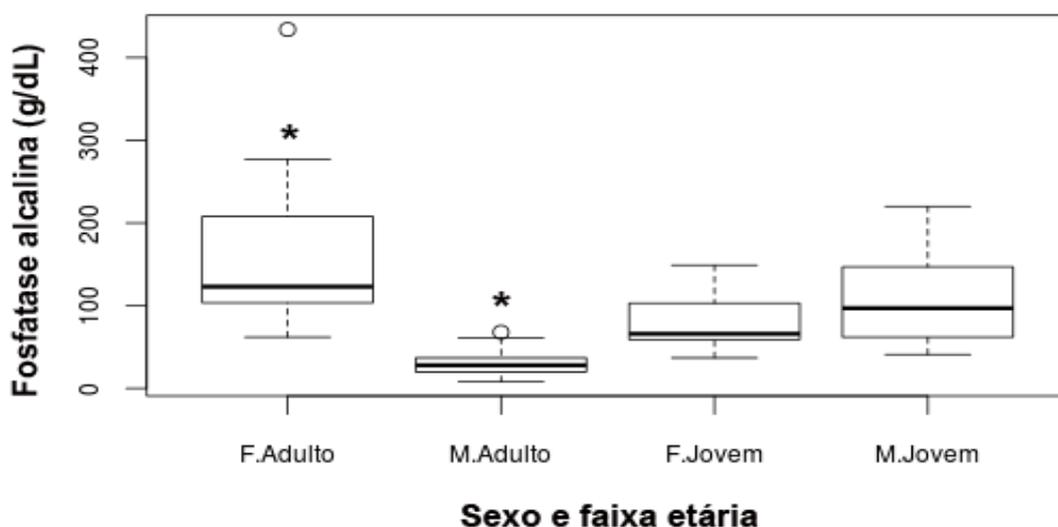


Figura 7: Boxplot da variável fosfatase alcalina quando analisado a interação entre sexo e faixa etária das calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). F = Fêmea; M = Macho; *p < 0,05; o = outliers; caixa do boxplot = quartil 25 – 75 %; Linha central = mediana; Amplitude = Quartil 2,5 – 97,5 %.

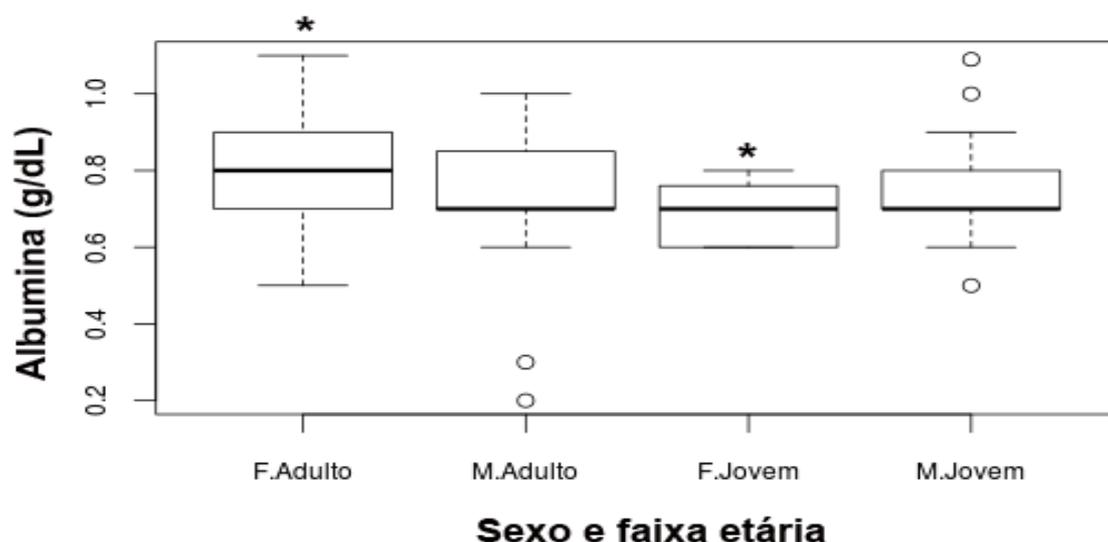


Figura 8: Boxplot da variável albumina quando analisado a interação entre sexo e faixa etária das calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). F = Fêmea; M = Macho; *p < 0,05; o = outliers; caixa do boxplot = quartil 25 – 75 %; Linha central = mediana; Amplitude = Quartil 2,5 – 97,5 %.

A avaliação do hemograma e bioquímica sérica das 106 calopsitas, não mostrou diferença em algumas variáveis quando avaliados o fator sexo e idade (tabela 4). Na avaliação da condição sanitária dos criadores, todos apresentaram condição sanitária boa ou ótima, nenhum apresentou condição abaixo do aceitável, ou seja, ruim. Todos os criadores possuíam gaiolas suspensas e com ventilação constante do ambiente (ANEXO III e IV).

