



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA FONTANA

USO DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) PARA DETECÇÃO DE
Chlamydia sp. EM AVES SILVESTRES

PALOTINA

2022

CAROLINA FONTANA

USO DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE IN SITU (FISH) PARA DETECÇÃO DE
Chlamydia sp. EM AVES SILVESTRES

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

Orientadora: Profa. Dra. Aline de Marco Viott

PALOTINA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

F679 Fontana, Carolina
Uso da hibridização fluorescente *in situ* (fish) para detecção de
Chlamydia sp. em aves silvestres / Carolina Fontana.
– Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação Ciência Animal.
Orientadora: Profª. Drª. Aline de Marco Viott.

1. Clamidiose Aviária. 2. Ornitopatologia. 3. Zoonose.
I. Viott, Aline de Marco. II. Universidade Federal do Paraná.
III. Título.

CDU 614.9

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINA FONTANA** intitulada: **Uso da hibridização Fluorescente *in situ* (fish) para detecção de *Chlamydia sp.* em aves silvestres**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 29 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

30/03/2022 10:14:26.0

ALINE DE MARCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/03/2022 09:21:51.0

RENATA ASSIS CASAGRANDE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

30/03/2022 10:23:00.0

ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A pós-graduação é um caminho difícil, que fica bem mais leve quando temos uma rede apoio para contar. É com grande alegria que eu posso escrever aqui seus nomes.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, ou seja lá como é chamado, obrigada por me ouvir em nossas conversas, principalmente em noites ansiosas, obrigada por me ajudar a entender que estou onde eu deveria estar e por me levar para tantos lugares.

João e Mayane, eu acho que nunca vou conseguir agradecer o suficiente a vocês, por tanto, por serem presentes mesmo a quilômetros de distância, por acreditarem tanto no meu potencial, por me prestigiarem sempre, por me amarem como eu sou e por investirem em mim. Eu amo nossa família, nossas chamadas intermináveis e a maneira como sempre podemos contar uns com os outros.

Família é poder ser sempre você mesmo, é ter para onde voltar, é ter com quem contar, é não precisar de perfeição.

Ao meu “Gente demais, com tempo demais, falando demais, alto demais”:

Obrigada aos meus pais, **Gilmar e Selanira**, por todo o suporte e apoio, e por todos os privilégios que vocês me proporcionaram, que me permitiram toda a minha caminhada nessa história na universidade pública. Agradeço em especial a minha mãe, por me ensinar a sempre querer mais, e que tudo bem desistir as vezes. Eu amo vocês por todo o exemplo e por me tornarem quem eu sou.

Agradeço aos meus irmãos. **Ana Maria**, obrigada por ser minha rede de apoio psicológico tantas vezes e por me dar uma família ainda maior, amo muito você, mais **Livia**, mais **Alice** e mais **Jurian. João**, você não sabe como sou grata por ter você ao lado do nosso pai. **Ana Clara**, obrigada por ser a minha conexão com a juventude, obrigada por me ver como um adulto legal e por confiar em mim.

Obrigada minha querida **Livia**, minha leonina preferida, por me mostrar a pureza, alegria e acidez da infância, “madrriinha” te ama muito.

Aos moradores de da sede oficial dos almoços de domingo, **Tia Ângela, Tio Rodrigo e Vô Nilva**, obrigada por ser meu ponto de fuga, meu canto seguro, obrigada mais uma vez por acreditarem tanto em mim e por me salvarem com tantas caronas desde o vestibular. Eu amo vocês.

Fernanda, sou muito feliz e grata de o amor pela ciência ter nos aproximado bem mais que os laços familiares. Obrigada por acreditar em mim e me ver com seus

olhos. Seus sonhos são pequenos comparado ao que você ainda vai conquistar. Te amo.

A minha orientadora, **Aline de Marco Viott**, meu maior exemplo de professora desde a graduação, obrigada por mostrar humanidade, fragilidade, paixão pelo que faz mesmo em meio de algumas frustrações com o “sistema”. Obrigada pelos imensuráveis conhecimentos científicos, mas principalmente muito obrigada por me mostrar que a pós-graduação pode ser um lugar seguro, por se preocupar com nossa saúde mental e por me acolher nessa família que é o laboratório de Patologia. Professora Aline, sou muito grata por ter contato com uma mulher, mãe e orientadora como você, e por sempre acreditar que nosso lugar é na ciência.

Arthur e Crisan, obrigada por tanto, por todas as risadas, jantãs, fofocas, mais risadas, e por serem presentes e bem mais que colegas de laboratório. Arthur, obrigada por todas as vezes que você me emprestou suas filhas caninas ou me alimentou nos meus dias ruins.

Vinicius, você é uma das mentes mais incríveis que já conheci, apesar da memória horrível. Obrigada por ser muito mais que o aluno de iniciação científica do meu projeto, você merece o mundo e eu ainda vou ver você conquistando-o todo.

Obrigada **Amália** por todo o apoio tecnológico nas edições de imagens, pela companhia nas longas horas de FISH e por toda a ajuda sempre, que você continue se apaixonando pelo mundo da veterinária.

Obrigada **Hidemi** por me manter presente em sua vida, por me permitir ser colo. O que silvestres uniu tempo nenhum vai separar.

Obrigada **Nagini** por me escolher como tutora e por me inundar com seu amor puro e incondicional.

Obrigada UFPR Palotina por me trazer para casa nesse mundo pandêmico

“Sou das que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas”.

(Marie Curie.)

RESUMO

A clamidiose aviária é uma doença bacteriana de grande importância tanto para espécies aviárias quanto para o ser humano, levantando a necessidade de estabelecimento de diagnóstico rápido e efetivo para detecção das bactérias do gênero *Chlamydia*, causadoras da doença. O presente trabalho objetiva descrever a detecção de *Chlamydia* sp. por meio da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em cortes histológicos de pulmão, baço e segmentos de intestino de pombos-comuns (*Columba livia*), fixados em formol 10%. Amostras de 74 pombos-comuns foram avaliadas pela técnica FISH e por histopatologia convencional; A sonda utilizada seguiu uma sequência de 20 bases para anelamento, correspondente ao gene codificados das MOMP (*Major Outer Membrane Protein*) das bactérias do gênero *Chlamydia*, e acrescida do fluorocromo Alexa Fluor 555®. A histopatologia evidenciou predominantemente enterite linfocitória e/ou granulocítica, e serosite/miosite linfocitória em 28,1% dos intestinos. Esplenite granulomatosa e linfocitória, perivasculite, e áreas multifocais de necrose, distribuídas em 78,4% das amostras de baço avaliadas; Em pulmão foram observados quadros de pneumonia linfocitória e/ou granulocítica, perivasculite linfocitória em 62,2%, além de hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) em 36,5%. As 74 amostras histológicas submetidas a técnica de FISH foram classificadas quanto a distribuição de sinalizações em focal (+), multifocal em até 25% do tecido (++), sinalizações entre 25 e 50% do tecido (+++), e sinalizações superiores em 50% do tecido avaliado (+++). Destas, foram observadas sinalizações positivas em 76% dos intestinos, sendo 39,3% com sinalizações +; 33,9% com sinalizações ++; 16% apresentaram sinalizações +++, e 10,7% das amostras apresentaram sinalizações ++++. Já as amostras esplênicas, das 74 amostras, 80% foram positivas pela técnica, destas 30,5% classificadas em +; 37,3% apresentaram sinalizações em ++; 23,7% com sinalizações distribuídas em +++, e 8,5% apresentaram sinalização com distribuição superior a 50% do tecido ++++. A sinalização positiva foi observada em 88% das amostras pulmonares avaliadas, sua classificação em + foi observada em 18,5% das amostras, seguida de 50,8% com classificação em ++. A classificação em +++ foi observada em 18,5% das amostras e ++++ em 12,3%. De acordo com os resultados, a FISH mostrou-se uma técnica possível de ser utilizada para detecção de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de intestino, baço e pulmão de pombos-comuns (*Columba livia*).

