

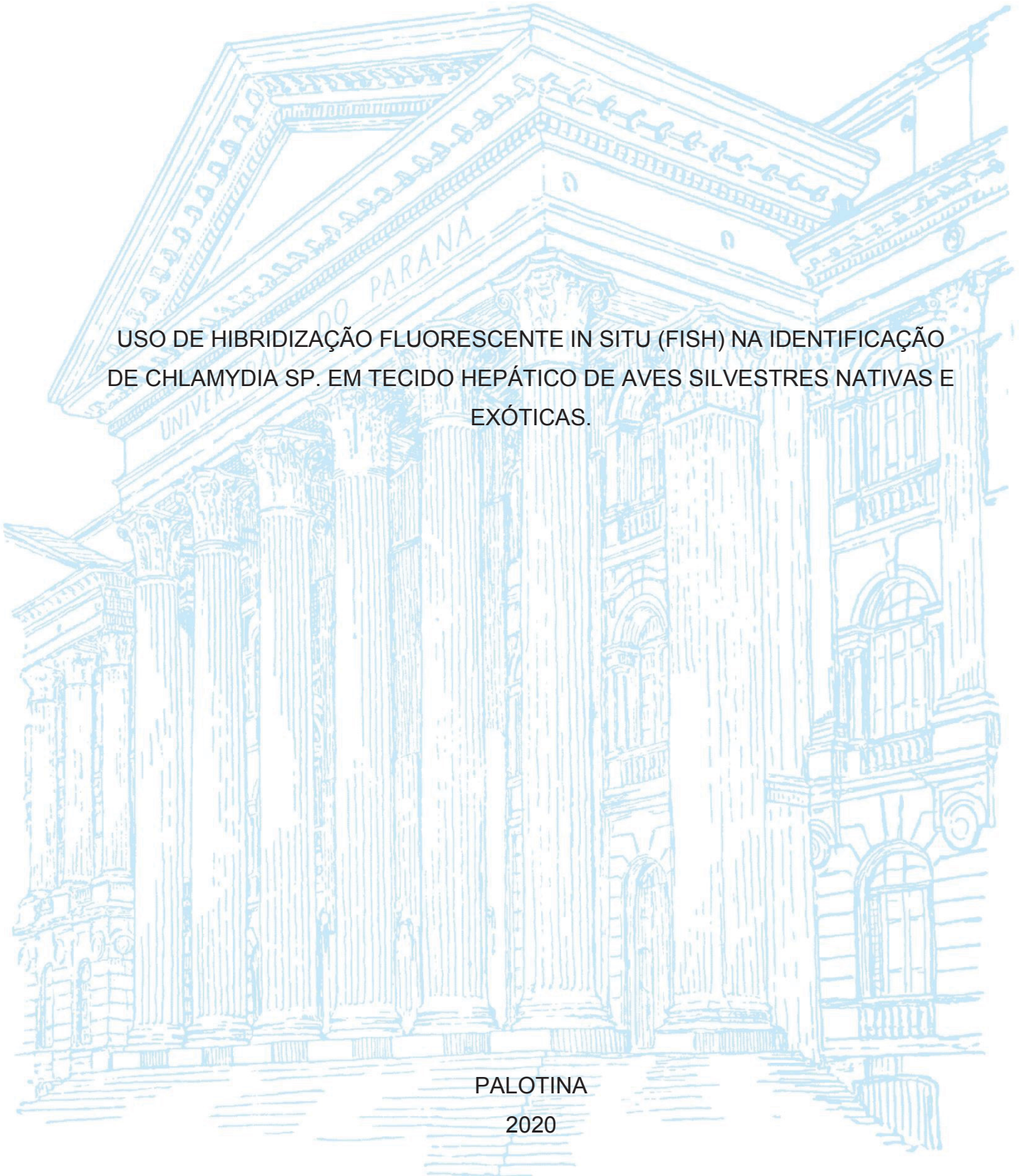
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RONALDO JOSÉ PICCOLI

USO DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH) NA IDENTIFICAÇÃO  
DE CHLAMYDIA SP. EM TECIDO HEPÁTICO DE AVES SILVESTRES NATIVAS E  
EXÓTICAS.

PALOTINA

2020



RONALDO JOSÉ PICCOLI

USO DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH) NA IDENTIFICAÇÃO  
DE CHLAMYDIA SP. EM TECIDO HEPÁTICO DE AVES SILVESTRES NATIVAS E  
EXÓTICAS.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Aline de Marco Viott.

Coorientador: Prof. Me. Anderson Luiz de Carvalho.

PALOTINA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P598 Piccoli, Ronaldo José  
Uso de hibridização fluorescente in situ (FISH) na identificação de *Chlamydia* sp. em tecido hepático de aves silvestres nativas e exóticas / Ronaldo José Piccoli – Palotina, 2020.  
71f.

Orientadora: Aline de Marco Viott  
Coorientador: Anderson Luiz de Carvalho  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Clamídia. 2. Diagnóstico. 3. Patologia. 4. Zoonose. 5. Saúde única. I. Viott, Aline de Marco. II. Carvalho, Anderson Luiz de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de RONALDO JOSÉ PICCOLI intitulada: *Uso de hibridização fluorescente in situ (FISH) na identificação de Chlamydia sp. em tecido hepático de aves silvestres nativas e exóticas, sob orientação da Profa. Dra. ALINE DE MARCO VIOTT*, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 20 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

23/03/2020 15:35:48.0

ALINE DE MARCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/03/2020 09:41:37.0

ROSELENE ECCO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS)

Assinatura Eletrônica

20/03/2020 19:24:07.0

ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço as boas energias do Universo, que se mostram através de várias pessoas, filosofias, crenças e religiões.

Agradeço a minha família, por abdicar do egoísmo e compreender que essa etapa foi importante para mim.

Agradeço a Joice, minha companheira de vida. O amor possibilita tudo, que continue nos dando forças para continuar. “[...] demorou pra ser, mas agora é [...]”.

Agradeço a Manu, Matheus, Pedro, Lucas e a recém-chegada Helena. Sem dúvidas vocês são e serão seres incríveis e bons. Obrigado por ressignificarem a palavra tio e tornarem meus dias mais alegres.

Agradeço a Mayane Faccin, que mesmo longe sempre esteve perto. Da UFFS para a vida!

Agradeço ao Leonardo Gruchouskei, sem ele não teria chegado aqui. Melhor amigo e irmão que a vida me deu.

Agradeço ao Prof. Anderson Luiz de Carvalho, Buia, Lady e Bisteca. Vocês foram e sempre serão minha família em Palotina. Obrigado por todo carinho, todo cuidado, todo ensinamento. Sem vocês a permanência em Palotina não teria o mesmo significado.

Agradeço a minha Orientadora, Profa. Aline de Marco Viott, por toda paciência e ensinamentos. Poucas pessoas são tão iluminadas e humanas como a senhora, és um ponto de luz em meio a escuridão. Obrigado por compartilhar essa luz!

Agradeço ao Prof. Anderson Luiz de Carvalho, que além de um grande amigo foi e sempre será um ótimo professor e orientador. Levo como exemplo sua seriedade, caráter e dedicação aos animais.

Agradeço a Marina Berón por compartilhar seu conhecimento e demonstrar tanto respeito pelo “estranho no ninho”. O seu companheirismo nas necropsias a campo, nas festas, nos momentos de desespero e de neuroanatomia foram imprescindíveis. Seguimos ansiosos pelos nossos chaveiros de cérebro!

Agradeço a todos os residentes e mestrandos do Laboratório de Patologia Animal da UFPR, em especial a Karim C. Pase e Juliana C. Goulart, por todo conhecimento trocado e ajuda durante a execução desse trabalho.

Agradeço a todos em estagiários do Laboratório de Patologia Animal da UFPR, em especial a Aline Patrícia Grzegozevski, Arthur Colombari Cheng, Jaqueline Coelho França e Geórgia Carolina Rohden da Silva, a dedicação de vocês a esse trabalho e ao laboratório é exemplar.

Agradeço aos residentes e estagiários do serviço de Atendimento a Animais Silvestres da UFPR-Palotina, a colaboração de vocês foi imprescindível.

Agradeço a todos os amigos que contribuíram e torceram por um desfecho favorável.

Agradeço a UFPR-Palotina pela acolhida e por oportunizar o acesso a diferentes conhecimentos.

“[...] Mas não debes temer que o estudo se torne parte de você, até ser tão natural quanto respirar. Deve ampliar sua mente para absorver tudo o que temos para ensinar. [...]” (NOAH GORDON, 1986)

## RESUMO

A clamidiose, é umas das afecções de caráter zoonótico mais importante das aves, a doença cosmopolita, listada em diversas espécies animais, inclusive no ser humano. No Brasil, os dados epidemiológicos sobre clamidiose são escassos, principalmente devido à dificuldade de diagnóstico ou acesso a esse. O uso de técnicas diagnósticas eficazes e rápidas são de grande valia pois possibilitam o controle adequado da doença. O objetivo desse trabalho foi aplicar a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (*FISH*) para o diagnóstico de *Chlamydia* sp. em tecidos hepáticos fixados em formol de aves silvestres e exóticas. Cortes histológicos do fígado de 137 aves foram examinados por histopatologia e por *FISH*. As amostras foram divididas em grupos retrospectivos (n=57) composto por aves diversas e prospectivos (n=80) formado exclusivamente por *Columba livea*. A sonda foi sintetizada com base em uma sequência de anelamento correspondente a um segmento do gene codificador *MOMP* (*Major Outer Membrane Protein*) de *Chlamydia* sp., e foi constituída de 20 bases e acrescida do fluorocromo Alexa Fluor 555. Os controles positivos foram oriundos de tecidos hepáticos de aves positivas para *Chlamydia psittaci* pelas técnicas de PCR e imuno-histoquímica. A alteração predominante na microscopia hepática do grupo retrospectivo foi hepatite necrótica linfocitocitária e heterofílica com 25% (14/57), seguidos de 9% (5/57) para congestão e para colestase, 5% (3/57) para fibrose portal associada a hiperplasia de ductos biliares, seguidas de outras de menor frequência. A ausência de lesões foi observada em 39% (22/57) dos casos. No grupo prospectivo as lesões mais observadas foram as de hepatite necrótica linfocitoplasmocitária e heterofílica correspondentes a 60% (48/80) dos casos, seguido de 14% (11/80) de vacuolização citoplasmática associada a congestão, 8% (5/80) para vacuolização citoplasmática associada a congestão e colestase, seguido de outros de menor frequência. A ausência de lesões foi observada em 4% (3/80) dos casos. Das amostras testadas, 67% (92/137) foram positivas pela técnica da *FISH*. A positividade foi distribuída em oito Ordens e 16 diferentes espécies de aves. Além disso, de todos os casos avaliados, apenas 1% (2/137) apresentaram manifestações clínicas, lesões macroscópicas e/ou lesões microscópicas sugestivas de Clamidiose, sendo essas pertencentes a espécimes de *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro). Na avaliação subjetiva do número de organismos marcados por campo, foi observado que 42% (39/92) das amostras continham até cinco marcações por campo (+), 14% (13/92) continham de seis a dez marcações por campo (++) e 43% (40/92) continham mais que 11 marcações por campo (+++). A técnica de *FISH* foi específica e eficaz para identificar *Chlamydia* sp. em corte de tecidos hepáticos de aves, representando uma nova técnica a ser usada para o diagnóstico da clamidiose aviária.

**Palavras-chave:** Clamídia, diagnóstico, patologia, zoonose, saúde única.



## ABSTRACT

Chlamydiosis is one of the most important zoonotic diseases of birds, the cosmopolitan disease, listed in several animal species, including humans. In Brazil, epidemiological data on chlamydiosis are scarce, mainly due to the difficulty of diagnosis or access to it. The use of effective and rapid diagnostic techniques is of great value as they enable adequate control of the disease. The objective of this work was to apply the fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique for the diagnosis of *Chlamydia* sp. in liver tissues fixed in formaldehyde from wild and exotic birds. Histological sections of the liver of 137 birds were examined by histopathology and FISH. The samples were divided into retrospective groups (n = 57) composed of diverse birds and prospective (n = 80) formed exclusively by *Columba livea*. The probe was synthesized based on an annealing sequence corresponding to a segment of the MOMP (Major Outer Membrane Protein) encoding gene of *Chlamydia* sp., and was made up of 20 bases and added by the fluorochrome Alexa Fluor 555. The positive controls came from liver tissues of birds positive for *Chlamydia psittaci* by PCR and immunohistochemistry techniques. The predominant change in liver microscopy of the retrospective group was lymphohistiocytic and heterophilic necrotic hepatitis with 25% (14/57), followed by 9% (5/57) for congestion and cholestasis, 5% (3/57) for associated portal fibrosis bile duct hyperplasia, followed by others of lesser frequency. The absence of injuries was observed in 39% (22/57) of the cases. In the prospective group, the most frequently observed lesions were lymphohistioplasmocytic and heterophilic necrotic hepatitis corresponding to 60% (48/80) of the cases, followed by 14% (11/80) of cytoplasmic vacuolization associated with congestion, 8% (5/80) for cytoplasmic vacuolization associated with congestion and cholestasis, followed by others of lesser frequency. The absence of injuries was observed in 4% (3/80) of the cases. Of the samples tested, 67% (92/137) were positive by the FISH technique. Positivity was distributed in eight Orders and 16 different species of birds. In addition, of all the cases evaluated, only 1% (2/137) presented clinical manifestations, macroscopic lesions and/or microscopic lesions suggestive of Chlamydiosis, these belonging to specimens of *Amazona aestiva* (Turquoise-fronted Parrot). In the subjective evaluation of the number of organisms marked per field, it was observed that 42% (39/92) of the samples contained up to five markings per field (+), 14% (13/92) contained six to ten markings per field (+ +) and 43% (40/92) contained more than 11 markings per field (+++). The FISH technique was specific and effective in identifying *Chlamydia* sp. in section of liver tissues of birds, representing a new technique to be used for the diagnosis of avian chlamydiosis.

**Key-words:** Chlamydia, Diagnosis, Pathology, Zoonosis, One health.

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

°C – Graus Celsius.

µL – Microlitros.

µm – Micrômetro.

CE - Corpo elementar.

CETAS – Centro de Triagem de Animais Silvestres

CR - Corpo reticular.

Da – Dalton.

DAB – Diaminobenzidina.

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*.

FISH – Hibridização fluorescente *in situ*.

HCl – Ácido clorídrico.

HE – Hematoxilina e eosina.

HPLC – Cromatografia Líquida de alta performance.

M – Molar.

min – Minutos.

mL – Mililitros.

mM – Milimolar.

MOMP – *Major Outer Membrane Protein*.

NaCl – Cloreto de sódio.

Ng – Nanograma.

Nm – Nanomolar.

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

pH – Potencial hidrogeniônico.

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio.

TRIS- Tris hidroximetil aminometano.

UFPR – Universidade Federal do Paraná.

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem.

® - marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 CLAMIDIOSE AVIÁRIA .....	18
2.1.1 Etiologia.....	19
2.1.2 Patogênese .....	21
2.1.3 Transmissão.....	22
2.1.4 Manifestações clínicas .....	23
2.1.5 Alterações anatomopatológicas .....	24
2.1.6 Diagnóstico.....	26
2.1.7 Saúde pública.....	27
2.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	29
<b>3 DIAGNÓSTICO DE <i>CHLAMYDIA</i> SP. EM CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE AVES SILVESTRES NATIVAS E EXÓTICAS PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE A – PROTOCOLO FISH .....</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICE B – TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE C – SOLUÇÃO DE LAVAGEM.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A – INSTRUÇÃO AOS AUTORES.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A medicina veterinária de *pets* não convencionais e silvestres está em constante expansão, sendo uma das novas áreas da medicina veterinária. Atualmente não é incomum os tutores optarem pela manutenção de outros animais de companhia que não cães e gatos, e as aves são animais comumente escolhidos para esse fim. Alguns desses animais apresentam capacidade de imitar e emitir sons, cantos melódiosos e apresentam grande beleza devido as variedades de fâneros. As aves são o segundo grupo de animais mais criados em cativeiro, atrás somente dos animais envolvidos nas atividades de aquarismo. Além disso, a preservação e conservação de espécies, bem como a sua manutenção em unidades mantenedoras de fauna, faz com que haja uma demanda eminente à área de medicina aviária. Somado a isso destaca-se a produção de aves para obtenção de subprodutos e proteína animal.

O aumento da proximidade das aves com o homem, bem como a manutenção e criação de zoológicos dedicados somente a esses indivíduos possibilita maior contato com os agentes causadores de doenças nesses animais, sendo muitos deles de caráter zoonótico (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; VASCONCELOS et al., 2013). Logo, estudos acerca do *status* sanitário dos animais, bem como causas *mortis* e monitoração de populações de vida livre e cativeiro contribuem e muito com a vigilância em saúde e a prevenção de zoonoses.

No Brasil, de maneira geral, são escassos os dados sobre a epidemiologia das doenças aviárias, sendo esses muitas vezes subestimados, em parte deve-se isso a carência de técnicas diagnósticas e a dificuldade de acessibilidade (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). A clamidiose é sem dúvida uma das doenças aviárias, de caráter zoonótico, de maior importância, e causa sérios prejuízos à saúde humana e de outros animais (BRAZ et al., 2014). A doença é causada por bactérias do gênero *Chlamydia*, principalmente a *Chlamydia psittaci*, esses organismos são bactérias de parasitismo intracelular obrigatório, cuja transmissão se dá basicamente pela inalação e/ou ingestão de aerossóis, de excretas e/ou secreções respiratórias e/ou oftálmicas de aves contaminadas. A doença causa grandes impactos na produção e manutenção de aves, além do aspecto econômico, deve-se pontuar o seu impacto a conservação das espécies e a saúde pública.

Basicamente, os meios de diagnóstico da clamidiose são embasados na identificação do agente ou fragmentos do seu material genético, seja pelo cultivo e

pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), respectivamente, ou ainda por técnicas que buscam a detecção de anticorpos contra o microrganismo, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de anticorpos fluorescentes, entre outros. Atualmente no Brasil o diagnóstico por PCR tem sido amplamente utilizado; todavia, apesar de seguro, devido a característica de eliminação intermitente do agente, essa técnica pode apresentar resultados falso-negativo (RASO, JÚNIOR, PINTO, 2002).

Técnicas diagnósticas alternativas devem ser buscadas e estudadas, nesse intuito o uso do método de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) apresenta-se como uma possível alternativa de exame diagnóstico da clamidiose. A FISH, apesar de bem difundida e amplamente utilizada no diagnóstico de diversas afecções nas mais distintas espécies animais, não foi empregada, até o momento, para o diagnóstico de *Chlamydia* sp. em tecidos aviários. Logo, o objetivo desse trabalho foi padronizar o uso da técnica para detecção de *Chlamydia* sp. em corte histológicos de fígado de aves silvestres nativas e exóticas recebidas pelo Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, e além disso identificar a presença do agente em diferentes espécies e ordens aviárias, com e sem lesões indicativas da doença.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Capítulo dedicado a revisão de literatura sobre clamidiose aviária e a técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH).

### 2.1 CLAMIDIOSE AVIÁRIA

As bactérias do gênero *Chlamydia* são conhecidas como agentes infectantes e causadores de doenças em várias classes animais, como anfíbios, répteis, aves e mamíferos (KALETA; TADAY, 2003). A clamidiose constitui uma das mais importantes zoonoses de origem aviária, a doença também pode ser denominada de ornitose, clamidofilose ou psitacose (HULIN et al., 2015). A doença foi descrita primariamente em humanos em 1895 (WEST, 2011; HARCOURT-BROWN, 2010; SILVA, 2013), nesse período constatou-se a presença de um agente infeccioso, transmitido pelos papagaios, fato que acabou por nomear a doença de psitacose (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). Inicialmente o agente foi classificado como vírus, depois, riquetsia e atualmente pertence ao grupo das clamídias (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; SILVA, 2013). A *Chlamydia psittaci* foi devidamente identificada apenas em 1968, por apresentar características como inabilidade de acumular glicogênio nas inclusões e a resistência as sulfadiazinas, que contribuíram para a sua diferenciação da *Chlamydia trachomatis*.

Ao passar dos anos o agente foi classificado e reclassificado quanto ao seu gênero, entre *Chlamydophila psittaci* e *Chlamydia psittaci*, assim como outras espécies de clamídias. Os principais motivos para a troca de nomenclatura e classificação do agente se deu pelas inúmeras incertezas acerca da natureza microbiana do organismo, logo, as alterações decorreram dos avanços e descobertas sobre os aspectos morfológicos, modos de replicação e os métodos empregados para a detecção e identificação do agente (KALETA; TADAY, 2003). Apesar de evidências filogenéticas listadas por vários autores, Sachse et al. (2015) propuseram a união de todos os organismos da família *Chlamydiaceae* sob um único gênero, *Chlamydia*, uma vez que as características quimiotaxonômicas e fenotípicas das diferentes espécies de clamídia não são suficientemente específicas para serem usadas como um clivo taxonômico.

No decorrer da história vários surtos da doença foram registrados, como o de 1929, em que houve uma verdadeira pandemia da doença na Europa e América do Norte, por conta da importação de psitacídeos da América do Sul (WEST, 2011). As

infecções por *Chlamydia* sp. são relatadas em vários pontos do mundo, a sua importância se dá pelos impactos gerados à economia, com perdas de produtividade e de aves aos proprietários, e aos gerados a saúde pública, dado ao potencial zoonótico dos agentes (LAROUCAU et al., 2009). Ainda deve-se acrescentar nessa lista os prejuízos à fauna, em seu caráter conservacionista.

Há pouco tempo atribuía-se a clamidiose aviária apenas a espécie *C. psittaci*, todavia atualmente entende-se que a afecção pode ser causa por outras espécies, tornando a epidemiologia da doença bastante complexa (GUO et al. 2016).

### 2.1.1 Etiologia

A clamidiose é uma doença cosmopolita, de caráter infeccioso causada pelas bactérias Gram-negativas do gênero *Chlamydia*, nas aves, a principal espécie é *Chlamydia psittaci*, esse agente possui característica de grande infectividade e parasitismo intracelular obrigatório (TULLY, 2006; HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; LAROUCAU et al., 2009; POPPERT et al., 2002; KALETA; TADAY, 2003; WEST, 2011; SACHSE et al., 2014; LEAL et al., 2015; SACHSE et al., 2015; GUO et al., 2016; REAVILL; DORRESTEIN, 2018; LI et al., 2020). O organismo apresenta tamanho variado, com 200x1500nm ou mais (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011).

O gênero *Chlamydia* alberga 13 espécies reconhecidas, a saber: *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. muridarum*, *C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. pneumonia*, *C. suis*, *C. trachomatis*, *C. serpentis*, *C. poikilothermis*, *C. avium* e *C. gallinacea* (BOMMANA; POLKINGHORNE, 2019; CHEONG et al., 2019). Acrescido a essas, atualmente existem três táxon *Candidatus*, a saber: *Candidatus Chlamydia ibidis*, *Ca. C. corallus* e *Ca. C. sanzinia* (CHEONG et al., 2019). Cada uma das espécies, de acordo com Sachse et al. (2014), apresenta predileção por determinados hospedeiros, como a exemplo das espécies *C. caviae* e *C. felis* que tem sido vinculadas as infecções em cobaias e felinos, respectivamente. Apesar da característica espécie-específica desses organismos, algumas espécies como *C. pneumonia* e *C. psittaci* apresentam uma gama mais variada de hospedeiros, sendo a última vinculada a infecções em aves, humanos, bovinos, equinos, suínos e outro animais (SCHNEE; VANROMPAY; LAROUCAU, 2018). Até pouco tempo a *C. psittaci* era considerada a única a infectar aves, todavia Sachse et al. (2014), em seu trabalho relataram a ocorrência de duas novas espécies isoladas de aves a *C. avium* e *C. gallinacea*. Casos de aves positivas para *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. suis*, *C. trachomatis* e *C. muridarum* têm sido



relatados, apesar da importância epidemiológica desse fato não ser bem esclarecida (SACHSE et al., 2012; GUO et al., 2016). Todas as espécies de clamídias possuem potencial zoonótico (LI et al., 2020), uma vez que é evidente a capacidade de vencer a barreira hospedeiro e, portanto, infectar novos hospedeiros, inclusive seres humanos (GUO et al., 2016). Dentre as espécies que acometem aves a *C. psittaci* tem capacidade zoonótica bem esclarecida. Embora, já existam importantes associações entre outras espécies, como a *C. gallinacea*, e doenças em humanos, os aspectos de patogenicidade e potencial zoonótico ainda necessitam de uma investigação sistemática (LAROUCAU et al., 2009; GUO et al., 2016).

*C. psittaci* apresenta um ciclo de desenvolvimento caracterizado em duas fases distintas, que diferem em sua morfologia e sua função, a saber: o corpo elementar (CE) e o corpo reticular (CR) (POPPERT et al., 2002; RASO et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2013; FERREIRA, 2014; REAVILL; DORRESTEIN, 2018). O CE apresenta tamanho menor (0,3µm), uma cromatina mais densa e agrupada na periferia da célula. A forma de CR apresenta maior tamanho (0,5 – 1,6µm) e com cromatina dispersa, uma vez que essa é forma replicante do organismo (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; BAYRAMOVA; JACQUIER; GREUB, 2018).

Todas as formas do organismo têm em sua membrana externa a *major outer membrane protein* (MOMP), que constitui 60% do total de proteínas da membrana externa, sendo essa importante à infecção clamidial (VASCONCELOS et al., 2013; FERREIRA, 2014). Além disso a MOMP tem sido foco de estudo para desenvolvimento de agente profilático, como vacinas (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). O conhecimento da porção MOMP mostra-se importante para determinar os diferentes sorotipos do organismo, uma vez que o gene que codifica a proteína, o gene *ompA*, possui cinco regiões de sequência variável e conservada (VANROMPAY, 2020).

Os sorotipos de *C. psittaci* são divididos em A, B, C, D, E, F, EB, 1V, 6N, Mat16, R54, YP84, CPX308, I, J, M56 e WC (SACHSE et al., 2009; MADANI; PEIGHAMBARI, 2012; LI et al., 2020). Os sorotipos apresentam distribuição entre as ordens e espécies de aves, como o sorotipo A que é endêmico de psitacídeos, sorotipo B comumente isolado de pombos, sorotipo C isolado em patos e gansos, o sorotipo D altamente virulento e correlato as infecções em perus, o sorotipo F isolado em psitacídeos e perus, o sorotipo E que apresenta uma menor especificidade, sendo

isolados de pombos, ratitas, patos e perus, assim como o sorotipo EB, isolado principalmente de patos, perus e pombos (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; SACHSE et al., 2009; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). Os sorotipos M56 e WC foram isolados de epizootias em rato-almiscarado (*Ondatra zibethicus*) e bovinos, respectivamente (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; SACHSE et al., 2009).

### 2.1.2 Patogênese

A patogênese da doença na célula eucariota tem início pela endocitose ou fagocitose da forma infectante (CE), que de acordo com Banhart et al. (2019), ocorre mediado por receptores, como adesinas bacterianas, receptores das células do hospedeiro e proteoglicanos de heparan sulfato. Uma vez fagocitadas as estruturas clamídias são alojadas dentro de inclusões, que nada mais são que vacúolos não acidificados, dentro dessas estruturas as células bacterianas secretam substâncias que impedem a ligação do lisossoma ao endossoma, e ali passam a forma ativa (CR), caracterizada pela alta taxa de divisão binária. As inclusões, além de serem de extrema importância por acomodarem os CR que são instáveis osmoticamente, são pontos importantes de fuga do sistema imune, por parte do agente. Logo, após as sucessivas divisões dar-se-á a ruptura e morte da célula hospedeira, liberando no local formas infectantes e formas ativas ou ainda o processo de extrusão, em que a inclusão é liberada para o tecido ainda envolta pela membrana plasmática das células hospedeiras (POPPERT *et al.*, 2002; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; BANHART et al., 2019). Todavia, nos casos de infecções persistentes, associadas aos casos crônicos da doença, algumas clamídias têm seu desenvolvimento incompleto, não atingem o estado de corpo reticular, porém permanecem em uma fase intermediária com formatos aberrantes, como a apresentação oval, com metabolismo ativo e formação de pequenas inclusões, e são denominadas como corpos aberrantes (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009, LEAL et al., 2015, BAYRAMOVA; JACQUIER; GREUB, 2018; BANHART et al., 2019). A formação de corpos aberrantes é uma resposta do agente etiológico frente a condições desfavoráveis, comumente associadas a privação de nutrientes ou resposta imunológica do hospedeiro, essa forma é que permite a sobrevivência das clamídias por longos prazos nas células do hospedeiro (CHEONG et al., 2019).

As estruturas bacterianas, uma vez dentro da célula, organizam-se pela periferia e próximo aos complexos de Golgi, além disso, os corpos elementares impedem a fusão dos lisossomos e outras organelas ao vacúolo, após oito horas de infecção tem-se início a replicação do agente (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; BAYRAMOVA; JACQUIER; GREUB, 2018). Diversas estruturas mitocondriais são recrutadas ao vacúolo de inclusão, uma vez que a demanda de ATP necessária pela *Chlamydia psittaci* em sua fase de replicação é alta, e diferente de outras espécies de clamídias, essa espécie não é capaz de suprir totalmente sua demanda energética (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009). Diferente de outros organismos que realizam a replicação livre no citosol e que conseguem, portanto, acessar os nutrientes dispersos no citoplasma, organismos como a *Chlamydia psittaci* necessitam de mecanismos que permitam a importação de nutrientes para dentro do vacúolo de inclusão, todavia os mecanismos ainda não estão totalmente claros, sabe-se que a membrana dos vacúolos de inclusão são permeáveis a moléculas de 100 a 520 Da, contudo o transporte de substâncias de maior peso molecular dependeriam de transportadores de membrana, até então não identificados nos vacúolos de inclusão (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009).

### 2.1.3 Transmissão

Nas aves a transmissão e infecção pelo agente se dá principalmente por via aerógena, pela inalação das excretas secas, secreções oftálmicas e secreções do sistema respiratório de aves infectadas. Além disso, em menor importância relata-se a transmissão de forma vertical, pelo ovo, e pela picada de insetos hematófagos (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; WEST, 2011). Alimentos e fômites contaminados podem atuar como fonte de infecção para os animais, logo, a higiene e qualidade do alimento são fatores importantes a serem considerados, uma vez que o agente pode manter-se viável por até 30 dias nas excretas e roupas contaminadas (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009). O período de incubação varia de três dias a várias semanas (WEST, 2011).

A eliminação intermitente e prolongada do agente nas excreções das aves infectadas, com manifestações clínicas ou não, característica desse agente, contribui para que a afeição tenha se tornado uma preocupação à saúde pública, pois contribui

para a contaminação ambiental e sua disseminação à outras aves e/ou seres humanos (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002; BRAZ et al., 2014; RASO, 2016; ARAUJO et al., 2019). Madani e Peighambari (2012) e Ferreira (2012) não evidenciaram diferença estatística entre a eliminação do agente nas diferentes estações do ano, o que contrapõe uma ideia de sazonalidade.