Tabela 4: Valores médios, desvio padrão, máximo e mínimo dos valores paramétricos dos hemogramas e bioquímicos das calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) negativas para *C. psittaci*.

Hemograma	Valores paramétricos X ± DP (mín - máx)
VG(%)	52,94 ± 4,76 (38 - 60)
PPT (g/dL)	3,74 ± 1,16 (2,2 - 7)
Trombócitos (.10 ³ .µL ⁻¹)	3,92 ± 0,31 (3 - 4,51)
Leucócitos (.10 ³ .µL ⁻¹)	7,27 ± 4,92 (1,33 - 28,22)
Linfócitos (.10 ³ .µL ⁻¹)	1,98 ± 1,66 (0 - 8,11)
Monócitos (.10 ³ .µL ⁻¹)	0,36 ± 0,43 (0 - 2,70)
Basófilos (.10 ³ .µL ⁻¹)	0,16 ± 0,18 (0 - 1,11)
Bioquímica sérica	
Albumina (g/dL)	0,76 ± 0,2 (0,2 - 2,09)
FA (UI/L)	96,86 ± 82,68 (8 - 434)
Creatinina (mg/dL)	0,15 ± 0,08 (0 - 0,3)

Valores com $p > 0,05$. Média (X), Desvio Padrão (DP), Mínimo (mín), Máximo (máx). Volume globular (VG), PPT (Proteínas Plasmáticas Totais), Fosfatase alcalina (FA).

3 DISCUSSÃO

3.1 Ocorrência de *C. psittaci* em calopsitas

A *Chlamydophila psittaci* é uma bactéria encontrada em diversas regiões do mundo, como por exemplo China (YANG; LING; PANG 2011), Bélgica (DICKX et al., 2010a), Suíça (GEIGENFEIND; VAMROMPAY; HAAG-WACKERNAGEL, 2011), Colômbia (MONSALVE; MIRANDA; MATTAR, 2011), Brasil (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002; RASO et. al., 2006), entre outros. No Brasil, Raso (2002), encontrou uma soroprevalência de 16-56%, em papagaios de cativeiro (*Amazona sp.*), sendo um total de 95 aves, dessas 18 provenientes de São Paulo, 36 de Minas Gerais e 41 do Mato Grosso do Sul. Quatro anos depois, Raso e colaboradores (2006) encontraram em sua pesquisa com 31 papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) e 45 Araras azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) na zona do Pantanal, uma soroprevalência de 0% e 4,8% respectivamente. Na mesma pesquisa, através da técnica de nested-PCR, a autora encontrou uma ocorrência de 0% e 6,3% em papagaios-verdadeiros em amostras de swab traqueal e cloacal respectivamente, enquanto que em Araras azuis foi encontrado 8,9% e 26,7% em swab traqueal e cloacal.

No Distrito Federal, existe descrição de casos de clamídia em psitacídeos por Proença e colaboradores (2010), em aves atendidas em uma clínica especializada em animais silvestres. Sendo que os autores descrevem as calopsitas como sendo as aves com maior ocorrência de *C. psittaci* no DF. No entanto, a amostra desses autores poderia estar viciada por ser obtida em uma clínica veterinária, local onde os animais são levados quando já apresentam algum sinal de doença.

No presente estudo em 106 calopsitas analisadas de criadores e proprietários do Distrito Federal foi encontrada uma ocorrência *C. psittaci* pela técnica da PCR de 1,2% e 0% respectivamente. Os fatores que podem ter influenciado nessa baixa ocorrência encontrada quando comparado com Raso e colaboradores (2002; 2006) são: metodologia da amostragem e da coleta, tipo da PCR utilizada e condições sanitárias dos locais de criação das aves. Ao contrário da amostragem de Proença e colaboradores (2010), nossa pesquisa foi realizada escolhendo criadores e calopsitas aleatoriamente, evitando assim uma amostra viciosa. O método de coleta realizado nesse estudo foi pontual, ou seja, apenas uma única coleta por ave, sendo

o recomendável, para maior probabilidade de diagnóstico da doença, três coletas em um intervalo de cinco dias (RASO et al., 2004). Algumas aves poderiam ser positivas, mas não apresentaram resultado positivo na PCR por não estarem liberando o agente no momento da coleta.

Esse estudo utilizou os mesmos oligonucleotídeos que Raso e colaboradores (2006) para a PCR de clamídia, detectando o gene MOMP de *Chlamydiae*, mas foi realizado a PCR comum, enquanto esses os autores utilizaram a semi-nested PCR. O uso da PCR comum ao invés da nested PCR, pode possuir uma menor sensibilidade, havendo menos chance de identificar a clamídia do que a nested PCR (OIE, 2012).