Palavras-chave: Clamidiose Aviária, Ornitopatologia, Zoonose, Diagnóstico Histoquímico.

ABSTRACT

The avian chlamydiosis is a bacterial disease of high relevance for avian species as well as for humans, increasing the necessity of establishing fast and effective diagnosis for the detection of the bacteria of the genus *Chlamydia*, responsible for the diseases. The present study aims to describe the detection of *Chlamydia* sp. by fluorescence in situ hybridization (FISH) in histological sections of lung, spleen, and intestine from common pigeons (*Columba livia*), fixed in 10% formalin. Samples from 74 common pigeons were evaluated by FISH and conventional histopathology; the probe used followed a 20-base sequence for annealing, corresponding to the gene encoding the MOMP (Major Outer Membrane Protein) of bacteria of the gender *Chlamydia*, and added the Alexa Fluor 555® fluorochrome. Histopathology showed predominantly lymphohistiocytic and/or granulocytic enteritis, and lymphohistiocytic serositis/myositis in 28.1% of the intestines. Granulomatous and lymphohistiocytic splenitis, perivascularitis, and multifocal areas of necrosis distributed in 78.4% of the spleen samples evaluated; In lung, lymphohistiocytic and/or granulocytic pneumonia, lymphohistiocytic perivascularitis 62.2%, and bronchus-associated lymphoid tissue hyperplasia (BALT) in 36.5% were observed. The 74 histological samples submitted to the FISH technique were classified according to the distribution of signalizations into focal (+), multifocal in less than 25% tissue (++), signalizations between 25 and 50% of the tissues (+++), and signalizations higher than 50% of the tissues analyzed (+++). Of these, positive signalizations were observed in 76% of the intestines, of which 39.3% showed + signals; 33.9% showed ++ signals; 16% showed +++ signals, and 10.7% of the samples showed ++++ signals. As for the splenic samples, of the 74 samples, 80% were positive by the technique, of these, 30.5% classified as +; 37.3% showed ++ signaling; 23.7% showed signaling distributed in +++, and 8.5% showed signaling with distribution greater than 50% of the tissue ++++. Positive signaling was observed in 88% of lung samples evaluated, its classification in + was observed in 18.5% of samples, followed by 50.8% with classification in ++. The classification in +++ was observed in 18.5% of the samples and ++++ in 12.3%. According to the results, FISH proved to be a possible technique to be used for detection of *Chlamydia* sp. in histological sections of intestine, spleen, and lung of common pigeons (*Columba livia*).

Keywords: Avian Chlamydiosis, Ornithopathology, Zoonosis, Histochemical Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 - Ciclo de desenvolvimento bifásico das bactérias do gênero *Chlamydia*.....18

CAPÍTULO 1

FIGURA 1- Fotomicrografia de alteração histológica em amostras de pombo-comum (*Columba livia*). (A) Granuloma em baço evidenciado por material necrótico circundado por células gigantes multinucleadas e infiltrado mononuclear (HE, 40X). (B) Pneumonia caracterizada por material necrótico circundado por células gigantes multinucleadas em interstício pulmonar (HE, 60X).....51

FIGURA 2 - Fotomicrografia de sinalizações positivas em técnica de FISH para *Chlamydia* sp. e teste de contraprova em teciduais de Pombo-comum (*Columba livia*). (A) Sinalizações positivas em região de capilares aéreos e sanguíneos de pulmão. (C) Sinalizações positivas em lâmina própria e ápice de vilosidade intestinal. (D) Sinalizações positivas em parênquima esplênico. (40x, excitação em filtro de 555nm). B, D e F ausência de sinalização em contraprova utilizando filtro de excitação de 450 -550nm em tecidos correspondentes a, C e D.....52

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1 – Distribuição e intensidade de lesão histológicas em amostras de baço, pulmão e intestino de *Columba livia*, coradas em hematoxilina e eosina.....51
- Tabela 2 – Frequência de sinalizações positivas em técnica de FISH para detecção de *Chlamydia* sp. em baço, intestino e pulmão de *Columba livia*.....51

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

°C – Graus Celsius.

µL – Microlitros.

µm – Micrômetros.

CE - Corpo elementar.

CETAS - Centro de Triagem de Animais Silvestres.

CR - Corpo reticular.

ELISA – Ensaio Enzimático (*Enzyme Linked Immune Sorbent Assay*).

FISH - Hibridização fluorescente *in situ* (*Fluorescent in situ hybridization*).

HE – Hematoxilina e eosina.

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance.

M - Molar.

MOMP – Principal proteína externa de membrana (*Major Outer Membrane Protein*).

PBS - Solução salina tamponada

PCR - Reação em cadeia da polimerase.

pH – Potencial hidrogeniônico.

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio.

TRIS- Tris hidroximetil aminometano.

UFPR – Universidade Federal do Paraná.

TBE – Tampão tris-borato-EDTA.