O número de espécies aviárias acometidas pela *C. psittaci* tem aumentado, cerca de 469 espécies de aves distribuídas em 30 diferentes Ordens já apresentaram registro para o agente (KALETA; TADAY, 2003). Dentre as Ordens que apresentam maiores taxas de infecção e atuam como principais reservatórios de *Chlamydia psittaci* destacam-se os columbiformes e psittaciformes, contudo, aves pertencentes a outras ordens como gaivotas, garças, patos, melro, iraúnas e pardais são reservatórios comuns e importantes (CHAHOTA et al., 2006; HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; MADANI; PEIGHAMBARI, 2012; GUO et al., 2016; ARAUJO et al., 2019).

#### 2.1.4 Manifestações clínicas

Nas aves as manifestações clínicas da doença vão desde infecções inaparentes ou subclínicas até a instalação de doença sistêmica grave com alta mortalidade (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). Os quadros clínicos variam de acordo com a espécie envolvida, o estágio de desenvolvimento da ave e seu *status* imune, além das condições inerentes ao manejo desses animais. Somado aos fatores ligados ao hospedeiro, o grau de patogenicidade difere em decorrência dos sorotipos envolvidos (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002; WEST, 2011; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011).

Os animais acometidos podem apresentar quadros de anorexia, emaciação, diarreia amarelo-esverdeada (alteração na coloração dos uratos devido a biliverdinúria), penas eriçadas, conjuntivite, blefarite, rinite, aerossaculite, vasculite, pneumonia, pericardite, enterite, celomite, hepatite, esplenite, glomerulonefrite, hepatomegalia e esplenomegalia (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002; HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; HARCOURT-BROWN, 2010; WEST, 2011; LEAL et al., 2015). Fatores como subnutrição, estresse, mudanças bruscas de temperatura, superlotação e transporte prolongado favorecem a reativação da eliminação do agente em aves assintomáticas (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; MADANI;

PEIGHAMBARI; BARIN, 2011; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; LEAL et al., 2015; ARAUJO et al., 2019).

#### 2.1.5 Alterações anatomopatológicas

As alterações anatomopatológicas podem ser bastante variadas nos casos de clamidiose, uma vez que não há alterações patognomônicas nessa doença (RASO, 2009; SCHNEE; VANROMPAY; LAROUCAU, 2018). Contudo, as lesões de clamidiose mais comuns entre as diversas espécies aviárias são hepatomegalia, esplenomegalia, aerossaculite, pericardite e enterite (RASO, 2009; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015a; REAVILL; DORRESTEIN, 2018). No trabalho de Ecco et al. (2009) e Casagrande et al., (2014) os animais demonstraram emaciação, pontuado pela pobre condição corpórea, inglúvio repleto de alimento, além de hepatomegalia e esplenomegalia acentuadas. De acordo com Raso (2009) e Proença, Fagliari e Raso (2011), além do aumento de tamanho, o baço pode apresentar-se mais friável e conter focos necróticos esbranquiçados ou ainda petéquias na sua superfície. O fígado por sua vez, pode apresentar-se mais friável com alteração na coloração do órgão, tornando-se mais amarelado ou esverdeado, com pequenos focos fibrinosos ou necróticos subcapsular e na superfície de corte (RASO, 2009; CASAGRANDE et al., 2014; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015a; REAVILL; DORRESTEIN, 2018). As alterações encontradas em pericárdio, quando presentes, são o espessamento, congestão e a presença de coleções de exsudato seroso ou fibrinoso (RASO, 2009; CASAGRANDE et al., 2014; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015c). No sistema respiratório, as alterações encontradas são congestão pulmonar, espessamento de sacos aéreos, com aumento da turbidez dessas membranas, além da coleção de exsudato fibrinosupurativo em sua superfície e lúmen (RASO, 2009; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015b). Por fim, Raso (2009) relata que alterações como orquite e epididimite podem ser observadas em perus. Casagrande et al. (2014) relatam casos de animais positivos para o agente sem nenhuma alteração de necropsia.

As alterações na histologia hepática correlatas aos quadros de clamidiose são relacionadas a presença de um infiltrado inflamatório, *a priori* mononuclear, difuso entre os sinusóides hepáticos; muitos macrófagos contendo pigmento marrom-esverdeado – consistente com pigmento biliar e hemossiderina; áreas multifocais a coalescentes de necrose e associado a essas, um infiltrado inflamatório composto por

heterófilos (ECCO et al., 2009; CASAGRANDE et al., 2014; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN; 2015a). Ainda de acordo com os autores, em alguns casos é possível encontrar macrófagos e hepatócitos contendo o agente etiológico. Nos casos mais crônicos da doença, alterações histológicas como fibrose portal e hiperplasia de ducto biliar podem ocorrer (CASAGRANDE et al., 2014; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015a).

As alterações esplênicas são evidenciadas pela perda da arquitetura normal do órgão, áreas multifocais de necrose, aumento no número macrófagos, hiperplasia das células reticulares e plasmocitose, além de exsudação fibrinosa (RASO, 2009; ECCO et al., 2009; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015d). Casagrande et al. (2014) também relataram a presença de hemossiderose.

Nos sacos aéreos o agente induz alterações histológicas como aerossaculite fibrinosa com a deposição e acúmulo de fibrina, infiltrado inflamatório predominantemente linfo-histioplasmocitário e restos de células dos sacos aéreos (RASO, 2009; CASAGRANDE et al., 2014; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015b). Além dos sacos aéreos, o tecido pulmonar pode apresentar deposição de fibrina e infiltrado por macrófagos no lúmen dos parabônquios (CASAGRANDE et al., 2014). Assim como na microscopia hepática, no baço e no sistema respiratório é possível a visualização do agente como estruturas puntiformes basofílicas no interior dos macrófagos (ECCO et al., 2009; SCHIMIDT; REAVILL; PHALEN, 2015a).

Segundo trabalho realizado por Casagrande et al. (2014), alterações histológicas como rarefação ou necrose linfoide da Bursa de *Fabricius* pode ser evidenciada. Necrose fibrinóide com distribuição multifocal associada a infiltrado linfo-histioplasmocitário perilesional ou múltiplos granulomas, compostos por centros de necrose fibrinóide circundada por células gigantes multinucleadas podem ser observados no tecido renal (CASAGRANDE et al., 2014).

O uso de colorações especiais, como Giemsa e Gimenez modificado (PVK), auxiliam na visualização e identificação do agente no corte histológico (ECCO et al., 2009; REAVILL; DORRESTEIN, 2018). A coloração de Gimenez destacará os pequenos organismos intracelulares, que podem ser encontrados em macrófagos ou em células como hepatócitos, todavia em muitos casos a visualização do agente também é possível fora das células infectadas (KALETA; TADAY, 2003; REAVILL; DORRESTEIN, 2018). Os preparos citológicos frescos tendem a facilitar a leitura e identificação dos agentes, quando comparados aos cortes histológicos (REAVILL;

DORRESTEIN, 2018). Todavia, segundo Ecco et al (2009), a visualização dos corpos de inclusão contendo o organismo é muito raro no tecido aviário.

#### 2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da clamidiose é de difícil execução, uma vez que não há manifestações clínicas patognômicas e as alterações encontradas em alguns dos exames complementares como leucocitose, alteração em enzimas hepáticas, aumento da silhueta hepática nos exames radiográficos, esplenomegalia e alterações em sacos aéreos podem apenas sugerir a presença da doença (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). De acordo com Reavill e Dorrestein (2018), deve-se considerar que nenhum teste *ante mortem* certifica que uma ave esteja livre do agente.

O método de diagnóstico preconizado para *Chlamydia psittaci* é o isolamento bacteriano, todavia por ser um organismo com característica de parasitismo intracelular obrigatório faz-se necessário o uso do cultivo celular, o que requer adequações de biossegurança e cuidados no momento da coleta e manutenção da amostra, cuidados de alta dificuldade para a rotina diagnóstica (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; CASAGRANDE et al., 2014). A *C. psittaci* é capaz de infectar humanos, logo, deve ser manuseada de forma segura, seguindo medidas de biocontenção. Logo, formas alternativas de diagnóstico são adotadas, frente as dificuldades de cultivo e isolamento do organismo, sendo essas classificadas em dois grupos, as de identificação direta, que consiste na identificação da bactéria e a indireta, que busca realizar a detecção de anticorpos contra esses organismos.

Métodos como ensaio imunoenzimático (ELISA), teste de anticorpos fluorescentes, teste de aglutinação dos corpos elementares, teste de imunofluorescência indireta, teste de fixação do complemento direto e modificado, juntamente com PCR são os métodos usados para a detecção da presença do agente (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011; CASAGRANDE et al., 2014). O PCR é o teste mais utilizado para a detecção desse agente na rotina clínica, uma vez que apresenta alta sensibilidade e especificidade (PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). Porém, a presença de falsos negativos não é rara, devido a eliminação intermitente do agente (LEAL et al., 2015). Além disso, o PCR não permite a diferenciação entre uma ave doente de uma portadora (CASAGRANDE et al., 2014). A qualidade da amostra é ponto importante, excretas secas, contaminadas com restos de alimento ou material

do solo geram maior dificuldade na obtenção de um resultado confiável (LEAL et al., 2015).

Comumente amostras de fezes ou mesmo *swabs* cloacais e de orofaringe são usados como material diagnóstico, uma vez que a coleta de amostras de distintos sítios e em momento distintos aumenta a chance de diagnóstico da *C. psittaci* (LEAL et al., 2015). De acordo com Rodríguez-Leo et al. (2017) e Araujo et al. (2019), a detecção de clamídias pelos *swabs* cloacais indicam infecções mais crônicas enquanto animais em estágios mais inicial da infecção apresentam maior positividade nos *swabs* de orofaringe.

Exames como a imuno-histoquímica são empregados no diagnóstico *post mortem* da clamidiose aviária, sendo essa, a técnica com maior acurácia para tecidos fixados (ECCO et al., 2009; CASAGRANDE et al., 2014). Os órgãos de eleição para realização do exame são fígado e baço. Ponto importante da imuno-histoquímica é a possibilidade de correlacionar a presença do agente com o processo lesivo e até mesmo inferir que o agente foi responsável pela morte do animal ou simplesmente permanecia em latência (CASAGRANDE et al., 2014). Todavia, ponto negativo da técnica, segundo Webster et al. (2009), é a não marcação, dada em tecidos que foram armazenados por longos períodos em formaldeído de baixa qualidade, uma vez que a permanência em demasia dos tecidos nessa solução fixadora pode alterar os epítomos e por conseguinte interferir na habilidade dos anticorpos em reconhecerem os antígenos presentes no corte. Casagrande et al. (2014) destacam que a escolha do cromógeno é ponto importante nas avaliações quando da suspeita de clamidiose aviária, principalmente em tecidos hepáticos e esplênicos, uma vez que muitas imunomarcações assumem coloração marrom, muito semelhante aos pigmentos férricos e biliares, tornando assim, a diferenciação dessas de difícil leitura.

#### 2.1.7 Saúde pública

A busca e aquisição de espécies não convencionais como animais de companhia faz com que a medicina veterinária de silvestres e exóticos sofra considerável expansão. As aves, fazem parte desse grupo de animais, uma vez que apresentam lindas plumagens, cantos melodiosos ou capacidade de imitar a fala humana. Fatores como esses, fazem com que a relação entre aves e homens seja cada vez mais próxima e por conseguinte predispõem que populações humanas se



tornem sujeitas as doenças de carácter zoonótico dessa Classe animal (PROENÇA, FAGLIARI; RASO, 2011; VASCONCELOS et al., 2013).

Considerada como uma das principais doenças de carácter zoonótico que envolve as aves, a clamidiose representa um importante ponto de estudo acerca da medicina aviária e da saúde pública (WEST, 2011; BRAZ et al. 2014). As afecções correlatas aos organismos do gênero *Chlamydia*, em humanos, são reconhecidos como problemas graves à saúde coletiva, associados geralmente a infecções oculares, genitais, cardiorrespiratórias, como quadros de pneumonia intersticial, e até mesmo ocasionais encefalites (MOSCHIONI et al., 2001; ISHAK; ISHAK, 2001; POPPERT et al., 2002; HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; SACHSE et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2013).

O período de incubação da *Chlamydia psittaci* em humanos varia de 5 a 15 dias, todavia períodos maiores são relatados (MOSCHIONI et al., 2001). As manifestações clínicas iniciais da doença, quando presentes, são semelhantes aos da gripe/resfriado como: febre, arrepios, mal-estar, cefaleia, calafrios e mialgia (MOSCHIONI et al., 2001; SACHSE et al., 2009). *A priori* essa inespecificidade inicial da afecção contribui para com a confusão com outros agentes, e faz com que haja dificuldade em estabelecer o correto diagnóstico, além de tornar difícil dimensionar o impacto dessa doença na saúde humana. Uma vez empregado o correto manejo terapêutico, a doença raramente mostra-se fatal (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009, WEST, 2011). A presença de animais de vida livre infectados por *C. psittaci* representam uma importante fonte de infecção para outras aves, cativas ou não, bem como para o homem (MADANI; PEIGHAMBARI, 2012; VASCONCELOS et al., 2013; LEAL et al., 2015; BURT; RÖRING; HEIJNE, 2018).

Nos humanos, a infecção dar-se-á principalmente pela inalação do agente em aerossóis das excretas de aves infectadas, contudo, a infecção pode ocorrer através do meio ambiente, sem a necessidade do contato direto com as aves, uma vez que a realização de atividades em ambientes rurais e atividades de jardinagem, por exemplo, quando em locais contaminados, são importantes fontes de infecção. O contato boca-bico, bicada de aves infectadas e manipulação de plumagem e tecidos oriundos de aves infectadas também atuam como possível forma de transmissão (MOSCHIONI et al., 2001; HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; WEST, 2011). Somada as formas anteriormente descritas, recentemente Chan et al., (2017) relataram casos de clamidiose em trabalhadores e alunos de uma escola de medicina

veterinária na Austrália, decorrente de contato com membranas fetais de equinos contaminados com *C. psittaci*, sendo necessários maiores investigações para reconhecer qual o real papel dos equinos como uma fonte de infecção. Contudo, cerca de 85% dos casos da doença em humanos é correlato com o contato direto com aves (MOSCHIONI et al., 2001). Apesar de possível a transmissão da doença de pessoa a pessoa acredita-se que essa seja mais difícil de acontecer. O grupo considerado com maior risco de infecção é composto pelas pessoas que trabalham em aviários, lojas de animais, clínicas veterinárias ou que possuam aves como animais de companhia (WEST, 2011; CASAGRANDE et al., 2014; HULIN et al., 2015; KRAWIEC; PIASECKI; WIELICZKO, 2015).

## 2.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

No Brasil há poucos dados epidemiológicos sobre a prevalência da Clamidiose, sendo os existentes subestimados, devido à baixa disponibilidade de testes diagnósticos e de programas de controle e tratamento inadequados da doença (RASO; JÚNIOR; PINTO, 2002; PROENÇA; FAGLIARI; RASO, 2011). Logo, o desenvolvimento e aplicação de outros testes de diagnósticos são de fundamental importância a saúde das populações aviárias e humana, visando contribuir para formação de dados epidemiológicos mais concisos.