Por outro lado, todos os locais de criação das calopsitas amostradas apresentaram condições sanitárias boas e um ambiente controlado que pode ter sido outro motivo para a menor ocorrência encontrada. Além disso, o clima de Brasília pode ser um outro fator nos resultados da ocorrência quando associado a boa qualidade sanitária dos locais amostrados. A clamídia possui baixa resistência ao calor e luz solar, mas pode durar muito tempo em água a temperatura ambiente (ANDERSEN; VOMROMPAY, 2003). Devido as características dessa bactéria, um clima com baixa humidade relativa do ar como Brasília, variando de 70 – 20% ao ano (WEATHERBASE, 2012), pode dificultar a sobrevivência da bactéria no ambiente, já que esta permanece viável por mais tempo na água.

A calopsita com o resultado positivo na PCR no presente estudo, era fêmea e jovem. Essa ave possuía histórico de diarreia e escore corporal baixo, sinais clínicos que podem, caracterizar infecção por clamídia (GERLACH, 1994), mas não foi observada alteração nos valores de hemograma, leucograma e dosagens bioquímicas quando comparado com calopsitas da mesma faixa etária. Esta ave estava junto com outro filhote da mesma ninhada, que também participou do experimento. Esse outro filhote apesar de apresentar os mesmos sinais clínicos da ave positiva, foi negativo na PCR. O outro filhote poderia estar infectado com o agente, mas no momento de coleta não estar liberando o agente.

3.2 Análise de hemograma e bioquímico das aves negativas na PCR

Ao avaliar os valores de hemograma e bioquímico das calopsitas negativas para *C. psittaci* de acordo com a faixa etária, foram encontradas diferenças nas seguintes

variáveis: número de hemácias, hemoglobina, VCM, CHCM e eosinófilos absolutos. O número médio de hemácias das calopsitas jovens foi menor do que dos adultos e possuíam menor concentração de hemoglobina. As calopsitas possuem um crescimento físico rápido, alcançando o tamanho adulto entre 1 a 2 anos e para suprir esse crescimento acelerado é necessário uma liberação constante de hemácias. Devido a isso, essas aves liberam hemácias imaturas, conseqüentemente com baixa concentração de hemoglobina e um volume maior (HOWLLET et. al., 2002; HERNÁNDEZ; MARGALIDA, 2012). Isso explicaria o número médio de hemácias de jovens ser menor do que de adultos e o valor de VCM ser maior e CHCM menor. Howllet e colaboradores (2002), encontraram uma diferença semelhante nas hemácias e hemoglobina em *Chlamydotis undulata macqueenii*, *Eupodotis ruficrista gindiana* e *Eupodotis senegalensis* filhotes quando comparados com adultos da mesma espécie, assim como Hernández (2010), encontrou essas mesmas diferenças hematológicas em Abutres - barburdos (*Gypaetus barbatus*).

O valor médio dos eosinófilos foi maior em filhotes do que nos adultos. O aumento do número de eosinófilos no leucograma é normalmente um indicativo de endoparasitismo (DEMIRCI et al., 2002). Animais mais jovens são imunologicamente mais sensíveis por terem um sistema imune ainda em formação, tornando-se mais propensos aos endoparasitas (MONTEIRO; DIETZ; JANSEN, 2010). Sendo assim, os filhotes possuem normalmente maior carga parasitária do que os adultos e conseqüentemente maior número de eosinófilos.

Ao avaliar o fator sexo nos valores de hemograma e bioquímicos, foi observada uma diferença nas variáveis leucócitos, heterófilos absolutos, basófilos absolutos e AST. O número médio de leucócitos e heterófilos absolutos foi maior nas fêmeas quando comparadas aos machos. Existe uma discussão entre pesquisadores (REDIG et al., 1984; HUFF et al., 1999; HASSELQUIST et al., 1999; ROBERTS et al., 2007; KLEIN, 2004) de que o gênero do indivíduo pode influenciar a resposta imune do organismo, bem como a suscetibilidade a infecções, no entanto ainda não existe um consenso sobre esse assunto. Redig e colaboradores (1984), estudaram a atuação dos hormônios esteroidais sobre o sistema imune e concluíram que corticóides, testosterona, progesterona e estrógeno em altas concentrações causam imunossupressão. Huff et al. (1999), descrevem um experimento com dexametasona

em machos e fêmeas com infecção por *E. coli* e concluíram que fêmeas são mais resistentes imunologicamente a septicemia do que machos. Assim como Klein (2004), que descreve o efeito de hormônios no sistema imune, em que a testosterona causaria imunossupressão e o estrógeno, um hormônio feminino, modularia o sistema imune das fêmeas contribuindo na resistência contra infecções. Contudo, Hasselquist et al. (1999) e Roberts et al. (2007) em seus estudos analisando a interferência de altos níveis de testosterona no sistema imune em machos de aves de cativeiro, concluíram que esse hormônio não promove efeito supressivo na resposta imune.