TGI -Trato gastrointestinal.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 CLAMIDIOSE AVIÁRIA | 15 |
| 2.1.1 Etiologia..... | 15 |
| 2.1.2 Desenvolvimento, transmissão e sinais clínicos..... | 17 |
| 2.1.3 Alterações anatomopatológicas | 20 |
| 2.1.4 Diagnóstico..... | 21 |
| 2.1.5 Clamidiose e Saúde Pública..... | 22 |
| 2.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH)..... | 23 |
| REFERÊNCIAS..... | 26 |
| CAPÍTULO 1- USO DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH) PARA DETECÇÃO DE <i>CHLAMYDIA</i> SP. EM CORTES HISTOLÓGICOS DE POMBOS (<i>COLUMBA LIVIA</i>) DE VIDA LIVRE | 32 |
| 2.1 - INTRODUÇÃO | 35 |
| 2.2- MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 2.3 - RESULTADOS..... | 39 |
| 2.4 - DISCUSSÃO | 41 |
| REFERÊNCIAS..... | 44 |
| APÊNDICE A – PROTOCOLO FISH TECIDOS | 53 |
| APÊNDICE B – PROTOCOLO FISH EXCRETAS..... | 55 |
| APÊNDICE C – TAMPÃO HIBRIDIZADOR..... | 57 |
| APÊNDICE D – SOLUÇÃO DE LAVAGEM..... | 58 |
| ANEXO A – INSTRUÇÃO AOS AUTORES..... | 59 |
| ANEXO B – CERTIFICAÇÃO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR PALOTINA UFPR (CEUA-PALOTINA) | 65 |

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O pombo-comum (*Columba livia*), apresenta distribuição mundial e caráter sinantrópico, na maioria das vezes, devido à sua grande capacidade de adaptação ao ambiente urbano, como parques e praças, o que ocasiona alta densidade populacional nessas áreas. Além disso, esta espécie atua como reservatório e dispersor de diversos patógenos, especialmente por ser capaz de voar grandes distâncias (VÁZQUEZ *et al.*, 2010), o que desperta um grande interesse em saúde pública.

Além do contato com as aves silvestres em ambientes urbanos, o ser humano apresenta uma tendência crescente no interesse por *pets* não convencionais, sendo as aves ornamentais os animais mais comumente escolhidos para essa finalidade, principalmente por apresentarem uma grande variedade de padrões de colorações de plumagens e cantos harmoniosos. Em decorrência disto, há também uma propensão maior para a atuação do médico veterinário na medicina aviária para animais silvestres (Dai *et al.*, 2021).

Este contato próximo entre aves e seres humanos, seja como animais de companhia, pela condição inerente à atividade ocupacional (médicos veterinários, biólogos, tratadores) ou pela presença de aves sinantrópicas em ambientes urbanos, possibilita um maior contato com patógenos causadores de zoonoses relevantes. Em razão disto, estudos de prevalência destes patógenos em populações aviárias tanto de vida livre, quanto àquelas mantidas sob cuidados humanos, colaboram para traçar um perfil sanitário das aves, e conseqüentemente, permitindo a vigilância e controle destas zoonoses.

Dentre as zoonoses de interesse na medicina aviária está a clamidiose aviária, também denominada ornitose ou psitacose, uma patologia de grande importância tanto para aves quanto para seres humanos.

Chlamydia psittaci, agente etiológico correlacionado aos casos da clamidiose aviária, é uma bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória, pertencente à família *Chlamydiaceae*, gênero *Chlamydia* que alberga 13 espécies (BACHMANN *et al.*, 2014). Sua transmissão se dá pela inalação ou ingestão do agente presente em secreções oftálmicas e respiratórias e em excretas de aves contaminadas (RASO *et al.*, 2010; BOREL *et al.*, 2018).

O levantamento epidemiológico de ornitopatologia circulantes em ambiente urbano, como a clamidiose, é de extrema importância tanto para populações humanas quanto para a fauna nativa, e para isso faz-se necessário o emprego de técnicas diagnósticas mais rápidas de alta sensibilidade e especificidade, como por exemplo a hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Usualmente o diagnóstico para a clamidiose aviária é feito pela detecção direta do agente por cultivo celular ou pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), ou pela detecção indireta de anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático (ELISA) (Proença *et al.*, 2011).

Atualmente a técnica diagnóstica mais acessível na rotina para detecção de *Chlamydia* sp. é a PCR. Entretanto esta técnica apresenta alta incidência de resultados falsos negativos, uma vez que a bactéria apresenta característica de eliminação intermitente pelo hospedeiro. Em virtude disso, surge a necessidade de se empregar técnicas alternativas como a FISH, para o diagnóstico de clamidiose aviária, previamente demonstrado por Piccoli (2020). O presente trabalho tem como objetivo a utilização da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para detecção de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de baço, pulmão e intestino de pombos de vida livre e excretas de aves silvestres.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLAMIDIOSE AVIÁRIA

2.1.1 Etiologia

A clamidiose aviária, também denominada ornitose ou psitacose, é uma doença infecciosa de grande importância para espécies aviárias, sejam elas aves silvestres ou domésticas.

Os agentes etiológicos envolvidos nesta patologia são bactérias do gênero *Chlamydia*, principalmente *Chlamydia psittaci*. Estes agentes pertencem à família Chlamydiaceae que é composta por bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórias e que apresentam ciclo de desenvolvimento bifásico (SACHSE *et al.*, 2015; SUKON *et al.*, 2021; PROENÇA *et al.*, 2011; CASAGRANDE *et al.*, 2014).

O ciclo bifásico típico de clamídia é caracterizado por duas formas morfológicas distintas: corpo elementar (CE), forma extracelular, infectante e metabolicamente inativa (0,2-0,3µm) e o corpo reticular (CR), forma intracelular, metabolicamente ativa e não infecciosa (0,5-1,6µm) (SACHSE *et al.*, 2015).

São descritas 13 espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Chlamydia*, sendo elas *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. suis*, *C. avium*, *C. gallinacea*, *C. serpentis*, e *C. poikilothermis* (Cheong *et al.*, 2019). Destas, além da *C. psittaci*, são reportadas infecções em aves envolvendo *Chlamydia gallinacea* e *Chlamydia avium*, porém o potencial zoonótico envolvendo essas espécies ainda é desconhecido (SACHSE *et al.*, 2015; BOREL *et al.*, 2018).

Infecções envolvendo *C. psittaci* são relatadas em mais de 470 espécies aviárias, incluindo aves domésticas, de fauna silvestre e *pets* não convencionais, acometendo em maiores proporções pombos e psitacídeos (BOREL *et al.*, 2018), entretanto existem diferentes níveis de especificidade de hospedeiro dependendo do sorovar encontrado.

São descritos oito sorovares para *C. psittaci*, denominados como A, B, C, D, E, F, conhecidos por infectarem aves, e os sorotipos M56 e WC associados a infecções em mamíferos (HARKINEZHAD *et al.*, 2009). Alguns dos sorotipos aviários apresentam maior ocorrência em determinadas ordens de aves, por exemplo o sorotipo A é endêmico em psitacídeos e apresenta maior virulência, o sorotipo B é endêmico em columbiformes e comumente menos virulento, o sorotipo C está associado à infecções em anseriformes e aves aquáticas, o sorotipo D é altamente virulento quando acomete perus, o sorotipo E é isolado em pombos e outras aves domésticas, e o sorotipo F pode ser encontrado infectando perus e periquitos (CHEONG *et al.* 2019; PROENÇA *et al.*, 2011).