De acordo com Neves e Guedes (2012), constantes preocupações acerca dos métodos diagnósticos são a eficácia e a agilidade, pois são fatores de copiosa importância para o controle de várias doenças. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é um método histoquímico que possibilita, por meio da observação direta de um corte histológico em microscopia ótica de epifluorescência, a visualização, identificação, quantificação, além de localização de micro-organismos no tecido, dispensando a necessidade de cultivo celular (MOTER; GÖBEL, 2000; BOJESSEN et al., 2003; NEVES; GUEDES, 2012). Constitui também, uma importante ferramenta para elucidar a patogênese e distribuição espacial de um amplo número de microrganismos (BOJESSEN et al., 2003). A técnica contribui na rapidez e especificidade dos procedimentos diagnósticos, sendo uma técnica valiosa e de aplicação rotineira na microbiologia clínica moderna (FRICKMANN et al., 2017).

O método permite que sequências de material genético sejam examinadas no interior da célula, sem alterar a morfologia ou a integridade das estruturas celulares (MOTER; GÖBEL, 2000; BOJESSEN et al., 2003; NEVES; GUEDES, 2012). A técnica

de hibridização fluorescente *in situ* emprega-se, também, aos estudos de relações microrganismo *versus* hospedeiro, a nível celular (BOJESSEN et al., 2003). O FISH tem como vantagem adicional fazer uso de tecidos já fixados em formol. A técnica pode ser separada em quatro etapas: fixação e permeabilização da amostra (1); hibridização (2); lavagem para remoção das sondas em demasia (3); e detecção pela microscopia de epifluorescência (4) (FRICKMANN et al., 2017). O funcionamento básico do FISH se dá pelo anelamento de uma sonda específica com uma sequência de material genético alvo, sendo a visualização possível pelo uso de microscópio de epifluorescência (MOTER; GÖBEL, 2000; NEVES; GUEDES, 2012). A fluorescência se dá, pois, a sonda, uma sequência de 15 a 30 nucleotídeos, é acrescida de um fluorocromo. As marcações por sondas podem ser de duas formas distintas, a saber: marcação direta ou indireta. No processo de marcação direta, um ou mais fluorocromos são ligados a sonda, e essa por sua vez anela-se nas regiões 5' ou 3' do segmento alvo. Em contrapartida a marcação indireta faz uso de uma molécula adicional, a digoxigenina, ligando-a a segmentos de nucleotídeos que anelam com o alvo, todavia essa sonda primária não emite qualquer fluorescência. Dado o anelamento inicial faz-se a uso de anticorpos anti-digoxigenina conjugados a fluorocromo, que agora sim emitirá luminescência ao ser excitado por devido comprimento luminoso.

O emprego da técnica de FISH tem sido relatado para o diagnóstico de diversas doenças, em diversas espécies, como na observação de distribuição de *Treponema* sp. em biópsia de dermatite interdigital em bovinos de leite; na identificação de *Brachyspira pilosicoli* em suínos em fase de crescimento; na detecção de *Pasteurella multocida* em galinhas e tecido pulmonar suíno; na identificação de *Enterobacteriaceae in vitro*; na detecção de *Gallibacterium* spp. em cortes histológicos de baço e fígado de galinhas; na investigação de várias bactérias intestinais de galinhas e para identificação de *Tritrichomonas foetus* em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina de diversas espécies de animais (MOTER et al., 1998; JENSEN et al., 2000; MBUTHIA et al., 2001; OOTSUBO et al., 2002; BOJESSEN et al., 2003; OLSEN et al., 2008; GOOKIN et al., 2010). Em relação a detecção de *Chlamydia* sp. através da FISH destacam-se os trabalhos de Poppert et al. (2002), que testou o uso da técnica de em cultivo celular para detecção de diferentes espécies de clamídias em humanos; e Marangoni et al. (2006) realizaram a identificação de *Chlamydia pneumoniae* por FISH em macrófagos e hepatócitos de ratos infectados. Apesar de

ser uma técnica recomendada para o diagnóstico de espécies de *Chlamydia*, não foi encontrado até o dado momento nenhum trabalho que empregue esse método para diagnóstico dessa afecção nas aves. O único trabalho, de conhecimento dos autores, que realizou uma técnica semelhante ao FISH foi o de Theil et al. (1996), que empregou a técnica de Hibridização *in situ* para o diagnóstico de *Chlamydia psittaci*.

### **3 DIAGNÓSTICO DE *CHLAMYDIA* SP. EM CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE AVES SILVESTRES NATIVAS E EXÓTICAS PELA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH).**

Capítulo dedicado ao artigo “Diagnóstico de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de fígado de aves silvestres nativas e exóticas pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH).” O artigo segue as normas da revista *Avian Pathology*.

Diagnóstico de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de fígado de aves silvestres nativas e exóticas pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH).

Ronaldo J. Piccoli<sup>1</sup>, Leonardo Gruchouskei<sup>2</sup>, Aline. P. Grzegozevski<sup>3</sup>, Geórgia C. R. da Silva<sup>4</sup>, Jaqueline C. França<sup>5</sup>, Anderson L. de Carvalho<sup>6</sup>, e Aline M. Viott<sup>7\*</sup>

**Resumo.** A clamidiose, é umas das afecções de caráter zoonótico mais importante das aves, a doença cosmopolita, listada em diversas espécies animais, inclusive no ser humano. No Brasil, os dados epidemiológicos sobre clamidiose são escassos, principalmente devido à dificuldade de diagnóstico ou acesso a esse. O uso de técnicas diagnósticas eficazes e rápidas são de grande valia pois possibilitam o controle adequado da doença. O objetivo desse trabalho foi aplicar a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para o diagnóstico de *Chlamydia* sp. em tecidos hepáticos fixados em formol de aves silvestres e exóticas. Cortes histológicos do fígado de 137 aves foram examinados por histopatologia e por FISH. As amostras foram divididas em grupos retrospectivos (n=57) composto por aves diversas e prospectivos (n=80) formado exclusivamente por *Columba livea*. A sonda foi sintetizada com base em uma sequência de anelamento correspondente a um segmento do gene codificador MOMP (*Major Outer Membrane Protein*) de *Chlamydia* sp., e foi constituída de 20 bases e acrescida do fluorocromo Alexa Fluor 555. Os controles positivos foram oriundos de tecidos hepáticos de aves positivas para *Chlamydia psittaci* pelas técnicas de PCR e imuno-histoquímica. A alteração predominante na microscopia hepática do grupo retrospectivo foi hepatite necrótica linfohistiocitária e heterofílica com 25% (14/57), seguidos de 9% (5/57) para congestão e para colestase, 5% (3/57) para fibrose portal associada a hiperplasia de ductos biliares, seguidas de outras de menor frequência. A ausência de lesões foi observada em 39% (22/57) dos casos. No grupo prospectivo as lesões mais observadas foram as de hepatite necrótica linfohistioplasmocitária e heterofílica correspondentes a 60% (48/80) dos casos, seguido de 14% (11/80) de vacuolização citoplasmática associada

---

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná, Palotina. <https://orcid.org/0000-0001-7741-8999>.

<sup>2</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul. <https://orcid.org/0000-0002-2132-2661>.

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná, Palotina. <https://orcid.org/0000-0001-7106-8983>.

<sup>4</sup> Universidade Federal do Paraná, Palotina. <https://orcid.org/0000-0002-9652-2078>.

<sup>5</sup> Universidade Federal do Paraná, Palotina. <https://orcid.org/0000-0002-7582-7606>.

<sup>6</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. <https://orcid.org/0000-0003-1926-0497>.

<sup>7</sup> Universidade Federal do Paraná, Palotina. <https://orcid.org/0000-0003-1097-2359>.

a congestão, 8% (5/80) para vacuolização citoplasmática associada a congestão e colestase, seguido de outros de menor frequência. A ausência de lesões foi observada em 4% (3/80) dos casos. Das amostras testadas, 67% (92/137) foram positivas pela técnica da FISH. A positividade foi distribuída em oito Ordens e 16 diferentes espécies de aves. Além disso, de todos os casos avaliados, apenas 1% (2/137) apresentaram manifestações clínicas, lesões macroscópicas e/ou lesões microscópicas sugestivas de Clamidiose, sendo essas pertencentes a espécimes de *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro). Na avaliação subjetiva do número de organismos marcados por campo, foi observado que 42% (39/92) das amostras continham até cinco marcações por campo (+), 14% (13/92) continham de seis a dez marcações por campo (++) e 43% (40/92) continham mais que 11 marcações por campo (+++). A técnica de FISH foi específica e eficaz para identificar *Chlamydia* sp. em corte de tecidos hepáticos de aves, representando uma nova técnica a ser usada para o diagnóstico da clamidiose aviária.

#### **Destaques da pesquisa**

- A técnica de FISH pode ser usada para o diagnóstico de *Chlamydia* sp. em aves.
- A maioria das amostras positivas foram oriundas de aves sem manifestações clínicas.
- 36% dos pombos (*Columba livia*) amostrados apresentaram lesões inespecíficas e/ou ausência de lesões indicativas de clamidiose.
- A alteração histológica mais frequente foi hepatite necrótica linfohistioplasmocitária e heterofílica.
- Observou-se a ocorrência de *Chlamydia* sp. nas espécies *Hydropsalis parvula* e *Tigrisoma lineatum*, até então não documentadas nessas espécies

**Palavras-chave:** ornitopatologia, zoonose, clamidiose, saúde única, histopatologia, sonda.

## Introdução

A clamidiose é uma das mais importantes zoonoses de origem aviária (Hulin et al., 2015). A *Chlamydia* é uma bactéria Gram negativa, intracelular obrigatória cujo gênero alberga 13 espécies, sendo a *Chlamydia psittaci* a mais comum em aves (Sachse et al., 2014; Sachse et al., 2015; Guo et al., 2016; Reavill & Dorrestein, 2018; Cheong et al., 2019; Li et al., 2020).

Surtos e infecções por *Chlamydia* sp. são relatadas regularmente em vários locais do mundo, a sua importância ocorre pelos impactos gerados à economia e à saúde pública (Laroucau et al., 2009). No Brasil, há poucos dados epidemiológicos sobre a prevalência da clamidiose, sendo os existentes subestimados, devido à baixa disponibilidade de testes diagnósticos e de programas de controle (Raso et al., 2002; Proença et al., 2011). O diagnóstico clínico da clamidiose é de difícil execução (Proença et al., 2011). O teste ouro é o isolamento bacteriano; porém esse é extremamente fastidioso, pois exige cultivo celular e técnicas de biossegurança elevadas (Proença et al., 2011; Casagrande et al., 2014). Dessa forma, o diagnóstico *ante morte* da infecção pode ser realizado por técnicas como ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência direta e indireta, teste de aglutinação dos corpos elementares, teste de fixação do complemento direto e modificado e Reação em cadeia da Polimerase (PCR) (Proença et al., 2011; Casagrande et al., 2014). De acordo com Proença et al. (2011), a PCR é o único teste disponível comercialmente no Brasil, sendo o mais utilizado. Todavia, a presença de falsos negativos não é rara, devido a eliminação intermitente do agente. Além disso, a presença de infecções subclínicas e inaparentes pode levar a erros de interpretação de diagnóstico na rotina clínica (Leal et al., 2015).



A imuno-histoquímica é a técnica empregada no diagnóstico da clamidiose em tecidos fixados (Ecco et al., 2009; Casagrande et al., 2014), sendo a única que permite correlacionar a presença do agente com o processo lesional (Casagrande et al., 2014). Contudo, a não marcação pode ocorrer, especialmente em amostras armazenadas por longos períodos em formaldeído de baixa qualidade (Webster et al. 2009).

A hibridização fluorescente *in situ* (*Fluorescence in situ Hybridization* – FISH) é um método histoquímico que possibilita, por meio da observação direta de um corte histológico, a visualização, identificação, quantificação, além de localização de microrganismos no tecido (Moter & Göbel, 2000; Bojesen et al., 2003; Neves & Guedes, 2012). Poppert et al. (2002), testaram o uso da FISH em cultivo celular, para detecção de diferentes espécies de clamídias em humanos. Uma técnica semelhante a FISH foi empregada por Theil et al. (1996) para o diagnóstico de *Chlamydia psittaci* em roedores. Contudo, apesar de ser um procedimento recomendado para o diagnóstico de espécies de *Chlamydia* (Frickmann et al., 2017), nenhum trabalho foi encontrado até momento, na medicina veterinária, que empregue esse método para diagnóstico dessa doença nas aves.

Portanto esse trabalho objetiva testar o uso da técnica da FISH na identificação de *Chlamydia* sp. em tecido hepático de aves silvestres nativas e exóticas recebidas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná, Palotina – PR/Brasil.

## **Material e métodos**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná com o protocolo CEUA/Palotina 04/2019

e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO sob o registro de número 70370-1.

**Amostras.** Foram analisados, retrospectivamente, tecido hepático de 57 aves, com e sem suspeita clínica de clamidiose aviária, encaminhadas ao Laboratório de Patologia Animal da UFPR no período de 2013 a 2019. Acrescido a essas amostras, foram examinados tecido hepáticos de 80 pombos (*Columba livia*) de vida livre, oriundos de um estudo com animais sinantrópicos realizadas no município de Toledo/PR, ao longo do ano de 2019 (prospectivo). Ao todo, foram examinados tecido hepático de 137 aves silvestres nativas e exóticas, distribuídas em nove diferentes Ordens, a saber: Accipitriformes, Caprimulgiformes, Cathartiformes, Columbiformes, Passeriformes, Pelecaniforme, Psittaciformes, Piciformes e Strigiformes.

As amostras teciduais do estudo prospectivo foram processadas de maneira usual, assim como o descrito por Tolosa et al. (2003) e Ecco et al. (2009), sendo essas armazenadas em solução tamponada de formaldeído 10%, por sete dias. Após fixação as amostras foram desidratadas e incluídas em parafina. Posteriormente foram clivadas em secções de 5 µm em micrótomo Leica® modelo Rm2245. Os cortes histológicos foram realizados em quadruplicata, um destinado a coloração de HE, dois para colorações especiais (Giemsa – G; Gimenez modificado - PVK) e um para FISH, esse último devidamente acondicionado em lâmina sinalizada.

Dos tecidos dos casos retrospectivos foram confeccionadas três lâminas, duas para as colorações especiais de G e PVK, e uma para a técnica de FISH. No estudo retrospectivo não foram feitas lâminas de HE, as alterações histológicas foram obtidas e compiladas a partir dos laudos histopatológicos emitidos previamente.

**Controle positivo.** Como controle positivo foram usados cortes histológicos oriundos de fragmentos de tecido hepático de *Columba livia* e *Myiopsitta monachus*, positivas

para *Chlamydia psittaci*. O primeiro fragmento teve sua positividade comprovada pela PCR (de acordo com Madico et al. (2000) - CPS 100, 5'CCCAAGGTGAGGCTGATGAC 3'; e CPS 101, 5' CAAACCGTCCTAAGA CAGTTA 3'). A segunda amostra foi positiva pela técnica de imuno-histoquímica, sendo essa gentilmente cedida pelo Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Sonda.** Foi usado uma sonda sintetizada comercialmente (Invitrogen®) com base no trabalho de Hewinson et al. (1997) e Ferreira (2014). A sequência de anelamento foi a região referente a uma porção conservada do gene *ompA* codificador da MOMP (*major outer membrane protein*), comum a família *Chlamydiaceae*: CPF-5'GCA AGA CAC TCC TCA AAG CC-3'. A sequência teve concordância em 100% para bactérias do gênero *Chlamydia*, quando analisada no BLAST. A sonda foi marcada com o fluorocromo Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher®) e com purificação pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (*HPLC*).