Mesmo com resultados contraditórios em pesquisas realizadas por esses autores, nossa pesquisa mostra um maior número nos valores de heterófilos em fêmeas. Essa variação pode estar relacionada ao período da coleta, pois foram priorizados períodos não reprodutivos na tentativa de evitar estresse excessivo da ave. Dessa forma as fêmeas não sofreriam ação de altos níveis de hormônios esteroidais, como a progesterona, e conseqüente imunossupressão. Enquanto os machos sofrem a ação da testosterona de uma forma mais constante.

A quantidade de basófilos absolutos observado nas fêmeas foi maior do que nos machos. Essa diferença também foi encontrada por Hauptmanova e colaboradores (2002). Os basófilos são raramente encontrados na contagem diferencial de leucócitos e quando encontrados, são vistos em um número pequeno de células (GERLACH, 1994). Essa baixa ocorrência de basófilos no total de leucócitos pode gerar uma diferença estatística pouco confiável, pela amostra das aves com basófilos ser pequena.

A concentração média da variável AST encontrada foi maior em machos do que fêmeas. Essa diferença também é relatada no estudo com codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) de Scholtz et al. (2009) e em uma pesquisa com galinhas de Sribhen et al. (2006). Moniello et al. (2006) não encontraram diferença nos valores de AST entre fêmeas e machos em avestruzes de 2 anos. Valores elevados de AST podem estar associados a lesões hepáticas, musculares, cardíacas e estresse (SRIBHEN et al., 2006). No entanto, em nossa pesquisa a captura e contenção foi realizada igualmente em todas as aves. O processo de contenção física durava menos de 5 minutos antes do início do período anestésico, o que

possivelmente descarta a interferência de estresse nos valores encontrados de bioquímica sérica. Como as aves eram de locais diferentes, recebendo cuidados e alimentação distintas em cada local, lesões hepáticas e cardíacas causadas por manejo e alimentação, podem não ser a causa desse maior valor de AST encontrado em machos.

Quando analisada a interação entre os fatores sexo e faixa etária, foi observada diferenças nas variáveis: proteína sérica total (PT), fosfatase alcalina (FA) e albumina. Os valores de PT foram maiores em fêmeas adultas quando comparadas com fêmeas jovens, machos adultos e machos jovens. Os filhotes, tanto fêmeas quanto machos, gastam proteína para seu desenvolvimento físico na produção de células e aminoácidos, assim como no desenvolvimento físico e troca de penas (MEADOWS et. al., 2012).

A proteína é um componente primário das penas e sua coloração, machos adultos despendem muita energia e proteína para a coloração e qualidade das penas (MEADOWS et. al., 2012). Esse maior gasto de proteínas pelos filhotes e pelos machos adultos pode ser um dos motivos das fêmeas adultas terem um maior nível sérico de proteína total, pois além disso, elas precisam armazenar proteínas para a produção e postura de ovos (KÖNIG et al., 2007; LUMEIJI, 1997). Schmidt et. al. (2007) encontrou diferenças em fêmeas adultas quando comparadas com fêmeas jovens, machos adultos e jovens de Ring-Neck (*Phasianus colchicus*), condizentes com o observado no presente estudo. Na variável albumina foram observados valores maiores em fêmeas adultas do que fêmeas jovens. A albumina é componente da proteína total, representando 40-70% (LUMEIJI, 1997; CAMPBELL, 2006), suas diferenças em relação aos fatores sexo e faixa etária condizem com as encontradas na variável PT, de que fêmeas adultas possuem mais albumina.

Foi observado na variável FA maiores valores em fêmeas adultas do que em machos adultos. A enzima FA pode estar presente nos tecidos do intestino, fígado, rins e ossos (HARR, 2006). As fêmeas adultas podem apresentar atividade de FA aumentado devido a sua ação na formação óssea dos filhotes (HARRISON, 1985). Calabuig et. al. (2009) não encontraram diferença em valores de FA em machos e fêmeas de cisnes coscoroba (*Coscoroba coscoroba*). O número de amostras de FA analisado na presente pesquisa foi pequeno devido ao tamanho biológico das

calopsitas. Apenas nove fêmeas adultas e oito machos tiveram dosagem de FA. Essa diferença encontrada entre fêmeas adultas e machos adultos pode ser devido a esse baixo número de amostras causando um viés estatístico.