A membrana externa das clamídias apresenta dois principais componentes antigênicos, a *major outer membrane protein* (MOMP) que representa 60% do peso da membrana e o lipopolissacarídeo clamidial (LPS) que está presente tanto no CE quanto no CR (VANROMPAY, 2020) estes constituem os principais alvos utilizados nas técnicas diagnósticas (PROENÇA *et al.*, 2011) e pesquisas envolvendo o desenvolvimento de vacinas (HARKINEZHAD *et al.* 2009).

2.1.2 Desenvolvimento, transmissão e sinais clínicos

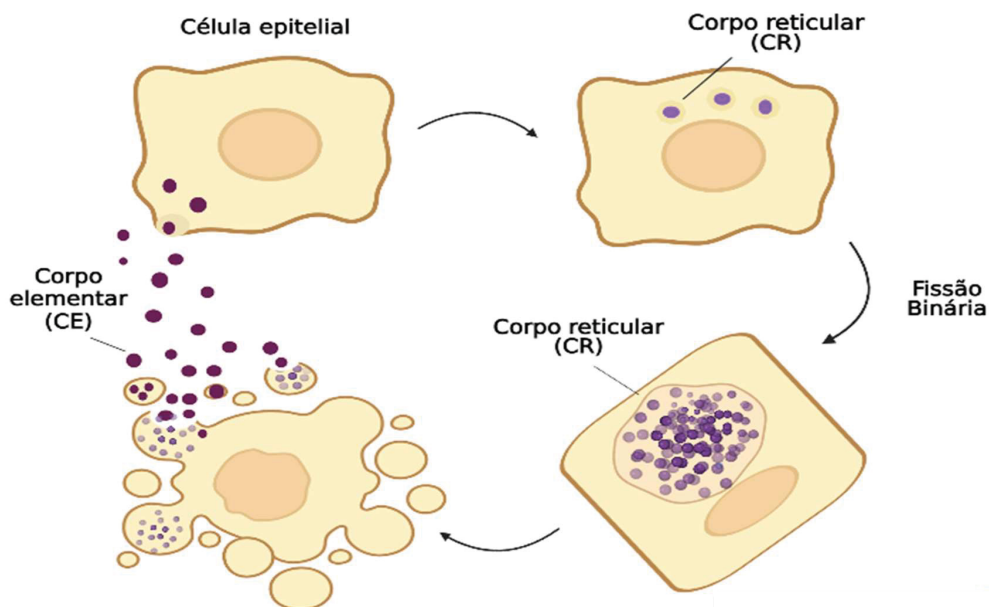
O ciclo da *Chlamydia sp.* se inicia pela endocitose do CE da bactéria por células epiteliais do hospedeiro. Após a endocitose, o CE se organiza na periferia celular, na região do complexo de Golgi mantendo-se em pequenos vacúolos e inclusões que impedem a fusão com lisossomos e outras organelas (HARKINEZHAD *et al.*, 2009).

Horas após a internalização pelas células hospedeiras, o CE se expande, passando para sua segunda fase, quando ocorre a diferenciação para CR. Esta forma do agente sofre fissão binária, obtendo a energia para sua multiplicação e crescimento a partir do recrutamento de mitocôndrias da célula hospedeira que permeiam a inclusão (HARKINEZHAD *et al.*, 2009). Após esse processo os CR sofrem maturação para novos CE, que são liberados por meio da lise da célula hospedeira, podendo infectar células vizinhas ou progredir na eliminação do agente (SACHSE *et al.*, 2015; BOREL *et al.*, 2018; BAYRAMOVA *et al.*, 2018; POPPERT *et al.*, 2002). A duração deste ciclo pode variar de 24 a 78 horas (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Se durante a fase de replicação, as bactérias encontrarem condições de estresse, como exposição a certos antibióticos ou privação de energia e nutrientes, as clamídias podem reduzir sua atividade metabólica e conseqüentemente sua replicação, nessas condições elas são denominadas como corpos aberrantes (CA), o que leva a uma eliminação intermitente do agente, uma vez que esse mecanismo pode ser revertido quando removidas as condições de estresse (PANZETTA *et al.*, 2018). Esta característica permite que as clamídias escapem das ações de

antimicrobianos acarretando em hospedeiros persistentemente infectados (SUKON *et al.*, 2021).

FIGURA 1 - Ciclo de desenvolvimento bifásico das bactérias do gênero *Chlamydia*.



Fonte: O autor (2022).

Os CE são conhecidos por sua resistência no ambiente extracelular, o que permite sobreviver por longos períodos devido a rigidez do envelope celular e sua baixa permeabilidade, principalmente quando envoltos por matéria orgânica presente em excretas e secreções eliminadas pelos hospedeiros (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Durante a infecção natural, o período de excreção do agente dependerá de fatores como virulência do sorotipo, grau de infecção e condição imune do hospedeiro, entretanto, a eliminação pode se estender por vários meses. Grandes quantidades de *C. psittaci* podem ser encontradas em exsudatos respiratórios e excretas de aves contaminadas durante longos períodos (HARKINEZHAD *et al.*, 2009).

A transmissão mais comum em aves ocorre principalmente pela inalação ou ingestão do agente através do contato direto com secreções e excreções de aves infectadas, ou ainda quando os filhotes são alimentados por meio de regurgitação pelos pais no ambiente de ninho. A transmissão vertical da bactéria pelo ovo pode ser observada em diversas espécies, o que pode servir para introdução e manutenção do agente em plantéis e bandos. Além disso, a transmissão pode ocorrer por fômites e ectoparasitas sugadores de sangue (ácaros, piolhos e mosquitos) ou ainda, em menor

proporção, por bicadas e feridas, sendo potencializadas no ambiente do ninho (SACHSE et al., 2015). Carcaças de aves infectadas com *C. psittaci* podem levar à transmissão do agente através do consumo por aves predadoras ou necrófagas (HARKINEZHAD et al., 2009). Populações aviárias de vida livre são potenciais fontes de infecção para aves domésticas e de companhia, por isso o contato direto entre elas deve ser evitado, bem como o contato com alimento e fômites.

Devido ao elevado teor lipídico característico das bactérias Gram-negativas, *Chlamydia psittaci* é sensível à maioria dos detergentes e desinfetante. Portanto, a adequada limpeza e desinfecção de equipamentos e fômites são suficientes para neutralizar o agente (SACHSE et al., 2015).

Os quadros clínicos observados na clamidiose aviária irão depender de diferentes fatores, como o estado imunológico e espécie do hospedeiro, patogenicidade e sorotipo do agente, porta de entrada e ainda presença de outras doenças concomitantes, sendo assim observados quadros com sinais clínicos de forma aguda, subaguda, crônica ou inaparente (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Na forma inaparente ou assintomática, as aves não apresentam sinais clínicos, entretanto, podem eliminar o agente de forma intermitente atuando como disseminadores e portadores assintomáticos. Essa eliminação pode ser potencializada por fatores estressantes como transporte, realojamento, déficit nutricional e doenças concomitantes, fazendo com que os animais passem a apresentar sinais clínicos (LONGBOTTOM & COULTER, 2003). As apresentações da doença nas formas subaguda e crônica são mais comuns em espécies com baixa susceptibilidade ou quando a infecção ocorre por cepas de virulência moderada (PROENÇA et al., 2011).