**Técnica de FISH.** Os cortes histológicos de 5 µm foram acomodados em lâminas silanizadas e desparafinizados em bateria dupla de xilol por 10 minutos cada, seguida de reidratação, por 5 min, em séries decrescentes de etanol, iniciando pelo etanol absoluto, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70% e água destilada. Posteriormente, as lâminas foram secas em temperatura ambiente para então serem montadas em *coverplates* (Thermo Fisher, cat n°72110017, Waltham, MA, USA) e encaixadas a uma câmara de hibridização (*Coverplate slide rack*, Thermo Fisher, cat n° 73310017, Waltham, MA, USA). Cada lâmina foi incubada com 80µL de tampão de hibridização (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio) e 100µL de solução contendo 2 ng de sonda, a 37°C por 16 horas. Após este período, as lâminas foram lavadas três vezes com 100µL de tampão de hibridização pré-aquecido a 45°C,

lavadas três vezes com 100µL de solução de lavagem pré-aquecida a 45°C (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl) e por último lavadas em água ultrapura durante dois minutos e secas em estufa a 45°C. As lâminas foram montadas utilizando meio de montagem próprio para microscopia de fluorescência a base de glicerol (PorLong Diamond Antifade Mountant, Thermo Fisher®) e imediatamente submetidas a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus, FSX 100, Japão) em filtro adequado para o fluorocromo, em aumento de 40× a 60×.

## Resultados

Ao todo foram avaliadas 137 aves distribuídas em nove Ordens e 22 espécies diferentes (**Tabela 1**). Dessas amostras apenas 1% (2/137) apresentaram manifestações clínicas, lesões macroscópicas e/ou lesões microscópicas sugestivas de Clamidiose, sendo essas pertencentes a espécimes de *Amazona aestiva* (Papagaio-verdadeiro) do grupo retrospectivo. Na avaliação histológica de rotina no grupo retrospectivo as lesões mais observadas foram hepatite necrótica linfohistioplasmocitária e heterofílica correspondentes a 25% (14/57) dos casos (**Figura 1-a**), seguidos de 9% (5/57) para congestão e para colestase, 5% (3/57) para fibrose portal associada a hiperplasia de ductos biliares e para vacuolização citoplasmática, 4% (2/57) para vacuolização citoplasmática associada a congestão e para apenas vacuolização citoplasmática associada a colestase, e por fim 2% (1/57) para vacuolização citoplasmática associada a congestão e colestase. A ausência de lesões foi observada em 39% (22/57) dos casos.

No grupo prospectivo as lesões mais observadas foram as de hepatite necrótica linfohistioplasmocitária e heterofílica correspondentes a 60% (48/80) dos casos, seguido de 14% (11/80) de vacuolização citoplasmática associada a congestão, 8% (5/80) para vacuolização citoplasmática associada a congestão e colestase, 5% (4/80)

para congestão, 4% (3/80) para as lesões de vacuolização citoplasmática, associada ou não a colestase, e por fim 3% (2/80) dos casos apresentaram congestão associada a colestase. A ausência de lesões foi observada em 4% (3/80) dos casos.

Do total de 137 amostras analisadas pela técnica de FISH, 67% (92/137) foram positivas para *Chlamydia* sp., sendo possível identificar no citoplasma de hepatócitos, sinal brilhante, forte e de formato arredondado, com tamanho de 0,3 a 2µm e número variado (**Figura 1-b, 1-c, 1-e**) que desapareciam com a troca do filtro de luz (**Figura 1-d**). A positividade encontrada para cada grupo foi de 63% e 70%, para as amostras do estudo retrospectivo e prospectivo, respectivamente.

As lâminas positivas no FISH foram avaliadas de forma subjetiva quanto ao número de organismos marcados por campo, a saber: (+) até cinco marcações por campo de grande aumento, (++) de seis a dez marcações por campo, e (+++) acima de dez marcações por campo. Das 92 lâminas positivas 42% (39/92) foram classificadas com uma cruz (+), 14% (13/92) com duas cruzes (++) e 43% (40/92) com três cruzes.

Dos 92 casos FISH positivo, 12% (11/92) não apresentaram alterações na histologia hepática, 50% (46/92) apresentaram lesões compatíveis com hepatite necrótica associado a infiltrado inflamatório linfocitoplasmocitário e heterofílico. A segunda alteração histológica mais encontrada foi congestão, presentes em 9% dos casos (8/92), seguida de vacuolização citoplasmática, presente em 7% (7/92) dos casos. Alterações de vacuolização citoplasmática associada a congestão tecidual e apenas colestase foram presentes em 5% (5/92) dos positivos, acrescido a isso, as alterações como vacuolização citoplasmática associada a congestão e colestase representaram 4% (4/92) dos casos positivos. Por fim, as alterações com menor frequência foram vacuolização associada a colestase, presente em 3% (3/92), fibrose

portal e hiperplasia de ductos biliares, representando 2% (2/92) dos casos e congestão e colestase, presentes em 2% (2/92) dos casos.

A correção entre as lesões histológicas e a avaliação quantitativa das lâminas de FISH são descritas na **Tabela 2**.

As Ordens que apresentaram maior índice de positividade nesse trabalho foram a dos Columbiformes e Psittaciformes, que corresponderam a 68% (62/92) e 14% (13/92) do total de positivos, respectivamente. Os Strigiformes e Accipitiformes corresponderam a 5% (5/92) e 4% (4/92) do total de positivos, seguidos pelos Passeriformes, com positividade de 5% (5/92). Por fim, as Ordens dos Pelecaniformes, Cathartiformes e Caprimulgiformes expressaram 1% do total de positivos, com uma única espécie amostrada em cada Ordem.

Dos 45 casos FISH negativos, 31% (14/45) não apresentaram alterações na histologia hepática, 36% (16/45) apresentaram lesões compatíveis com hepatite necrótica associado a infiltrado inflamatório linfohistioplasmocitário e heterofílico. A segunda alteração histológica mais encontrada foi vacuolização citoplasmática associada a congestão, presentes em 18% dos casos (8/45), seguida de vacuolização citoplasmática associada a colestase e congestão, presente em 7% (3/45) dos casos.

## **Discussão**

As alterações anatomopatológicas são bastante variadas nos casos de clamidiose, uma vez que não há alterações patognomônicas nessa doença (Raso, 2009). Casagrande et al. (2014) e Krawiec et al., (2015) relatam animais positivos para o agente sem nenhuma alteração macroscópica ou clínica (Evans, 2011). Nos casos avaliadas nesse trabalho, poucos apresentaram alterações na macroscopia hepática.

As alterações na histologia hepática correlatas aos quadros de clamidiose foram relatadas por Ecco et al. (2009), Casagrande et al. (2014) e Schimidt et al., (2015). De acordo com os autores as lesões hepáticas são caracterizadas por infiltrado inflamatório, difuso entre os sinusóides. O infiltrado é predominantemente linfoplasmocitário e histiocitário, com numerosos macrófagos contendo pigmento marrom-esverdeado – consistente com pigmento biliar e hemossiderina; áreas multifocais a coalescentes de necrose e associado a essas, infiltrado inflamatório composto por heterófilos. Nos tecidos hepáticos avaliados nesse trabalho, as alterações de hepatite necrótica, foram encontradas em 45% (62/137) dos casos, porém 26% (16/62) dessas amostras não demonstraram positividade na técnica de FISH. Isso se explica, pois, quadros de hepatite necrótica com infiltrado linfohistioplasmocitário e heterofílico constituem alterações histológicas comuns a diversas doenças aviárias, como as causadas por *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. (Schimidt et al., 2015) agentes esses não avaliados nesse estudo.

Nos casos mais crônicos da doença, alterações histológicas como fibrose portal e hiperplasia de ducto biliar podem também ocorrer (Casagrande et al., 2014; Schimidt et al., 2015). Nos tecidos avaliados essa alteração foi observada em 2% (3/137) das amostras, dessas 33% (1/3) foi negativa a detecção do agente pela técnica de FISH. Apesar de presente em casos crônicos de clamidiose, a fibrose portal e hiperplasia de ductos não são exclusivas dessa doença, e são relatadas a várias condições de injúrias crônicas ao tecido hepático, como a aflatoxicose (Schimidt et al., 2015).

As alterações inespecíficas observadas na avaliação histológica totalizaram 34% (47/137) das amostras, dessas, o agente foi encontrado em 70% (33/47) dos

casos. Esse achado ressalta a inespecificidade das lesões encontradas nos casos de clamidiose, uma vez que as alterações como congestão, colestase e vacuolização citoplasmáticas podem ser observadas em diversas condições. A ausência de alterações histológicas foi observada em 18% (25/137) dos casos amostrados, dentre esses, 44% (11/25) foram positivos para clamidiose aviária. Dessa forma justifica-se a presença de animais positivos sem alterações hepáticas pela possibilidade de animais infectados sem a presença da doença e ou a presença de leões em outros órgãos, como demonstrado por Proença et al., (2011) e Casagrande et al. (2014), respectivamente.

Apesar de possível, não foi observado o agente etiológico nos cortes histológicos, possivelmente devido a dificuldade de identificação desses em colorações de rotina como a hematoxilina e eosina (HE). O uso de colorações especiais, como Giemsa e Gimenez modificado (PVK), são indicados para a identificação de clamídia no tecido hepático (Ecco et al., 2009; Reavill & Dorrestein, 2018), contudo, essas técnicas se mostraram ineficientes na identificação dos agentes nos fígados das aves amostradas.

A marcação obtida em nosso trabalho foi semelhante a marcação por FISH evidenciada por Marangoni et al. (2006) no tecido hepático de ratos infectados com *C. pneumoniae*. A fluorescência das células bacterianas se destacou de forma clara da gerada pelo tecido (autofluorescência); contudo, a confirmação da marcação foi realizada pela troca do filtro de luz verde para o filtro de luz azul. Dessa forma, as marcações positivas cessavam a emissão de luz, não sendo mais identificáveis no corte histológico. O fenômeno de autofluorescência foi percebido em nosso trabalho; contudo, corrobora o relatado por Moter e Göbel (2000), que correlaciona esse fenômeno a células sanguíneas e tecidos ricos em elastina e colágeno. Nenhuma das



fluorescências observadas nesse trabalho foram de difícil visualização ou de baixa intensidade.

A sonda usada no trabalho foi sintetizada em concordância com Hewinson et al. (1997) e Ferreira (2014). A sequência de escolha para anelamento foi uma região bem conservada do gene codificador da MOMP, comum a *Chlamydia* sp., esse gene codifica a porção proteica correspondente a 60% do peso da membrana externa da bactéria (Vasconcelos et al., 2013; Ferreira, 2014; Harkinezhad et al., 2009; Proença et al., 2011; Vanrompay, 2020). O tamanho da sonda empregada foi de 20 bases, dentro do recomendado por Neves e Guedes (2012) e Frickmann et al. (2017), pois o uso de sondas com 18 a 25 bases, permite identificação de gênero e até mesmo espécie torna-se possível. O emprego de sondas embasadas nas porções conservadas do gene codificador da MOMP, como a usada nesse trabalho, possibilita maior abrangência entre as espécies de clamídias. Todavia, apesar de apresentar menor sensibilidade, o diagnóstico por meio da identificação desse gene demonstra elevada especificidade, por ter menos cópias no organismo quando comparado ao PCR realizados pela detecção de RNA ribossômico, que apresenta elevada sensibilidade, porém com maiores possibilidades às reações cruzadas com outros organismos (Andersen e Franson, 2007; Vilela, 2012).

A variabilidade das lesões histológicas e os distintos escores da avaliação quantitativa demonstrado nas lâminas de FISH podem ser correlato a presença de aves doentes e aves infectadas. Uma vez que, diferente do PCR, a técnica de FISH permite a diferenciarmos animais doentes de animais portadores. A exemplo dos animais amostrados com hepatite necrótica que apresentaram maiores marcações, quando comparado com outras alterações.

De acordo com Neves & Guedes (2012), a identificação de agentes pela PCR possibilita a detecção sensível e rápida, independente se o organismo é cultivável ou não, porém, não é possível associar esse resultado com a distribuição espacial do agente no tecido, tão pouco associá-lo a lesões. No caso da clamidiose, apesar de amplamente usado, a PCR de amostras clínicas pode apresentar falsos negativos, uma vez que a eliminação do agente ocorre de maneira intermitente. Em contrapartida, a FISH, possibilita a visualização direta do agente no corte histológico, pelo microscópio de epifluorescência, como observado nesse trabalho, além de preservar a arquitetura tecidual, morfologia e os compartimentos celulares. Uma das desvantagens da FISH, de acordo com Neves & Guedes (2012), é o alto investimento para aquisição dos equipamentos. Somado a sua aplicabilidade na rotina clínica, para diagnóstico *ante mortem*, requer o emprego de procedimentos mais invasivos, como a biópsia. A técnica poderia ser aplicada às excretas dos animais, porém, pela eliminação intermitente da *Chlamydia* sp., apresentaria a mesma limitação que a PCR. Outro ponto positivo da FISH é a possibilidade de trabalho com amostras fixadas, sem que haja preocupação com o tempo de encaminhamento da amostra ao laboratório, diferente do encontrado na microbiologia convencional.

O exame de imuno-histoquímica foi demonstrado como uma técnica de acurácia elevada para tecidos fixados no diagnóstico *post mortem* da clamidiose aviária (Ecco et al., 2009 e Casagrande et al., 2014). Contudo, outros autores (Neves e Guedes, 2012) expõem que o FISH, de modo geral, apresenta maior especificidade e sensibilidade quando comparado com a imuno-histoquímica. Além disso, Webster et al. (2009) expõem que no caso da imuno-histoquímica, a não marcação pode ocorrer, principalmente em tecidos que foram armazenados por longos períodos em fixadores de baixa qualidade.

De acordo com Kaleta e Taday (2003), o número de espécies aviárias acometidas pela doença tem aumentado, os autores demonstraram o registro do agente em cerca de 469 espécies de aves distribuídas em 30 diferentes Ordens. Das ordens listadas em nosso trabalho, apenas a Ordem Caprimulgiformes não foi mencionada por Kaleta & Taday (2003) e nem em qualquer outro trabalho de conhecimento dos autores. Espécies como *Hydropsalis parvula* (Bacurau-chintã) e a *Tigrisoma lineatum* (Socó-boi), amostrados nesse trabalho, até o presente momento, não tiveram positividade previamente documentada para *Chlamydia* sp..

Os Columbiformes e Psittaciformes apresentam as maiores taxas de infecção e atuam como principais reservatórios de clamídia, de acordo com Chahota et al. (2006), Harkinezhad et al. (2009), Madani & Peighambari (2012), Guo et al. (2016) e Araujo et al. (2019), corroborando os achados nesse estudo. Os columbídeos amostrados pertencem a espécie *Columbia livia*, uma espécie invasora da fauna brasileira que está presente em áreas urbanas e rurais, além de expressar hábitos gregários e habitar ambientes como praças e parques (Cong et al., 2013). Estes hábitos podem favorecer a disseminação da doença entre as aves e atuar como fonte de risco a saúde de outros animais e da população humana, uma vez que essa espécie apresenta contato próximo com o ser humano (Dickx et al., 2010; Geigenfeind e Haag-Wackernagel, 2010). Como pode ser observado em nosso trabalho, as aves positivas amostradas no grupo prospectivo apresentaram cerca de 40% alterações anatomopatológica inespecíficas ou ausentes, corroborando a dificuldade de diagnóstico da doença, e contribuindo para subnotificação e formação de dados epidemiológicos insipientes. Além disso pode-se corroborar a importância dos pombos para a manutenção do agente e fontes de contaminação

As aves amostradas do acervo do LPA, quase que em sua totalidade foram oriundas de apreensões ou de criação ilegal de fauna silvestre e eram criados em ambientes desasseados, em subnutrição e superlotação, o que favorece a instalação de doenças, como a clamidiose (Tolba et al., 2018). Algumas das espécies analisadas, como o papagaio-verdadeiro é comumente mantido como *pet* e estabelece contato próximo com seus proprietários, e atua como importante peça na epidemiologia da doença. Das aves amostradas dessa espécie, 87% (7/8) apresentaram positividade para *Chlamydia* sp na técnica de FISH, além disso apenas 28% (2/7) dos positivos apresentaram manifestações clínicas, alterações macroscópicas e/ou microscópicas indicativas da doença. Os valores de positividade encontrado nesse trabalho para os Passeriformes é próximo do apresentado por Krawiec et al., (2015), com cerca de 1,35% de positivos (5/369). Apesar de baixa positividade, Beckmann et al. (2014) demonstraram em um trabalho retrospectivo a importância da clamidiose aviária como causadora de doenças em passeriformes de vida livre, além de destacar a Ordem como importante na transmissão e manutenção da doença.