4 CONCLUSÃO

Através dos resultados encontrados no estudo da ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas de criadores e proprietários do Distrito Federal, foi possível concluir que existe a presença da doença nessa região em calopsitas, mas de baixa ocorrência. A infecção não causou alterações no hemograma e bioquímico na ave positiva, mas interferiu na condição física do animal causando diarreia e baixo escore corporal. Existem diferenças no hemograma e leucograma de animais jovens e adultos, por isso devem ser evitadas extrapolações de valores de referência de faixa etárias distintas. A maioria das diferenças encontradas na dosagem de bioquímica sérica está relacionada ao sexo do animal, por isso deve-se evitar extrapolações paramétricas entre gêneros em calopsitas.

5 REFERÊNCIA

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.

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo:Roca, p. 951, 2006.

CALABUIG, C.C.; FERRER, M.; MURIEL, R.; TILGAR, V. Plasma alkaline phosphatase as a sensitive indicator of age and skeletal development in wild coscoroba swans. **Wildlife Research**, v. 37, n.6,p. 504-511, 2009.

CAMPBELL, T. W. Hematology. In: HARRISON, G. J., HARRISON, L. R. (eds): **Clinical Avian Medicine and Surgery**. Philadelphia, London, Toronto, WB Saunders Co, p.176-198, 1994.

CAMPBELL, T.W. Avian Hematology and Cytology. 2a ed. Iowa State University Press, p. 30-34. 1995.

CAMPBELL, T.W. Bioquímica Clínica de Aves. In: THRALL, M.A. (Ed.), **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. ROCA, São Paulo, p. 449 – 460, 2006.

Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos – CBRO (2011) *Listas das aves do Brasil*. 10ª Edição, 25/1/2011, Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 18 Fev. 2013.

DERMICI, M.; KORKMAZ, M.; SAKRU, N.; KAYA, S.; KUMAN, A. Diagnostic Importance of Serological Methods and Eosinophilia in Tissue Parasites. **J. Health Popul. Nutr.**, Vol. 20, n. 4, p. 352-355, 2002.

DICKX, V.; GEENS, T., DESCHUYFFELEER, T. ; TYBERGHEIN, L.; HARKINEZHAD, T.; BEECKMAN, D.S.; BRAECKMAN, L.; VAMROMPAY, D. *Chlamydia psittaci* zoonotic risk assessment in chicken and turkey slaughterhouse. **J Clin Microbiol.** v. 48, n. 9, p. 3244-3250, 2010.

GEIGENFEIND, I.; VAMROMPAY, D.; HAAG-WACKERNAGEL, D. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in the feral pigeon population of Basel, Switzerland. **J Med Microbiol.** Vol. 61 (Pt 2), p. 261-5. 2011.

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.

HARR, K.E. **Diagnostic Value of Biochemistry**. In: HARRISON, G.J.; LIGHTFOOT, T.L. *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Inc., Florida. Cap. 23 p. 616, 2006.

HARRISON GJ, et al. Clinical comparison of anesthetics in domestic pigeons and cockatiels. **Proc Assoc Avian Vet**, 1985, pp 7-22.

HAUPTMANOVA, K.; LITERÁK, E.; BÁRTOVA, E. Haematology and Leucocytozoonosis of Great Tits (*Parus major* L.) During Winter. *Acta. Vet. Brno.* v. 71, p. 199 – 204, 2002.

HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, M.; RATH, N. C. Sex Differences in the Resistance of Turkeys to *Escherichia coli* Challenge After Immunosuppression with Dexamethasone. **Poultry Science** , v. 78, p. 38–44, 1999.

HASSELQUIST, D.; MARSH, J.A.; SHERMAN, P.W.; WINGFELD, J.C. Is avian humoral immunocompetence suppressed by testosterone? **Behavioral Ecology Sociobiology**, v. 45, p. 167-175, 1999.

HOWLET, J. C.; SAMOUR, J. H. ; NALDO, J. L.; D'ALOIA, M. A. Age-related hematologic changes in captive-reared houbara, white-bellied and rufous-crested

bustards. **Journal of Wildlife Diseases**, vol. 38, p. 804–816, 2002.

HERNÁNDEZ, M.; MARGALIDA, A. Hematology and blood chemistry reference values and age-related changes in wild bearded vultures (*Gypaetus barbatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, vol. 46, n. 2, p. 390-400, 2010.

KLEIN, S. L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunology**, v. 26, p. 247–264, 2004.

KÖNIG, B.; KLUGE, H.; HAASE, K.; BRANDSCH, C.; STANGL, G. I.; EDER, K. Effects of clofibrate treatment in laying hens. **Poult. Sci.**, v. 86, p. 1187–1195, 2007.

LUMEIJI, J. T. Avian clinical biochemistry. in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. ed. Academic Press, San Diego, CA., p. 857–883, 1997.