Os sinais clínicos observados em aves são, em sua maioria, inespecíficos, sendo mais comuns os sinais respiratórios, oftálmicos e digestórios dentre eles a coriza, blefarite e conjuntivite, descargas nasais e oculares mucopurulentas, dispneia, diarreia e urato amarelo-esverdeadas (devido ao comprometimento hepático). Além disso, podem ser observados quadros de apatia, anorexia, plumagem eriçada, baixo desempenho reprodutivo com diminuição da produção de ovos, ou ainda quadros de seps e morte (HARKINEZHAD et al., 2009; BALSAMO et al., 2017; PROENÇA et al., 2011).

2.1.3 Alterações anatomopatológicas

As alterações anatomopatológicas observadas em quadros de clamidiose aviária são classificadas como não patognomônicas. Os achados mais comumente encontrados incluem hepatite multifocal, hepato e esplenomegalia, aerossaculite, pericardite e celomite (SCHNEE *et al.*, 2018).

O acometimento hepático pode variar de alterações leves a hepatomegalia acentuada com alterações na coloração, que pode apresentar-se difusamente amarelo ou com presença de pontos multifocais cinza-amarelos de necrose (REAVILL; DORRESTEIN, 2018).

Os achados em quadros severos, geralmente com envolvimento de sorotipos mais patogênicos, podem evidenciar alterações em sistema respiratório com pulmões com congestão difusa e espessamento de sacos aéreos com acúmulo de exsudato fibrinoso. O pericárdio pode apresentar exsudato fibrinoso com espessamento e congestão. O baço pode apresentar-se aumentado de tamanho, de consistência macia e friabilidade aumentada, coloração escura associada a múltiplas áreas brancas (necrose), e evidenciação de focos de hiperplasia (SCHNEE *et al.*, 2018; CASAGRANDE *et al.*, 2014; REAVILL & DORRESTEIN, 2018; VANROMPAY, 2020).

A congestão e presença de exsudato fibrinoso depositado sobre órgãos e tecidos da cavidade celomática são decorrentes dos danos vasculares e resposta inflamatória desencadeada pela replicação das clamídias, principalmente em casos severos (SCHNEE *et al.*, 2018).

As principais lesões histopatológicas são observadas no fígado, decorrentes dos quadros de hepatite linfohistioplasmocitária correlacionados com necrose multifocal, hiperplasia de ductos biliares e acúmulo de hemossiderina (CASAGRANDE *et al.*, 2014), além da presença de necrose caseosa, caracterizada pela formação de granulomas de células gigantes multinucleadas. Os quadros de hepatite se devem ao efeito direto da proliferação das clamídias no fígado (VAN BUUREN *et al.*, 2011).

Alterações microscópicas em baço são marcadas por plasmocitose e aumento das células reticulares, associada a agregados multifocais de histiócitos e macrófagos, além da formação de granulomas e áreas multifocais de necrose (ABDUL-AZIZ *et al.*, 2008; ECCO *et al.*, 2009).

O sistema respiratório é marcado por agregados de macrófagos e fibrina no lúmen de parabrônquios (CASAGRANDE *et al.*, 2014). A resposta inflamatória a presença das clamídias pode ser observada também em outros órgãos, apresentando

quadros de enterite, miocardite, encefalite, nefrite e orquite (VAN BUUREN *et al.*, 2011).

Colorações especiais podem ser ferramentas para o diagnóstico de clamídias em cortes histológicos, permitindo a visualização do agente tanto intra quanto extracelularmente. Exemplos destas são as colorações especiais de Giemsa e Gimenez modificado, entretanto, trabalhos desenvolvidos com esta técnica em amostras histológicas de aves infectadas demonstraram a rara visualização do agente (ECCO *et al.*, 2009).

2.1.4 Diagnóstico

Por se tratar de um agente intracelular obrigatório, a cultura das clamídias só é possível por meio do isolamento em cultivo celular em linhagens celulares HeLa, McCoy e Buffalo *Green Monkey*, ou pela inoculação em ovos embrionados. Esta técnica é considerada padrão ouro para diagnóstico de clamidiose, pois permite a determinação de viabilidade das amostras coletadas, sendo confirmada pela caracterização bioquímica e molecular do agente (SACHSE & HOTZEL, 2003).

No passado, o método diagnóstico utilizado para identificação de *C. psittaci* era o isolamento bacteriano em cultivo celular, entretanto, a necessidade da alta qualidade das amostras com o mínimo de contaminações, o alto risco biológico envolvido nesta técnica, além do elevado tempo necessário para o diagnóstico levaram à substituição por outras técnicas de detecção do agente que apresentassem rapidez com alta sensibilidade e especificidade (SCHNEE *et al.*, 2018; PROENÇA *et al.*, 2011).

Provas sorológicas podem ser empregadas para o diagnóstico de clamidiose aviária, sendo passíveis de serem utilizadas as técnicas de reação de fixação de complemento, ELISA indireto e técnicas de imunofluorescência indireta. A principal vantagem da sorologia é permitir detectar os quadros de infecções a longo prazo. Entretanto, o resultado positivo apenas demonstra o contato da ave com o agente, não evidenciando a infecção ativa (SCHNEE *et al.*, 2018).

Em alternativa para o cultivo celular, os testes de detecção direta do agente são empregados, principalmente por não necessitarem do organismo viável em amostras (BALSAMO *et al.*, 2017). Uma alternativa para a detecção de *Chlamydia* sp. é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que apresenta como alvos principalmente os genes *ompA*, codificador das MOMP e o gene de RNA 16S (SACHSE & HOTZEL,

2003). O gene 23S rRNA, foi utilizado para identificação de agentes pertencentes a família *Chlamydiaceae* (SACHSE *et al.*, 2009).

Protocolos utilizando nested-PCR são descritos na literatura, além da otimização e utilização de PCR em tempo real e sequenciamento, que permitem a determinação de espécies e sorotipos de *Chlamydia* sp. envolvidos nos quadros de investigação, apresentando alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico (SACHSE; HOTZEL, 2003; SACHSE *et al.*, 2015).

Atualmente, o diagnóstico por PCR para *C. psittaci* é um dos únicos disponíveis comercialmente, sendo realizado a partir de amostras de excretas, *swabs* de cloaca e/ou orofaringe principalmente. Porém, o resultado falso-negativo pode ser observado em virtude da eliminação intermitente do agente, que pode ser demonstrada na janela de intervalo de coleta de amostras (PROENÇA *et al.*, 2011).