O emprego de uma técnica alternativa e eficiente e para o diagnóstico do agente é de suma importância, nesse sentido a FISH foi específica e eficaz em identificar a presença de *Chlamydia* sp. em corte de tecidos hepáticos de aves, representando uma nova técnica a ser usada para o diagnóstico da clamidiose aviária. Por meio do emprego da técnica de FISH foi possível observar a ocorrência de *Chlamydia* sp. em espécies como *Hydropsalis parvula* (Bacurau-chintã) e a *Tigrisoma lineatum* (Socó-boi), até então não documentadas nessas espécies.

## Referências

1. Andersen, Arthur A. & Franson, J. Christian. (2007). Avian Chlamydiosis. In: Thomas, Nancy J.; Hunter, D. Bruce & Atkinson, Carter T. (Eds.). *Infectious diseases of wild birds*, (pp. 303-316). Oxford: Blackwell Publishing.
2. Araujo, Simone Aparecida Almeida; Pereira, Washington Luiz Assunção; Silva, Sandro Patroca da; Cardoso, Jedson Ferreira; Filho, Ednaldo da Silva; Bernal, Marcella Katheryne Marques; Mendes, Fernanda Figueiredo & Nunes, Márcio Roberto Teixeira. (2019). Clinical and molecular diagnosis of *Chlamydomphila* in captive parrots in Pará State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 40, 2603-2612.
3. Beckmann, K. M.; Borel, N.; Pocknell, A. M.; Dagleish, M. P.; Sachse, K.; John, S. K.; Pospischil, A.; Cunningham, A. A. & Lawaon, B. (2014). Chlamydiosis in British Garden Birds (2005–2011): Retrospective Diagnosis and *Chlamydia psittaci* Genotype Determination. *Ecohealth*, 11, 544-563.
4. Bojesen, Anders Miki; Christensen, Henrik; Nielsen, Ole Lerberg; Olsen, John Elmerdahl & Bisgaard, Magne. (2003). Detection of *Gallibacterium* spp. in Chickens by Fluorescent 16S rRNA *in situ* hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5167-5172.
5. Casagrande, Renata A.; Machado, Veronica R.; Souza, Suyene O. de; Watanabe, Tatiane T. N.; Sonne, Luciana; Pavarini, Saulo P. & Driemeier, David. (2014). Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 9, 885-890.
6. Chahota, Rajesh; Ogawa, Hirohito; Mitsuhashi, Yoko; Onhya, Kenji; Yamaguchi, Tsuyoshi & Fukushi, Hideto. (2006). Genetic diversity and

- epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of ompA Gene. *Microbiology and Immunology*, 9, 663-678.
7. Cheong, Heng Choon; Lee, Chalysttha Yie Qin; Cheok, Yi Ying; Tan, Grace Min Yi; Looi, Chung Yeng & Wong, Won Fen. (2019). *Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. Microorganisms*, 7, 146-163.
  8. Cong, W.; Huang, S. Y.; Zhang, X. Y.; Zhou, D. H.; Xu, M. J.; Zhao, Q.; Song, H. Q.; Zhu, X. Q. & Qian, A. D. (2013). Seroprevalence of *Chlamydia psittaci* infection in market-sold adult chickens, ducks and pigeons in north-western China. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 1211-1214.
  9. Dickx, V.; Beeckman, D. S. A.; Dossche, L.; Tavaernier, P. & Vanrompay, D. (2010). *Chlamydophila psittaci* in homing and feral pigeons and zoonotic transmission. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 1348-1353.
  10. Ecco, Roselene; Preis, Ingrid S.; Martins, Nelson Martins, Nelson R. S.; Vilela, Daniel A. R. & Shivaprasad, hulimangala L. (2009). An outbreak of chlamydiosis in captive psittacines. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2, 85-90.
  11. Evans, Erika E. (2011). Zoonotic diseases of common per birds: Psittacine, Passerine, and Columbiform Species. *Veterinary clinics: exotic animal practice*, 14, 457-476.
  12. Ferreira, Lídia Lopes. (2014). Detecção molecular de *Chlamydophila psittaci* em Columbiformes e Galliformes da região centro sul do Estado de Goiás. *Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Goiás, Goiânia.*

13. Frickmann, Hagen; Zautner, Andreas Erich; Moter, Annette; Kikhney, Judith; Hagen, Ralf Matthias; Stender, Henrik & Poppert, Sven. (2017). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43, 263-293.
14. Geigenfeind, I. & Haag-Wackernagel. (2010). Detection of *Chlamydomphila psittaci* from feral pigeons in environmental samples: problems with currently available techniques. *Integrative zoology*, 1, 63-69.
15. Guo, Weina; Li, Jing; Kaltenboeck, Bernhard; Gong, Jiansen; Fan, Weixing & Wang, Chengming. (2016). *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). *Scientific Reports*, 6, 1-10.
16. Harkinezhad, Taher; Geens, Tom & Vanrompay, Daisy. (2009). *Chlamydomphila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary Microbiology*, 135, 68-77.
17. Hewinson, R. Glyn; Griffiths, Peter C.; Bevan, Bob J.; Kirwan, Sharon E. S.; Field, Mavis E.; Woodward, Martin J. & Dawson, Michael. (1997). Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 54, 155-166.
18. Hulin, V.; Bernard, P.; Vorimore, F.; Aaziz, R.; Cléva, D; Robineau, J.; Durand, B.; Angelis, L.; Siarkou, V. I. & Laroucau, K. (2015). Assessment of *Chlamydia psittaci* Shedding and Environmental Contamination as Potential Sources of Worker Exposure throughout the Mule Duck Breeding Process. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 1504-1518.

19. Kaleta, E. F.; Taday, Eva M. A. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, 32, 435-462.
20. Krawiec, Marta; Piasecki, Tomasz & Wieliczko, Alina. (2015). Prevalence of *Chlamydia psittaci* and Other *Chlamydia* Species in Wild Birds in Poland. *Vector-borne And Zoonotic Diseases*, 15, 652-655.
21. Laroucau, Karine; Vorimore, Fabien; Aaziz, Rachid; Berndt, Angela; Schubert, Evelyn & Sachse, Konrad. (2009). Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 1240-1247.
22. Leal, D. C.; Negrão, V. B.; Santos, F.; Raso, T. F.; Barrouin-Melo, S. M. & Franke, C. R. (2015). Ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em pombos (*Columba livia*) na cidade de Salvador, Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67, 771-776.
23. Li, Zhaocai; Liu, Ping; Hou, Jia; Xu, Guanglan; Zhang, Junfeng; Lei, Yinghu; Lou, Zhongzi; Liang, Lin; Wen, Yuan & Zhou, Jizhang. (2020). Detection of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia ibidis* in the Endangered Crested Ibis (*Nipponia nippon*). *Epidemiology and Infection*, 148, 1-5.
24. Madani, S. A. & Peighambari, S. M. (2012). PCR-based diagnosis, molecular characterization and detection of atypical strains of avian *Chlamydia psittaci* in companion and wild birds. *Avian Pathology*, 42, 38-44.
25. Madico, Guillermo; Quinn, Thomas C.; Boman, Jenes; Gaydos, Charlotte A. (2000). Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and



- 16S-23S spacer rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1085 – 1093.
26. Marangoni, Antonella; Donati, Manuela; Cavrini, Francesca; Aldini, Rita; Accardo, Silvia; Sambri, Vittorio; Montagnani, Marco & Cevenini, Roberto. (2006). *Chlamydia pneumoniae* replicates in Kupffer cells in mouse model of liver infection. *World Journal of gastroenterology*, 12, 6453-6457.
27. Moter, A. & Göbel, U.B. (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41, 85-112.
28. Neves, S. M. N. & Guedes, Roberto M. C. (2012). Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79, 627-632.
29. Poppert, Sven; Essing, Andreas; Marre, Reinhard; Wagner, Michael & Horn, Matthias. (2002). Detection and Differentiation of *Chlamydiae* by Fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4081-4089.
30. Proença, Laila Maftoum; Fagliari, José Jurandir; Raso, Tânia de Freitas. (2011). Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Ciência Rural*, 4, 841-847.
31. Raso, Tânia de Freitas; Berchieri Júnior, Ângelo & Pinto, Aramis Augusto. (2002). Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive amazon parrots in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33, 118-121.
32. Reavill, Drury R. & Dorrestein, Gerry. (2018). Psittacines, Coliiformes, Musophagiformes, Cuculiformes. In: Terio, Karen A.; Mcaloose, Denise &

- Leger, Judy St. (2018). Pathology of Wildlife and Zoo Animals. Academic Pr/Elsevier.
33. Sachse, Konrad; Bavoil, Patrik M.; Kaltenboeck, Bernhard; Stephens, Richard S.; Kuo, Cho-Chou; Rosselló-Móra, Ramon & Horn, Matthias. (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae*: Proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 99-103.
34. Sachse, Konrad; Laroucau, Karine; Riege, Konstantin; Wehner, Stefanie; Dilcher, Meik; Creasy, Heather Huot; Weidmann, Manfred; Myers, Garry; Vorimore, Fabien; Vicari, Nadia; Magnino, Simone; Liebler-Tenorio, Elisabeth; Ruetzger, Anke; Bavoil, Patrik M.; Hufert, Frank T.; Rosselló-Móra, Ramon & Marz, Manja. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 37, 79-88.
35. Schimidt, Robert E.; Reavill, Drury R. & Phalen, David N. (2015). Liver. In: Schimidt, Robert E.; Reavill, Drury R. & Phalen, David N. (2015). *Pathology of pet and aviary birds*. 2. ed. (pp.95-125). Australia: Wiley Blackwell.
36. Theil, D., Hoop, R., Herring, A.J. & Pospischil, A. (1996). Detection of *Chlamydia* in formalin-fixed and paraffin-embedded avian tissue by *In Situ* Hybridization. A comparison between *in situ* hybridization and peroxidase-antiperoxidase labelling. *Journal of Veterinary Medicine*, 43, 365- 370.
37. Tolba, Hala M. N.; Abou Elez, Rasha M. M. & Elsohaby, Ibrahim. (2018). Risk factors associated with *Chlamydia psittaci* infections in psittacine birds and bird handlers. *Journal of applied microbiology*, 126, 402-410.

38. Tolosa, E.M.C.; Rodrigues, C.J.; Behmer, O.A. & Freitas, Neto A.G. (2003). *Manual de Técnicas Para Histologia Normal e Patológica*. Barueri: Manole.
39. Vanrompay, Daisy. (2020). Avian Chlamydiosi. In: Swayne, David E.. *Diseases of Poultry*. 14. ed. (p. 1086-1107).: Wiley-blackwell.
40. Vasconcelos, Tassia Cristina Bello de; Nogueira, Denise Monnerat; Pereira, Virginia Léo de Almeida; Nascimento, Elmiro Rosendo do & Bruno, Sávio Freire. (2013). *Chlamydophila psittaci* em aves silvestres e exóticas: uma revisão com ênfase em saúde pública. *Enciclopédia Biofera*, 9, 2462-2477.
41. Vilela, Daniel Ambrózio da Rocha. (2012). Diagnóstico de situação dos animais silvestres recebidos nos CETAS brasileiros e *Chlamydophila psittaci* em papagaios (*Amazona aestiva*) no CETAS de Belo Horizonte, MG. *Tese (Doutorado)* - Curso de Medicina Veterinária, Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.
42. Webster, Joshua D.; Miller, Margaret A.; DuSold, Dee & Ramos-Vara, José. (2009). Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry*, 57, 753-761.

Tabela 1. Espécies e Ordens das aves positivas para *Chlamydia* sp. na técnica de FISH.

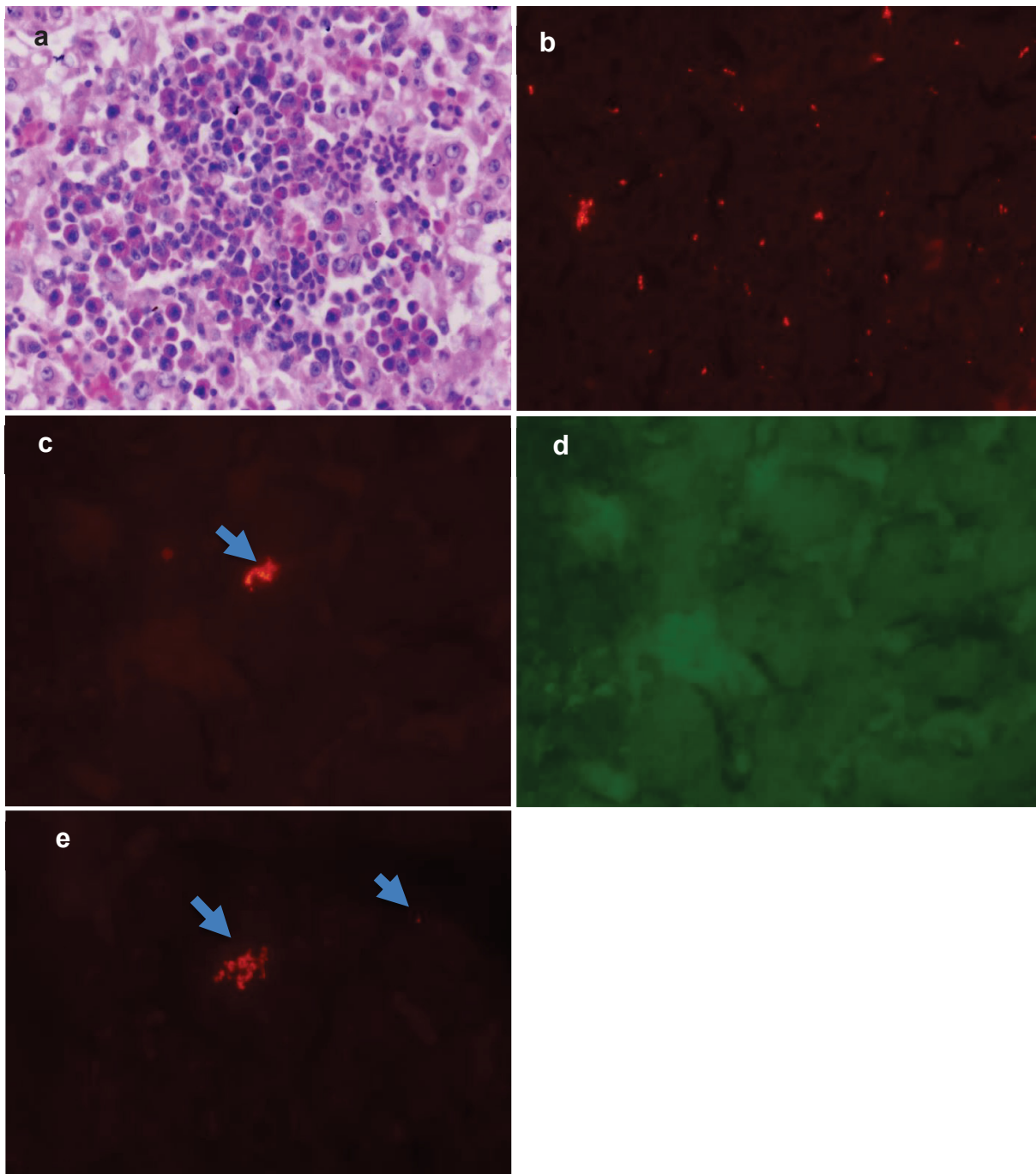
Origem	Ordem	Espécie	Total amostrado	Total de positivos		
Estudo retrospectivo (n=57)	Accipitriforme (n=5)	<i>Gampsonyx swainsonii</i>	2	2		
		<i>Rupornis magnirostris</i>	3	2		
	Caprimulgiforme (n = 1)	<i>Hydropsalis parvula</i>	1	1		
	Cathartiforme (n=1)	<i>Coragyps atratus</i>	1	1		
	Columbiforme (n=7)	<i>Columba livia</i>		7	6	
			<i>Sporophila angolensis</i>	1	1	
			<i>Coryphospingus cucullatus</i>	1	1	
			<i>Cyanoloxia brissoni</i>	4	2	
			Passeriforme (n=14)	<i>Turdus rufiventris</i>	1	1
			<i>Saltator similis</i>	4	0	
			<i>Pitangus sulphuratus</i>	1	0	
	<i>Sporophila lineola</i>	1	0			
	<i>Euphoria chlorotica</i>	1	0			
	Pelecaniforme (n=1)	<i>Tigrisoma lineatum</i>	1	1		
	Psittaciforme (n=19)	<i>Psittacara leucophthalmus</i>		2	2	
			<i>Ara ararauna</i>	1	0	
			<i>Amazona aestiva</i>	8	7	
			<i>Nymphicus hollandicus</i>	8	4	
	Piciforme (n=1)	<i>Colaptes campestris</i>	1	0		
Strigiforme (n=8)	<i>Athene cunicularia</i>		2	2		
		<i>Megascops choliba</i>	4	2		
		<i>Tyto furcata</i>	2	1		
Estudo prospectivo (n=80)	Columbiforme (n=80)	<i>Columba livia</i>	80	56		