MEADOWS, M. G.; ROUDYBUSH, T. E.; MCGRAW, K. J. Dietary protein level affects iridescent coloration in Anna's hummingbirds, *Calypte anna*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, p. 2742-2750, 2012.

MONIELLO, G.; BOVERA, F.; RIU, N.D.; PICCOLO, G.; PINNA, W.; MEO, C.D. Gender effect on the metabolic profile of ostriches (*Struthio camelus domesticus*). **Ital. J. Anim. Sci**, v. 5, Pp.229-235, 2006.

MONSALVE, S.; MIRANDA, J.; MATTAR, S. First evidence of *Chlamydophila psittaci* circulation in Colombia: a possible public health risk. **Rev. salud pública**, v. 13, p. 314-326. 2011.

MONTEIRO, R.V.; DIETZ, J. M.; JANSEN, A. M. The impact of concomitant infections by *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminths on the health of wild golden and golden-headed lion tamarins. **Research in Veterinary Science**, Vol. 89, p. 27-35, 2010.

OIE. Avian Chlamydiosis. In: Section: Aves. **OIE Terrestrial Manual**, 2012.

PROENÇA, L. M.; CARVALHO, C. M.; COSTA, E. L.; CARVALHO, A. M., FAGLIARI, J. J. Estudo epidemiológico e avaliação de diferentes protocolos de tratamento para *Chlamydophila psittaci* em aves de companhia no Distrito Federal. **Anais do XIII Congresso ABRAVAS**, 2010.

QUINTANA, F.; LÓPEZ, G.C.; SOMOZA, G. A Cheap and Quick Method for DNA-based sexing of birds. **Waterbirds**, v. 31, n. 3, p. 485-488, 2008.

R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RASO, T. F.; JÚNIOR, A. B. PINTO, A.A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrots in Brazil. **J Zoo Wildl Med.**, vol. 33, n.2, p.118-121, 2002.

RASO, T.F.; GODOY, MILANENO, L.; SOUZA, C. A. I.; MATUSCHIMA, A. R.; JÚNIOR J. P. A.; PINTO, A. A. et al. 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 Bluefronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**. vol.117, p. 235-241, 2006;

ROBERTS, M. L.; BUCHANAN, K. L.; HASSELQUIST, D.; EVANS, M. R. Effects of testosterone and corticosterone on immunocompetence in the zebra finch. **Hormones and Behavior**, v. 51, p. 126–134, 2007.

REDIG, A.J.L.; DUNNETTE, A.L.; MAURO, A.V.; MARKHAM, B.F. The In Vitro Response of Turkey Lymphocytes to Steroid Hormones. **Avian Diseases**. vol. 29 no. 2, 1984.

SCHOLTZ, N.; HALLE, I.; FLACHOWSKY, G.; SAUERWEIN, H. Serum chemistry reference values in adult Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) including sex-related differences. **Poultry Science**, v. 88, p. 1186–1190, 2009

SCHMIDT, E. M. S.; PAULILO, A.C.; SANTIN, E.; DITTRICH, R. L.; OLIVEIRA, E. G. Hematological and Serum Chemistry Values for the Ring-necked Pheasant (*Phasianus colchicus*): Variation with Sex and Age. **International Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 2, p. 137-139, 2007.

SRIBHEN, C.; CHOOTHESA, A.; SONGSERM, T.; ISSARIYODOM, S.; SRIBHEN, K. Sex-based differences in plasma chemistry and cardiac marker test results in Siamese fighting fowl. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 35, n. 3, 2006

ZARS, J. H. Biostatistical analysis. Ed. 5. Prentice Hall, 2009.

YANG, J.; LING, Y.; PANG, W.; HE, C. Isolation and characterization of peacock *Chlamydophila psittaci* infection in China. **Avian Dis.** v. 55, n. 1, p. 76 - 81, 2011.

WEATHERBASE, 2012. Brasília Weather. Disponível em: <<http://www.weatherbase.com>>. Acesso em: 30 Jan. 2013.

CAPÍTULO III

1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho demonstra a presença da bactéria na região do Distrito Federal, contribuindo para a avaliação da distribuição e ocorrência da doença no Brasil em aves de cativeiro, além de uma avaliação física e clínica dessas aves, tendo como foco exames clínicos patológicos. Contudo, considerando a baixa bibliografia encontrada sobre ocorrência de clamidiose em psitacídeos no Brasil, há a necessidade de mais estudos epidemiológicos da distribuição da doença. Essa recomendação é feita devido as características dessa doença que pode causar perdas econômicas, não apenas no comércio de psitacídeos, ecológicas e riscos na saúde pública.