Dentre os métodos diagnósticos de clamidiose *post mortem* a imunohistoquímica apresenta alta acurácia para detecção do agente em cortes histológicos fixados em formol 10%. Esta técnica utiliza-se de anticorpos monoclonais voltados para antígenos de superfície das bactérias, como por exemplo as MOMP e LPS, e apresenta maior sensibilidade quando comparado as colorações histoquímicas usuais (CASAGRANDE *et al.*, 2014; BOREL *et al.*, 2018).

Segundo relatado por Proença *et al.* (2011), no Brasil, os dados epidemiológicos acerca da clamidiose são escassos, principalmente devido ao acesso dificultado a métodos diagnósticos e ausência de programas nacionais de controle da enfermidade. Em consequência disso, torna-se evidente a necessidade de novos estudos para desenvolvimento de técnicas efetivas para detecção do agente.

2.1.5 Clamidiose e Saúde Pública

A clamidiose apresenta uma grande importância em saúde única, uma vez que apresenta um elevado potencial zoonótico, sendo principalmente caracterizada como doença ocupacional (RASO *et al.*, 2010).

Comumente, a doença em humanos causada por infecções com *Chlamydia psittaci* é denominada psitacose. Sua transmissão se dá pela inalação do agente presente em penas, excretas frescas ou ressecadas, ou secreções respiratórias e oftálmicas provenientes de aves infectadas (BALSAMO *et al.*, 2017; VANROMPAY, 2020).

O quadro clínico em seres humanos pode variar desde doença inaparente até doenças sistêmicas severas caracterizada por pneumonias atípicas graves, endocardite, miocardite, meningite, conjuntivite. A doença tende a não ser fatal quando instituído o diagnóstico e tratamento corretos, isso ressalta a importância da inclusão de diferencial de psitacose para quadros de pneumonia atípica (CADARIO *et al.*, 2017). A transmissão pessoa-pessoa é rara, portanto, o contato com aves deve ser investigado (EBRAHIMI *et al.*, 2019).

Apesar das infecções provenientes de animais de companhia como psitacídeos sejam as mais relatadas, é importante ressaltar o risco de psitacose envolvendo o contato com aves de produção, pela manipulação de carcaças e penas no momento do abate, além do contato com aves mantidas sob cuidados humanos em instituições zoológicas (RASO *et al.*, 2010; VANROMPAY, 2020).

Relatos de surtos de pneumonia atípica envolvendo *Chlamydia* sp. em seres humanos associados ao contato direto com aves de produção como galinhas, patos e perus (LAROUCAU *et al.*, 2014; SHAW *et al.*, 2016), associado a quadros investigativos da prevalência do agente na cadeia produtiva de aves (YIN *et al.*, 2013) demonstram a importância da psitacose de maneira ocupacional nesse setor.

Nas aves, são listadas susceptibilidades em mais de 470 espécies distribuídas em 30 ordens, com destaque aos psitacídeos e columbiformes (CHEN *et al.*, 2021). Dentre as espécies descritas como portadoras de *C. psittaci*, os pombos (*Columba livia*) se destacam, com soropositividade elevada em diversos trabalhos (HARKINEZHAD *et al.*, 2009). Além disso, os pombos em vida livre apresentam numerosas populações, principalmente em centros urbanos como praças e parques, podendo atuar como reservatório de transmissor da *C. psittaci*, entre outros agentes (VÁZQUEZ *et al.*, 2010; LEAL *et al.*, 2015).

Dados referentes ao impacto das infecções por clamídia em aves silvestres em vida-livre são escassos, muito provavelmente os quadros de epizootias envolvendo *C. psittaci* associada à alta mortalidade sejam subestimados (BURNARD; POLKINGHORNE, 2016), principalmente envolvendo espécies com diferentes graus de ameaças de extinção, como as diversas espécies de psitacídeos. Isso ressalta a necessidade de investigação sobre o *status* sanitários dessas espécies em *habitat* natural no Brasil (RASO *et al.*, 2006).

2.2 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) permite a visualização, identificação e localização de agentes em amostras celulares ou teciduais, com rapidez e alta sensibilidade. Esta técnica permite detectar a presença de um microrganismo alvo, mesmo na presença de 10⁶ células não alvo. A FISH combina a precisão das análises moleculares com a visualização e identificação do agente em microscopia quando empregada em cortes histológicos, permitindo a detecção e identificação de microrganismos diretamente no tecido, correlacionando a presença do patógeno com a lesão tecidual causada (MOTER & GÖBEL, 2000).

O uso da FISH permite que uma sequência de nucleotídeos alvo seja detectada, no interior das células, sem que haja alterações em sua morfologia ou compartimentos celulares (NEVES & GUEDES, 2012). Segundo Frickmann e colaboradores (2017), uma das principais vantagens do uso da FISH, se dá pela sua possibilidade de utilização em tecidos formolizados, permitindo a análise em amostras previamente coletadas, ou que necessitem de transporte prolongado.

O princípio básico da técnica é o anelamento de uma sonda, constituída por uma sequência de 15 a 30 oligonucleotídeos complementares à sequência alvo e marcados com uma substância fluorescente, com uma sequência de material genético alvo, seguida da sua observação em microscopia de epifluorescência (NEVES; GUEDES, 2012).

As marcações das sondas podem se dar de duas maneiras, direta ou indireta. A forma mais usual é a marcação direta, onde um ou mais fluorocromos são ligados covalentemente à nas regiões 5'. Para a realização da marcação pela técnica indireta faz-se necessária a adição de uma molécula de digoxigenina à sonda, que após o anelamento com o tecido alvo, é acrescida de anticorpos anti-digoxigenina conjugados a um fluorocromo, e esta ligação antígeno anticorpo emitirá coloração em fluorescência (NEVES & GUEDES, 2012).

A FISH pode ser aplicada para diferentes campos de investigação como descrito por Moter e Göbel (2000) que incluem sua utilização para detecção microbiana em amostras ambientais de água proveniente de lagos, rios, degelo, oceanos, e ainda subestações de tratamento de água. Os autores relatam também a sua utilização na detecção de flora simbiótica em indivíduos saudáveis, podendo diferenciar populações microbianas complexas em cavidade oral, trato gastrointestinal e respiratório.

A técnica de FISH tem sido utilizada como método diagnóstico de diferentes patógenos na medicina veterinária, como por exemplo *Brachyspira* spp. (Wilberts *et*

al., 2015; Matos *et al.*, 2021), e *Legionella* spp. (Whiley *et al.*, 2011), evidenciando sua utilização tanto em cortes histológicos formolizados quanto em amostras fecais, o que demonstra o seu uso para detecção *in vivo* de agentes.

Dentre as vantagens para o uso da técnica, se destacam a rapidez e o baixo custo envolvido no uso do FISH, principalmente por permitir o diagnóstico e bactérias intracelulares obrigatórias, dispensando a necessidade de cultivo celular e de técnicas de extração previamente ao uso da técnica (Moter & Göbel, 2000).