Tabela 2. Correlação dos achados histológicos com a avaliação subjetiva quantitativa de marcação positiva pela técnica de FISH, nos grupos prospectivos e retrospectivos.

Alterações	Avaliação quantitativa do agente em lâmina de FISH		
	(+)	(++)	(+++)
Hepatite necrótica linfocitoplasmocitária e heterofílica (n= 46)	48% (22/46)	13% (6/46)	39% (18/46)
Congestão (n=8)	38% (3/8)	13% (1/8)	50% (4/8)
Vacuolização citoplasmática (n=6)	33% (2/6)	33% (2/6)	33% (2/6)
Vacuolização citoplasmática, congestão e colestase (n=4)	25% (1/4)	25% (1/4)	50% (2/4)
Colestase (n=5)	40% (2/5)	0%	60% (3/5)
Vacuolização citoplasmática e congestão (n=5)	60% (3/5)	20% (1/5)	20% (1/5)
Vacuolização citoplasmática e colestase (n=3)	33% (1/3)	0%	67% (2/3)
Fibrose portal associada a hiperplasia de ductos biliares (n=2)	50% (1/2)	0%	50% (1/2)
Congestão e colestase (n=2)	0%	100% (2/2)	0%
Sem alterações histológicas (n=11)	27% (3/11)	9% (1/11)	64% (7/11)
n=92			

(+) até cinco marcações por campo, (++) de seis a dez marcações por campo, e (+++) acima de dez marcações por campo.

**Figura 1.** Fotomicrografia com alteração histológica, marcação positiva pela técnica de FISH para *Chlamydia* sp. e contraprova em tecido hepático de ave. (a) Hepatite necrótica com infiltrado histiocitário e linfoplasmocitário em tecido hepático de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*); (b) Marcação positiva em fígado de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), sob luz verde (460 – 495nm); (c) Marcação positiva em fígado de pomba-doméstica (*Columba livia*), sob luz verde (460 – 495nm); (d) Contraprova da marcação do corte histológico apresentado em “c”, sob luz azul (460 - 495 nm); (e) Marcação positiva em tecido hepático de Gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*). Nota-se imunofluorescência positiva no citoplasma do hepatócito (setas), sob luz verde (460 – 495nm).



## REFERÊNCIAS

ARAUJO, S. A. A.; PEREIRA, W. L. A.; SILVA, S. P.; CARDOSO, J. F.; FILHO, E. S.; BERNAL, M. K. M.; MENDES, F. F.; NUNES, M. R. T. Clinical and molecular diagnosis of *Chlamydophila* in captive parrots in Pará State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 40, n. 6, p.2603-2612, 29 ago. 2019.

BANHART, S.; SCHÄFER, E. K.; GENSCH, J. M.; HEUER, D. Sphingolipid Metabolism and Transport in *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* Infections. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p.2-8, 4 out. 2019.

BAYRAMOVA, F.; JACQUIER, N.; GREUB, G. Insight in the biology of Chlamydia-related bacteria. **Microbes and Infection**, 20, 432-440, 2018.

BOJESEN, A. M.; CHRISTENSEN, H.; NIELSEN, O. L.; OLSEN, J. E.; BISGAARD, M. Detection of *Gallibacterium* spp. in Chickens by Fluorescent 16S rRNA *in situ* hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p.5167-5172, 2003.

BOMMANA, S.; POLKINGHORNE, A. Mini Review: Antimicrobial Control of Chlamydial Infections in Animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p.1-9, 4 fev. 2019.

BRAZ, M. A.; SILVA, D. C.; SANTIAGO, M. E. B.; GARCIA, S. D., NAKAMURA, A. A.; MEIRELES, M. V. Detecção e classificação molecular de *Chlamydophila psittaci* em amostras fecais de aves assintomáticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 1, p.161-167, 2014.

BURT, S. A.; RÖRING, R. E.; HEIJNE, M. *Chlamydia psittaci* and *C. avium* in feral pigeon (*Columba livia domestica*) droppings in two cities in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 38, n. 1, p.63-66, jan. 2018.

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

CHAHOTA, Rajesh; OGAWA, H.; MITSUHASHI, Y.; OHYA, K.; YAMAGUCHI, T.; FUKUSHI, H. Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of ompA Gene. **Microbiology and Immunology**, 9, 663-678, 2006.

CHAN, J.; DOYLE, B.; BRANLEY, J.; SHEPPEARD, V.; GABOR, M.; VINEY, K.; QUINN, H.; JANOVER, O.; MCCREADY, M.; HELLER, J. An outbreak of psittacosis at a veterinary school demonstrating a novel source of infection. **One Health**, v. 3, p.29-33, jun. 2017.

CHEONG, H. C.; LEE, C. Y. Q.; CHEOK, Y. Y.; TAN, G. M. Y.; LOOI, C. Y.; WONG, W. F. Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p.146-163, 24 maio 2019.

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

FERREIRA, V. L. **Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo**. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

FERREIRA, L. L. **Detecção molecular de *Chlamydophila psittaci* em Columbiformes e Galliformes da região centro sul do Estado de Goiás**. 2014. 45f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Goiás, Goiânia.

FRICKMANN, H.; ZAUTNER, A. E.; MOTER, A.; KIKHNEY, J.; HAGEN, R. M.; STENDER, H.; POPPERT, S. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p.263-293, 27 jan. 2017.

GOOKIN, J. L.; STONE, M. R.; YAEGER, M. J.; MEYERHOLZ, D. K.; MOISAN, P. Fluorescence *in situ* hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1-2, p. 139 -143, ago., 2010.

GUO, W.; LI, J.; KALTENBOECK, B.; GONG, J.; FAN, W.; WANG, C. *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-10, 18 jan. 2016.

HARCOURT-BROWN, N. H. Aves Psitaciformes. In: TULLY JUNIOR, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. **Clínica de Aves**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. Cap. 7. p. 122-149.



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

HULIN, V.; BERNARD, P.; VORIMORE, F.; AAZIZ, R.; CLÉVA, D.; ROBINEAU, J.; DURAND, B.; ANGELIS, L.; SIARKOU, V. I.; LAROUCAU, K. Assessment of *Chlamydia psittaci* Shedding and Environmental Contamination as Potential Sources of Worker Exposure throughout the Mule Duck Breeding Process. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 82, n. 5, p.1504-1518, 28 dez. 2015.

ISHAK, M. de O. G.; ISHAK, R. O impacto da Infecção por *Chlamydia* em populações indígenas da Amazônia brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p.385-396, 2001.

JENSEN, T. K.; MOLLER, K.; BOYE, M.; LESER, T. D.; JORSAL, S. E. Scanning Electron Microscopy and Fluorescent *in Situ* Hybridization of Experimental *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* infection in growing pigs. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p.22-32, 2000.

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

KNITTLER, M. R.; BERNDT, A.; BOCKER, S.; DUTOW, P.; HANEL, F.; HEUER, D.; KAGEBEIN, D.; KLOS, A.; KOCH, S.; LIEBLER-TENORIO, E.; OSTERMANN, C.; REINHOLD, P.; SALUZ, H. P.; SCHOFL, G.; SEHNERT, P.; SACHSE, K. *Chlamydia psittaci*: New insights into genomic diversity, clinical pathology, host–pathogen interaction and anti-bacterial immunity. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p.877-893, out. 2014.

KRAWIEC, M.; PIASECKI, T.; WIELICZKO, A. Prevalence of *Chlamydia psittaci* and Other *Chlamydia* Species in Wild Birds in Poland. **Vector-borne And Zoonotic Diseases**, 15, 652-655, 2015.

LAROUCAU, K.; VORIMORE, F.; AAZIZ, R.; BERNDT, A.; SCHUBERT, E.; SACHSE, K. Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p.1240-1247, dez. 2009.

LEAL, D.C.; NEGRÃO, V. B.; SANTOS, F.; RASO, T. F.; BARROUIN-MELO, S. M.; FRANKE, C. R. Ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em pombos (*Columba livia*) na

cidade de Salvador, Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p.771-776, jun. 2015.

LI, Z.; LUI, P.; HOU, J.; XU, G.; ZHANG, J.; LEI, Y.; LOU, Z.; LIANG, L.; WEN, Y.; ZHOU, J. Detection of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia ibidis* in the Endangered Crested Ibis (*Nipponia nippon*). **Epidemiology and Infection**, v. 148, p.1-5, 2020.

MADANI, A. S.; PEIGHAMBARI, S. M.; BARIN, A. Isolation of *Chlamydophila psittaci* from pet birds in Iran. **International Journal of Veterinary Research**, v. 2, n. 5, p.95-98, jan. 2011.

MADANI, S. A.; PEIGHAMBARI, S. M. PCR-based diagnosis, molecular characterization and detection of atypical strains of avian *Chlamydia psittaci* in companion and wild birds. **Avian Pathology**, v. 42, n. 1, p.38-44, 14 dez. 2012.

MARANGONI, A.; DONATI, M.; CAVRINI, F.; ALDINI, R.; ACCARDO, S.; SAMBRI, V.; MONTAGNANI, M.; CEVENINI, R. *Chlamydia pneumoniae* replicates in Kupffer cells in mouse model of liver infection. **World Journal of gastroenterology**, 12, 6453-6457, 2006.

MBUTHIA, P. G.; CHRISTENSEN, H.; BOYE, M.; PETERSEN, K. M. D.; BISGAARD, M.; NYAGA, P. N.; OLSEN, J. E. Specific Detection of *Pasteurella multocida* in Chickens with Fowl Cholera and in Pig Lung Tissues Using Fluorescent rRNA *In Situ* Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2627 – 2633, 2001.

MOSCHIONI, C.; FARIA, H. P.; REIS, M. A. S.; SILVA, E. U. Pneumonia grave por "*Chlamydia psittaci*". **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 27, n. 4, p.219-222, 2001.

MOTER, A.; GÖBEL, U.B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **J. Microbiol. Methods.**, v. 41, p. 85-112, 2000.

MOTER, A.; LEIST, G.; RUDOLPH, R.; SCHRANK, K.; CHOI, B.; WAGNER, M.; GÖBEL, U. B. Fluorescence *in situ* hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. **Microbiology**, n. 114, p.2459-2467, 1998.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p.627-632, 2012.

OLSEN, K. N.; HENRIKSEN, M.; BISGAARD, M.; NIELSEN, O. L.; CHISTENSE, H. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence *in situ* hybridization. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 3, p.423-437, 21 jun. 2008.

OOTSUBO, M.; SHIMIZU, T.; TANAKA, R.; SAWABE, T.; TAJIMA, K.; YOSHIMIZU, M.; EZURA, Y.; EZAKI, T.; OYAIZU, H. Oligonucleotide probe for detecting Enterobacteriaceae by *in situ* hybridization. **Journal of Applied Microbiology**, n. 93, p.60-68, 2002.

POPPERT, S.; ESSIG, A.; MARRE, R.; WAGNER, M.; HORN, M. Detection and Differentiation of *Chlamydiae* by Fluorescence *in situ* hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.4081-4089, 2002.

PROENÇA, L. M.; FAGLIARI, J. J.; RASO, T. F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 4, n. 5, p.841-847, 2011.

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

RASO, T. F.. Clamidiose. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doença das Aves**. 2. ed. Campinas: Fundação Apinco de Ciências e Tecnologias Avícolas, 2009. Cap. 47. p. 553-563.

RASO, T. F.; JÚNIOR, A. B.; PINTO, A. A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive amazon parrots in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 2, p.118-121, jun. 2002.

REAVILL, D. R.; DORRESTEIN, G. Psittacines, Coliiformes, Musophagiformes, Cuculiformes. In: TERIO, K. A.; MCALOOSE, D.; LEGER, J. St. **Pathology of Wildlife and Zoo Animals**. Academic Pr/elsevier, 2018. Cap. 32. p. 775-798.

RODRÍGUEZ-LEO, C.; HERNÁNDEZ, V.; ORM, S. A.; DÍAZ, Y.; CAMACHO, D.; ARRAIZ, N.; USECHE, E. *Chlamydia psittaci* en aves Psitácidas en dos parques zoológicos de Venezuela. **Acta biológica Colombiana**, v. 22, n. 3, p.394-397, 2017.

SCHNEE, C.; VANROMPAY, D.; LAROUCAU, K. **OIE Terrestrial Manual - Code: Avian chlamydiosis**. 2018. Disponível em: <<https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>.

SACHSE, K.; LAROUCAU, K.; VORIMORE, F.; MAGNINO, S.; FEIGE, J.; MÜLLER, W.; KUBE, S.; HOTZEL, H.; SCHULBERT, E.; SLICKERS, P.; EHRLICH, R. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydophila psittaci* strains from culture and clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 1-2, p.22-30, mar. 2009.

SACHSE, K.; BAVOIL, P. M.; KALTENBOECK, B.; STEPHENS, R. S.; KUO, C.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; HORN, M. Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p.99-103, mar. 2015.

SACHSE, K.; LAROUCAU, K.; RIEGE, K.; WEHNER, S.; DILCHER, M.; CREASY, H. H.; WEIDMANN, M.; MYERS, G.; VORIMORE, F.; VICARI, N.; MAGNINO, S.; LIEBLER-TENORIO, E.; RUETTGER, A.; BAVOIL, P. M.; HUFERT, F. T.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; MARZ, M. Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p.79-88, mar. 2014.