ANEXOS

ANEXO I

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

No. Animal:	Sexo: () M () F () Ind.	Faixa Etária: () Jovem () Adulto	Data:
Espécie:	No. do Recinto:	Peso:	
Identificação Individual:	Criadouro:		
Origem:	Tempo no Criadouro:		

Tipo de Recinto:	() Gaiola Pequena	() Gaiola Grande	() Gaiolão	() Incubadora
	() Gaiola de Reprodução	() Outro:		
	() Coberto	() Parcialmente Coberto	() Descoberto	
	() Piso Natural	() Piso Artificial / Tipo:		
	() Sem Poleiros	() Com Poleiros / Tipo:		
	() Sem Comedouros	() Com Comedouros / Tipo:		
() Sem Bebedouros	() Com Bebedouros / Tipo:			
No. de Animais no Recinto:	Condição Sanitária Geral do Recinto: () Sujo () Razoável () Limp			

Protocolo Anestésico / Doses:
Transcurso e Recuperação Anestésicos: () Bom () Regular () Ruim

Aparência Geral:	() Doente	() Saudável	
Atitude:	() Ativo	() Quietos () Irresponsivos	
Comportamento:	() Dócil	() Indócil	
Cond. de Carnes:	() Mto Magro	() Magro () Normal () Obeso	
Hidratação:	() Desidratado	() Normoidratado	
Palp. Hepática:	() Normal	() Pouco Aument. () Mto Aument.	
Ectoparasitas:	() Nenhum	() Poucos () Muitos	Local e Tipo:
Empenamento:	Cobertura	() Bom	
		() Regular	
		() Ruim	
	Qualidade	Aparência	() Boa
		() Regular	
		() Ruim	
Cor	() Normal		
() Anormal			

Alterações:	Tegumentar:
	Buco Facial:
	Ocular:
	Locomotor:
	Respiratório:
	Digestório:
	Neurológico:

Dieta/Suplementações:

Vacinação:

Vermifugação:

Procedimentos:	() Coleta de Sangue / Quantidade:	() Hemograma () Bioquímico
() Swab Traqueal	() Swab Oral	
() Swab Cloacal	() Fezes	

Observações:

ANEXO II

FICHA DE MANEJO / SANITÁRIA

Nome do Criadouro:	
Nome do Proprietário:	
Endereço:	
Telefones:	
Funcionário(s):	Quantidade:
Equipe de Visita:	Data Visita:

Espécies de Animais Criados:	
Outras Espécies de Animais na Propriedade:	

No. de Animais do Plantel: () Filhotes e () Adultos

Funcionários Possuem EPI? () Sim () Não / Se sim, qual(is)?			
Possui Divisões em Áreas? () Sim () Não / Se sim, quantas?			
Possui Sequência para a Limpeza? () Sim () Não / Se sim, qual?			
Frequência de Limpeza:			
Tipos de Materiais Utilizados:	() Vassoura		
	() Rodo		
	() Bucha		
	() Pano		
	() Vassoura de Fogo		
() Outro:			
Tipos de Produtos Químicos:			
Tipos de Recintos:	() Gaiolas Pequenas	() Cobertos	
	() Gaiolas Grandes / Gaiolões	() Parcialmente Cobertos	
	() Gaiolas de Reprodução	() Descobertos	
	() Incubadoras	() Piso Natural	
	() Outro:	() Piso Artificial / Tipo:	
		() Com Poleiros / Tipo:	() Muitos
			() Razoável
			() Poucos
		() Sem Poleiros	
		() Com Comedouros / Tipo:	() Muitos
			() Razoável
	No. de Recintos:		() Poucos
() Sem Comedouros			
() Com Bebedouros / Tipo:		() Muitos	
		() Razoável	
		() Poucos	
	() Sem Bebedouros		
	() Outro:		

Condições Sanitárias:	Poleiros	() Sujo	() Razoável	() Limpo
	Comedouros	() Sujo	() Razoável	() Limpo
	Bebedouros	() Sujo	() Razoável	() Limpo
	Piso	() Sujo	() Razoável	() Limpo
	Grades	() Sujo	() Razoável	() Limpo
	Perímetro	() Sujo	() Razoável	() Limpo

Observações:	

Figura 10: Ficha de manejo sanitária utilizada para avaliar as condições sanitárias de cada criador ou propriedade aonde foram coletada amostra das calopsitas (*Nymphicus hollandicus*)