Embora os relatos na medicina veterinária referentes à utilização da FISH *in vivo* sejam escassos, esta técnica já é amplamente descrita na medicina humana para detecção de microrganismos gastrointestinais obtidos em amostras fecais (FRANKS *et al.*, 1998; WAAR *et al.*, 2005). Este fato demonstra a possibilidade do emprego desta técnica para o diagnóstico *ante mortem* de patógenos a partir de amostras de hemocultura, urina, fezes, excretas ou secreções associadas as vias de eliminações de agentes.

Dentre as desvantagens demonstradas pela técnica, assim como as demais técnicas de investigação *in situ*, está a necessidade de treinamento e experiência na avaliação, o que requer uma leitura criteriosa das amostras, uma vez que não há protocolos padronizados para a avaliação das imagens visualizadas (Prudent & Raoult, 2019).

Dentre os trabalhos que demonstram a utilização da FISH, o desenvolvido por Poppert *et al.* (2002) desperta maior interesse, pois evidencia o seu uso em material de cultivo celular para detecção de *Chlamydia* spp. confirmando a sua possibilidade de utilização para bactérias do gênero. A partir disso, Piccoli (2020) empregou o uso da técnica de FISH para diagnóstico de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de fígado de aves silvestres, possibilitando o emprego da técnica para o diagnóstico da clamidiose aviária.

REFERÊNCIAS

ABDUL-AZIZ, T.; FLETCHER, O.; BARNES, H. J. Hepatobiliary system. In: O. Fletcher (Ed.); **Avian Histopathology**. 1st ed., p.202–237, 2008.

BACHMANN, N. L.; POLKINGHORNE, A.; TIMMS, P. *Chlamydia* genomics: Providing novel insights into chlamydial biology. **Trends in Microbiology**, 2014.

BALSAMO, G.; MAXTED, A. M.; MIDLA, J. W.; MURPHY, J.M.; WOHRLE, R. et al. Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2017. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 31, n. 3, p. 262–282, 2017.

BAYRAMOVA, F.; JACQUIER, N.; GREUB, G. Insight in the biology of Chlamydia-related bacteria. **Microbes and Infection**, v. 20, p. 432-44, 2018.

BOREL, N.; POLKINGHORNE, A.; POSPISCHIL, A. A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? **Veterinary Pathology**, v.55. n.3, p. 374-390, 2018.

BURNARD, D.; POLKINGHORNE, A. Chlamydial infections in wildlife–conservation threats and/or reservoirs of ‘spill-over’ infections? **Veterinary Microbiology**, v. 196, p. 78-84, 2016.

BURT, S. A.; RORING, 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, 2018.

VAN BUUREN, C. E.; DORRESTEIN, G. M.; VAN DIJK, J. E. *Chlamydia psittaci* infections in birds: A review on the pathogenesis and histopathological features. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 1, p. 38–41, 2011.

CADARIO, M. E.; FRUTOS, M. C.; ARIAS, M. B.; ORIGLIA, J. A.; ZELAYA, V; MADARIAGA, M. J.; LARA, C. S.; RÉ, V; CUFFINI, C. G.; Epidemiological and molecular characteristics of *Chlamydia psittaci* from 8 human cases of psittacosis and 4 related birds in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 4, p. 323–327, 2017.

TERZIAN, A. C. B.; ZUCCARI, D. A.P.C; PEREIRA, R. S.; PAVAM, M. V.; RUIZ, C. M; SUEIRO, F. A. R.; COELHO, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 96-102, 2007.

CASAGRANDE, R. A.; MACHADO, V. R.; SOUZA, S. O. de; WATANABE, T.T.N.; SONNE, L.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D.; Diagnóstico imuno-

histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 885–890, 2014.

CHEN, W.-T.; TENG, C.-A.; SHIH, C.-H.; HUANG., W.-H.; JIANG, Y.-F.; CHANG, H.-W.; JENG, C.-R.; LAI, Y.-H.; GUO, J.-C.; WANG, P.-J.; CHENG, C.-H & CHANG, Y.-C.; Investigation of Lethal Concurrent Outbreak of Chlamydiosis and Pigeon Circovirus in a Zoo. **Animals**, v. 11, p. 1654, 2021.

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, p.146, 2019.

DAI, C.; CHEN, Y.; ZHENG, Q. The Social and Cultural Importance of Keeping Wild Birds as Pets in an Ethnic Community in Guiyang City, China. **Human Ecology**, v. 49, p. 69–79, 2021.

EBRAHIMI, M.; FADII, A.; MARDANI, M.; AGHAZADE, K.; DIVSALAR, F.; MINOOEIFAR, J. Difficulties in diagnosis of psittacosis or ornithosis: A case report. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 2019.

ECCO, R.; PREIS, I. S.; MARTINS, S. N. R.; VILELA, R D. A.; SHIVAPRASAD, H. L. An Outbreak of Chlamydiosis in Captive Psittacines. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.2, p.85-90, 2009.

FERREIRA, V. L.; DIAS, R. A.; RASO, T. F. Screening of feral pigeons (*Columba livia*) for pathogens of veterinary and medical importance. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. 4, p. 701–704, 2016.

FRANKS, A.H.; HARMSSEN, H.J.M.; RAANGS, G.C.; JANSEN, G.J.; SCHUT, F. & WELLING, G.W. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64. p. 3336–3345, 1998.

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

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, 2009.

HEWINSON, I.G.; GRIFFITHS, P.C.; BEVAN, B.J.; Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v.54, p.155-166, 1997.

KABEYA, H.; SATO, S.; MARUYAMA, S. Prevalence and characterization of Chlamydia DNA in zoo animals in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 59, n. 9, p. 507–515, 2015.

LAGAE, S.; KALMAR, I.; LAROUCAU, K.; VORIMORE, F.; VANROMPAY, D. Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 399–407, 2014.

LAROUCAU, K.; AAZIZ, R.; MEURICE, L.; SERVAS, V.; CHOSSA, T, I; ROYER, H; BARBEYRAC, De; VAILLANT, V. MAYEN, J.L; MEZIANI, F. SACHSE, K & ROLLAND, P. Outbreak of psittacosis in a group of women exposed to *Chlamydia psittaci* infected chickens. **Euro surveill.** v.20, p.21155, 2003.

LEAL, D. C.; NEGRÃO, V. B.; SANTOS, F; BARROUIN-MELO, S.M; FRANKE, C.R; Ocorrência de *Chlamydophila psittaci* em pombos (*Columba livia*) na cidade de Salvador, Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 771–776, 2015.

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

LOPES, L.; Detecção molecular de *Chlamydophila psittaci* em Columbiformes e Galliformes na Região Centro Sul do Estado de Goiás. 2014 Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4057> . Acesso em: 10/1/2022.