SACHSE, K.; KUEHLEWIND, S.; RUETTGER, A.; SCHUBERT, E.; ROHDE, G. More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 3-4, p.476-480, jun. 2012.

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. Liver. In: SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of pet and aviary birds**. 2. ed., Wiley Blackwell, 2015 (a). Cap. 4. p. 95-125.

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. Respiratory System. In: SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of pet and aviary birds**. 2. ed., Wiley Blackwell, 2015 (b). Cap. 2. p. 21-53.

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. Cardiovascular System. In: SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of pet and aviary birds**. 2. ed., Wiley Blackwell, 2015 (c). Cap. 1. p. 1-20.

SILVA, S. S. **Avaliação clínica, laboratorial e detecção de *Chlamydophila psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) do Distrito Federal, Brasil**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

THEIL, D.; HOOP, R.; HERRING, A. J.; POSPISCHIL, A. Detection of chlamydia in formalin-fixed and paraffin-embedded avian tissue by *In Situ* Hybridization. A comparison between *in situ* hybridization and peroxidase-antiperoxidase labelling. **Journal of Veterinary Medicine**, B43, 365- 370., 1996.

TULLY, T. N. *Chlamydophila psittaci*: a short comment. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. L. **Clinical Avian Medicine**. Florida: Spix, 2006. Cap. 27. p. 679-680.

VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosi. In: SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 14. ed., Wiley-blackwell, 2020. Cap. 24. p. 1086-1107.

VASCONCELOS, T. C. B.; NOGUEIRA, D. M.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, E. R.; BRUNO, S. F. *Chlamydophila psittaci* em aves silvestres e exóticas: uma revisão com ênfase em saúde pública. **Enciclopédia Biofera**, Goiânia, v. 9, n. 16, p.2462-2477, jul. 2013.

WEBSTER, J. D.; MILLER, M. A.; DUSOLD, D.; RAMOS-VARA, J. Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 57, 753-761, 2009.

WEST, A. A Brief Review of *Chlamydophila psittaci* in Birds and Humans. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 20, n. 1, p.18-20, jan. 2011.

## APÊNDICE A – PROTOCOLO FISH

Passo 1: Após o corte histológico, levar as lâminas para retirada de parafina em estufa com temperatura de 65°C;

Passo 2: Lavar as *coverplates* em água destilada e secá-las em estufa de secagem com temperatura de 45°C;

Passo 3: Desparafinizar e reidratar os cortes, mergulhando as lâminas no xilol I por 10 minutos, xilol II por 10 minutos, etanol absoluto por 5 minutos, etanol 90% por 5 minutos, etanol 80% por 5 minutos, etanol 70% por 5 minutos e por fim em água destilada por 5 minutos;

Passo 4: Secar as lâminas e montá-las nas *coverplates*, instilar 80 microlitros de tampão de hibridização na superfície do *coverplate*, encaixar a lâmina com o tecido em contato com o *coverplate* e encaixar o conjunto na *rack*;

Passo 5: Diluir, em ausência de luz<sup>1</sup>, 3,3 microlitros da sonda com 10ng em 496,7 microlitros de água ultrapura, obtendo a concentração de 2ng por 100 microlitros;

Passo 6: Pipetar 100 microlitros da sonda diluída na superfície superior do 'complexo *coverplate* e lâmina';

Passo 7: Tampar o suporte e incubar *overnight* (mínimo de 16 horas) à 37°C;

Passo 8: Fazer 3 lavagens sucessivas com 100 microlitros de solução tampão de hibridização pré-aquecido a 45°C na superfície superior do 'complexo *coverplate* e lâmina'. Repetir o processo de lavagem, por 3 vezes, com 100 microlitros de solução tampão de lavagem pré-aquecido a 45°C, e por fim realizar uma lavagem com água destilada, instilando-a no 'complexo *coverplate* e lâmina'. O complexo só poderá ser desmontado após dois minutos do acréscimo da água;

Passo 9: secar as lâminas em estufa a 45°C até desaparecer toda a água, por tempo aproximadamente de 10 min;

Passo 10: Montar as lâminas. Após a limpeza das lamínulas essas devem ser acrescidas as lâminas, porém, antes dessa etapa deve-se instilar uma gota de meio de montagem próprio para microscopia de fluorescência;

---

<sup>1</sup> A sonda é sensível a luz, logo, dessa fase em diante deve-se trabalhar com luminosidade reduzida ou com ausência de fontes luminosas.

Passo 11: Fazer a leitura em microscópio de fluorescência, no aumento de 40x. Quando não se consegue fazer o foco verificar se a lâmina não está suja com o próprio meio de montagem.

## APÊNDICE B – TAMPÃO DE HIBRIDIZAÇÃO

### Reagentes:

SDS 10%	5 mL
NaCl [5M]	90 mL
Tris [1M] pH 7,2	50 mL
Água destilada	500 mL
HCl [1M]	O suficiente para a reação

### Modo de preparo:

Passo 1: Pesar os reagentes separadamente e diluir nas devidas concentrações: Tris (1M) 6,057 gramas para 50 mL de água destilada; NaCl (5M) 26,298 gramas para 90 mL de água destilada;

Passo 2: Ajustar o pH da solução de Tris para 7,2 utilizando solução a 1M de HCl;

Passo 3: Colocar a solução de Tris em proveta de 500 mL;

Passo 4: Adicionar a solução de NaCl na proveta de 500 mL;

Passo 5: Adicionar 5 ml do SDS 10% (cuidadosamente para evitar excesso de bolhas);

Passo 6: Completar com água destilada até 500 mL (cuidadosamente para evitar excesso de bolhas).

O tampão de hibridização tem validade de 2 meses.



## APÊNDICE C – SOLUÇÃO DE LAVAGEM

### Reagentes:

NaCl [5M]	90 mL
Tris [1M] pH 7,2	50 mL
Água destilada	500 mL
HCl [1M]	O suficiente para a reação

### Modo de preparo:

Passo 1: Pesar os reagentes separadamente e diluir nas devidas concentrações: Tris (1M) 6,057 gramas para 50 mL de água destilada; NaCl (5M) 26,298 gramas para 90 mL de água destilada;

Passo 2: Ajustar o pH da solução de Tris para 7,2 utilizando solução a 1M de HCl;

Passo 3: Colocar a solução de Tris em proveta de 500 mL;

Passo 4: Adicionar a solução de NaCl na proveta de 500 mL;

Passo 5: Completar com água destilada até 500 mL.

O tampão de lavagem tem validade de 4 meses.

## ANEXO A – INSTRUÇÃO AOS AUTORES

### DIRETRIZES GERAIS:

- Os manuscritos são aceitos em inglês. A ortografia e pontuação do Oxford English Dictionary são preferidas. Use aspas simples, exceto quando 'uma citação estiver "dentro de" uma citação'. Citações longas de palavras ou mais devem ser recuadas com aspas.
- Os manuscritos devem ser compilados na seguinte ordem: página de rosto; resumo; palavras-chave; Texto principal; agradecimentos; referências; apêndices (conforme apropriado); tabela (s) com legenda (s) em páginas individuais; legenda (s) da figura (como uma lista).
- Resumos com no máximo 250 palavras são necessárias para todos os manuscritos submetidos. Os autores podem enviar um breve resumo dos destaques da pesquisa e um resumo gráfico junto com o artigo.
- Cada manuscrito deve conter de 6 a 8 palavras-chave.
- Os títulos das seções devem ser concisos.
- Todos os autores de um manuscrito devem incluir seus nomes completos e afiliações na página de rosto do manuscrito. Um autor deve ser identificado como o autor correspondente. Indique a afiliação onde a pesquisa foi conduzida. Se algum dos co-autores nomeados mover afiliação durante o processo de revisão por pares, a nova afiliação poderá ser fornecida como uma nota de rodapé. Observe que nenhuma alteração na afiliação pode ser feita depois que o manuscrito for aceito. Observe que o endereço de e-mail do autor correspondente normalmente será exibido no PDF do artigo e no artigo online.

### SUBMISSÃO DE MANUSCRITOS:

- A submissão de um manuscrito à *Avian Pathology* implica que (a) ele não foi publicado anteriormente, (b) que não está sendo submetido para publicação em outro lugar, (c) que todos os autores viram e aprovaram o manuscrito, (d) que todos os autores obtiveram permissão de seu empregador ou instituição para publicar, se tiverem uma obrigação contratual ou moral de fazê-lo, e (e) que permissões relevantes, incluindo aprovação ética, foram obtidas para trabalhos que envolvam o uso de animais e manipulação genética. Manuscritos descrevendo experimentos que demonstrem falta de preocupação com os atuais padrões éticos e de bem-estar não serão aceitos. A decisão dos editores a esse respeito é final.

### PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS:

Todos os manuscritos devem ser digitados em espaço duplo, com margens de pelo menos 25 mm. A numeração contínua de linhas deve ser usada em todo o manuscrito. As instruções fornecidas abaixo devem ser seguidas com cuidado. Os autores são incentivados a examinar uma edição recente da revista para ver o estilo do layout. Uma cópia de amostra grátis online da revista está disponível no site da *Avian Pathology*.

**Página de rosto:** contendo (a) o título do manuscrito, (b) nomes dos autores (nomes completos ou iniciais, de acordo com as preferências dos autores), (c) instituições e endereços postais; e (d) endereço de e-mail do autor correspondente. Números sobrescritos devem ser usados para vincular o autor à instituição e um asterisco (\*) para se referir ao autor correspondente.

**Resumo**, com no máximo 250 palavras, em uma página separada imediatamente após a página de título.

**Destaques da pesquisa**, estes devem ser uma lista concisa de não mais do que quatro breves tópicos, resumindo as principais conclusões de seu trabalho. Cada destaque deve ter no máximo 85 caracteres (incluindo espaços). Os destaques da pesquisa devem ser incluídos no documento principal, abaixo do resumo.

**Resumos gráficos (opcional)**, os autores são encorajados a enviar um Resumo Gráfico (AG) junto com seu artigo. Isso será exibido abaixo do resumo do texto, apenas na versão xml online do artigo publicado. Também será exibido no índice on-line abaixo do título do artigo. O AG deve chamar a atenção e dar ao leitor uma impressão visual imediata da essência do artigo, mas sem fornecer nenhum resultado específico. Seria útil pensar no AG como um único slide do Powerpoint para explicar o objetivo do artigo. O AG pode ser um gráfico, um desenho, um diagrama, uma estrutura, um esquema ou uma fotografia. Ou pode ser composto por uma série de imagens menores de qualquer um desses tipos. Pode haver etiquetas de texto, mas mantenha o texto no mínimo. O AG deve ser uma obra de arte totalmente original e inédita, criada por um dos autores que ainda não consta do conteúdo do manuscrito. O GA deve ser o mais simples possível e pode ser colorido. Para aproveitar a largura do quadro no site da revista, os GAs devem ter o máximo de 525 pixels de largura possível. Se eles forem muito grandes ou muito pequenos, eles serão redimensionados automaticamente e isso estragará a aparência do AG. Não há restrições quanto à altura, mas ela deve ser proporcional à largura para que o GA tenha uma boa aparência. Consulte nossas informações sobre formatos e resoluções de arte adequados. Os resumos gráficos podem ser enviados pelo site ScholarOne da Revista, onde você pode encontrar guias do usuário e um serviço de assistência.

**Introdução**, com declarações totalmente suportadas por referências. Embora a Introdução deva ser concisa, deve ser útil não apenas para aqueles que estão familiarizados com o tópico do manuscrito, mas também para não especialistas. Não deve haver declaração dos resultados no final da Introdução.

**Materiais e métodos**, com subtítulos, em negrito, na mesma linha que o texto do processo. Esta seção deve incluir números de acesso, em uma subposição separada no final da seção, para dados de sequência que devem ser submetidos a bancos de dados internacionais.

**Resultados**, com subtítulos, em negrito, na mesma linha do texto do processo.

**Discussão**, totalmente referenciada, sem repetição desnecessária dos resultados. *As seções Resultados e Discussão podem ser combinadas.*

Uma seção de **agradecimento**, se necessário.

Uma declaração de divulgação obrigatória

**Referências**. Não há limite para o número de referências. Eles devem ser listados em ordem alfabética no estilo da American Psychological Association (estilo APA), exceto que os números das edições não devem ser incluídos. Os títulos dos periódicos (na íntegra) estão em itálico. Todos os autores devem ser listados. As referências no texto devem aparecer como "Wan *et al.* (2004)" ou "(Witter, 1997; Brown *et al.*, 1999a.b; Yao & Vakharia, 2001; Wan *et al.* (2004))", ou seja, em ordem cronológica.

Bojesen, A.M., Nielsen, O.L., Christensen, J.P. & Bisgaard, M. (2004). In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathology*, 33, 145-152.

Witter, R.L. & Schat, K.A. (2003). Marek's Disease. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, & D.E. Swayne (Eds.). *Diseases of Poultry* 11th edn (pp.407-465). Ames: Iowa State Press.

Capua, I. & Mutinelli, F. (2001). *A Colour Atlas of and Text on Avian Influenza*. Casalecchio di Reno: Papi Editore.

Hafez, M.M., Schulze, D. & Kösters, J. (1997). Surveillance on verotoxin producing *E. coli* in broiler flocks and processing plants. In A. Székely (Ed.). *Proceedings of the XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association* (p. 101). Budapest, Hungary.

**Figuras.** Forneça o formato de figura da mais alta qualidade possível. Certifique-se de que todo o material digitalizado importado seja digitalizado na resolução apropriada: 1200 dpi para arte de linha, 600 dpi para escala de cinza e 300 dpi para cores. As figuras devem ser salvas separadamente no texto. Por favor, não incorpore figuras no arquivo do manuscrito. Os arquivos devem ser salvos como um dos seguintes formatos: TIFF (formato de arquivo de imagem marcado), PostScript ou EPS (PostScript encapsulado) e devem conter todas as informações de fonte necessárias e o arquivo de origem do aplicativo (por exemplo, CorelDraw / Mac, CorelDraw / PC). Todas as figuras devem ser numeradas na ordem em que aparecem no manuscrito (por exemplo, Figura 1, Figura 2). Nas figuras com várias partes, cada parte deve ser rotulada (por exemplo, Figura 1 (a), Figura 1 (b)). As legendas das figuras devem ser salvas separadamente, como parte do arquivo que contém o texto completo do manuscrito, e numeradas de forma correspondente. O nome do arquivo para um gráfico deve ser descritivo do gráfico, por exemplo Figura1, Figura2a.

**Tabelas** devem ser digitadas em páginas separadas, numeradas consecutivamente e ter um cabeçalho descritivo curto. As tabelas podem ser incluídas no mesmo arquivo que o texto principal ou carregadas como arquivos separados. As tabelas devem ser feitas usando o recurso de tabela de um processador de texto, não usando a tecla tab. As notas de rodapé devem ser indicadas com sobrescrito minúsculo a, b, c, etc. (sobrescrito maiúsculo A, B, C, etc. são usados apenas para indicar dados estatisticamente significativamente diferentes).

Os **dados da sequência** devem ser apresentados de forma concisa, usando um tamanho de fonte pequeno. É preferível o uso do código de aminoácidos de letra única. Os dados da sequência devem ser submetidos a um banco de dados e os números de acesso incluídos no final da seção Material e Métodos.

Os autores são incentivados, sempre que possível, a depositar materiais biológicos descritos ou produzidos no trabalho em um repositório apropriado. Exemplos relevantes incluem o repositório de plasmídeos sem fins lucrativos Addgene, a Organização de Coleções Culturais Europeias (ECCO) e a Federação Mundial de Coleções Culturais (WFCC).