Anexo III

Grupo	Aves Criadas	Outros Animais	Uso EPI		Divisão em Áreas			Limpeza		Cond. Sanitária
			P ou A	P ou A	Quantidade	Seq. Limpeza	Freq. (semana)	Materiais Utilizados	Produtos Químicos	L/R/S
G1	Calopsitas, Agapornis, Ring Neck, Rosela (Psitacídeos em geral) e Passariformes	Cachorros e galinhas	A	A		Não	1	Troca de jornal	Herbavet	R
G2	Mais de 60 espécies (Psitacídeos e passeriformes)	Nega	A	P	5	Não	2	Espátula	Kiboa	R
G3	Agapornis, Ring Neck, Red rumped, Rosela, Periquitos Australianos, Calopsitas	Cachorro	A	P		Sim	4	Vassoura, Rodo, Lavadora de alta pressão	Kiboa	L
G4	Calopsitas, Periquitos australianos	Nega	A	A		Não	3	Bucha	Água	L
G5	Calopsitas	Cachorros e cavalo	A	P	2	Não	1	Vassoura	Sabão, água sanitária	R
G6	Calopsitas	Nega	A	A		Não	7	Bucha e vassoura	Água	L
G7	Calopsitas, corujas	Cobra, Ratos.	A	A		Não	1	Vassoura	Água e Sabão	R
G8	Calopsitas	Cachorro	A	A		Não	1	Pano	Detergente e veja	L
G9	Calopsita, Jandaia, Rosela, Ring Neck, <i>Roseicollis sp.</i>	Nega	A	P	3	Sim	4	Espátula	Água, Sabão e Amônia quartenária no piso	L
G10	Calopsitas, mandarim e agapornis	Nega	A	A		Não	3	Bucha e Pano	Água e Sabão	L
G11	Calopsitas	Cães	A	A		Não	5	Bucha	Água, sabão e água sanitária	L
G12	Calopsita	Nega Cães, gato, jabuti, tilápia, galinha, vaca, porco, cavalo, burro.	A	A		Não	7	Espátula	Água	L
G13	Calopsitas		A	A		Não	2	Bucha	Água e água sanitária	R
G14	Calopsita	Cães e Gatos	A	A		Não	7	Bucha	Água Sanitária e Sabão	L
G15	Calopsitas	Nega	A	A		Não	4	Espátula	Água e Sabão	L
G16	Calopsitas	Peixe	A	A		Não	4	Escova	Água e Alcool	L

Figura 11: Resultado da avaliação da condição sanitária dos criadores e proprietários das 106 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) analisadas.

A = Ausente; P = Presente; L = Limpo; R = Razoável; S = Sujo; EPI = Equipamento de proteção individual; Seq. Limpeza = Sequência de Limpeza; Cond. Sanitária = Condição Sanitária

Anexo IV

Grupo	Tipo Recinto	Cobertura	Piso	Poleiro		Comedouro		Bebedouro		No. Animais Recinto
				Material	Diâmetro	Material	Qualidade do Alimento	Material	Qualidade da Água	
G1	GG	Completa	Artificial	Madeira	Bom	Plástico	Boa	Vidro	Boa	16
G2	GG	Completa	Artificial	Madeira	Bom	Plástico	Razoável	Plástico	Boa	25
G3	GR	Completa	Cerâmica	Madeira	Bom	Madeira	Boa	Vidro	Boa	2
G4	GP	Completa	Artificial	Madeira	Bom	Plástico	Razoável	Cerâmica	Boa	2
G5	G	Completa	Ferro	Madeira	Bom	Metal	Boa	Plástico	Boa	7
G6	G	Parcial	Artificial	Madeira	Bom	Plástico	Boa	Plástico	Boa	6
G7	G	Completa	Natural	Madeira	Bom	Plástico	Boa	Plástico	Boa	200
G8	GG	Completa	Jornal	Madeira	Bom	Metal	Boa	Plástico	Boa	1
G9	GP	Completa	Cerâmica	Madeira	Bom	Cerâmica	Boa	Cerâmica	Boa	1
G10	GP	Parcial	Jornal	Madeira	Razoável	Vasilha de Plástico	Boa	Vasilha de Plástico	Boa	2
G11	GP	Completa	Artificial	Madeira	Bom	Metal	Boa	Plástico	Boa	2
G12	GP	Completa	Cerâmica	Madeira	Bom	Plástico	Boa	Plástico	Boa	
G13	GP	Parcial	Jornal	Madeira	Bom	Vasilha de Plástico	Boa	Vasilha de Plástico	Boa	1
G14	S	Parcial	Artificial	Madeira	Bom	Plástico	Boa	Plástico	Boa	1
G15	GP	Completa	Artificial	Madeira	Bom	Plástico	Razoável	Cerâmica	Boa	1
G16	GP	Parcial	Jornal	Madeira	Bom	Vasilha de Plástico	Boa	Vasilha de Plástico	Boa	1

Figura 12: Resultado da avaliação da condição sanitária dos recintos das 106 calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) dos criadores e proprietários analisados.

GP = Gaiola pequena; GG = Gaiola Grande; G = Gaiolão; S = Solto