MATOS, M. R. de; GRZEGOZEWSKI, A. P.; CRUZ, A. da; CHENG, A.C; GERELLI, A; FUSCO, C; GRUCHOUSKEI, L; VIOTT, A. de M; Identification of *Brachyspira* spp. In the cecum of broiler chickens using histology and in situ diagnostic assays. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 5, p. 2813–2824, 2021

MIYAIRI, I.; LAXTON, J. D.; WANG, X.; OBERT, C.A; TATIREDDIGARI, V.R.R.A; ROOIJEN, N. V; HATCH, T.P; BYRNE, G. I; *Chlamydia psittaci* Genetic Variants Differ in Virulence by Modulation of Host Immunity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 4, p. 654–663, 2011.

MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, n. 2, p. 85–112, 2000.

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**, v. 79, n. 4, p. 627–632, 2012.

ORNELAS-EUSEBIO, E.; SÁNCHEZ-GODOY, A. F. D.; CHÁVEZ-MAYA, A. F.; GARZA-GARCÍA, J.A.D. La; HERNANDEZ-CASTRO, R; GARCÍA-ESPINOSA, G.

Case report- First identification of *Chlamydia psittaci* in the acute illness and death of endemic and endangered psittacine birds in Mexico. **Avian Diseases**, v. 60, p. 540–544, 2016.

PANZETTA, M. E.; VALDIVIA, R. H.; SAKA, H. A. Chlamydia persistence: A survival strategy to evade antimicrobial effects in-vitro and in-vivo. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p. 3101, 2018.

PICCOLI, R. J. Uso de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) na identificação de *Chlamydia* sp. em tecido hepático de aves silvestres nativas e exóticas, 2020. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/68779>>. Acesso em: 7/1/2022.

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, n. 8, p. 4081–4089, 2002.

PROENÇA, L. M.; FAGLIARI, J. J.; RASO, T. DE F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 841–847, 2011.

PRUDENT, E.; RAOULT, D. Fluorescence *in situ* hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n.1, p. 88-107, 2019.

RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R.; PINTO, A. A. Chlamydia psittaci in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 2–4, p. 235–241, 2006.

RASO, T. F.; CARRASCO, A. O. T.; SILVA, J. C. R.; MARVULO, M. F. V.; PINTO, A. A. Seroprevalence of antibodies to *Chlamydia psittaci* in zoo workers in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 6, p. 411–416, 2010.

REAVILL, D. R.; DORRESTEIN, G. Psittacines, Coliiformes, Musophagiformes, Cuculiformes. In: K. A. Terio; D. McAloose; J. st. Leger (Eds.); **Pathology of Wildlife and Zoo Animals**. 1st ed., p.775–788, 2018.

RÜSSMANN, H.; KEMPF, V. A. J.; KOLETZKO, S.; HEESEMANN, J.; AUTENRIETH, I. B. Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 304–308, 2001.:

MAGNINO, S; HAAG-WACKERNAGEL, D; GEIGENFEIND, I; HELMECKE, S; DOVC, A; PRUKNER-RADOVIC, E; RESIDBEGOVIC, E; ILIESKI, V; LAROUCAU,

K; Donati, M; MARTINOV, S; KALETA, E. F; Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 54-67, 2009.

SACHSE, K.; HOTZEL, H. Detection and Differentiation of *Chlamydiae* by Nested PCR. In: Sachse K.; J. Frey (Eds.); **PCR Detection of Microbial Pathogens**. 1st ed., p.123–136, 2003.

SACHSE, K.; LAROUCAU, K.; VANROMPAY, D. Avian Chlamydiosis. **Current Clinical Microbiology Reports**, v.2, p. 10-21, 2015.

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

SCHNEE, C.; VANROMPAY, D.; LAROUCAU, K. Avian chlamydiosis. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.01_AVIAN_CHLAMYD.pdf>. Acesso em: 6/1/2022.

SHAW, K.A; SZABLEWSKI, C.M; KELLNER, S.; KORNEGAY, L; BAIR, P; BRENNAN, S; KUNKES, A; DAVIS, M; MCGOVERN, O. L.; WINCHELL, J; KOBAYASHI, M; BURTON, N; PERIO, M.A. De; GABEL, J; DRENZEK, C; MURPHY, J; HOLSINGER, C; FORLANO, L; Psittacosis Outbreak among Workers at Chicken Slaughter Plants, Virginia and Georgia, USA, 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 94, p. 52–60, 2016.

SUKON, P.; NAM, N. H.; KITTIPREEYA, P.; SARA-IN, A.; WAWILAI, P.; INCHUAI, R.; WEERAKHUN; Global prevalence of chlamydial infections in birds: A systematic review and meta-analysis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 192, 105370, 2021.

THIERRY, S.; VORIMORE, F.; ROSSIGNOL, C.; SCHARF, S; SACHSE, K; BERTHON, P; DURAND, B; VIRLOGEUX-PAYANT, I; BOREL, N; LAROUCAU, K; Oral Uptake of *Chlamydia psittaci* by Ducklings Results in Systemic Dissemination. **PLoS ONE**, 11(5), 2016.

TOLOSA, E. M. C. DE.; RODRIGUES, C. JUNQUEIRA.; BEHMER, O. ARRUDA.; FREITAS NETO, A. G. DE. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. ed. Barueri SP: Editora Manole Ltda, 2003.

UHLMANN, V.; SILVA, I.; LUTTICH, K.; PICTON, S.; O'LEARY, J. J. In cell amplification. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, p. 119–130, 1998.

VANROMPAY, DAISY. Avian Chlamydiosis. In: D. E. Swayne (Ed.); **Diseases of Poultry**. 14th ed., p.1086–1107, 2020.

VÁZQUEZ, B.; ESPERÓN, F.; NEVES, E.; LÓPEZ, J.; BALLESTEROS, C.; MUÑOZ, M. J. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.42, n.45, 2010.

WAAR, K.; DEGENER, J. E.; VAN LUYN, M. J.; HARMSSEN, H. J. M. Fluorescent *in situ* hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 937–944, 2005.

WHILEY, H.; TAYLOR, M.; BENTHAM, R. Detection of *Legionella* species in potting mixes using fluorescent *in situ* hybridization (FISH). **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 304–309, 2011.

WILBERTS, B. L.; WARNEKE, H. L.; BOWER, L. P.; KINYON, J. M.; BURROUGH, E. R. Comparison of culture, polymerase chain reaction, and fluorescent *in situ* hybridization for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira hampsonii* in pig feces. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 1, p. 41–46, 2015.

YIN, L.; KALMAR, I. D.; LAGAE, S.; VANDENDRIESSCHE, S.; VANDERHAEGHEN, W; BURAYE, P; Cox, E; VANROMPAY, D; Emerging *Chlamydia psittaci* infections in the chicken industry and pathology of *Chlamydia psittaci* genotype B and D strains in specific pathogen free chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 740–749, 2013.

CAPÍTULO 1- USO DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) PARA DETECÇÃO DE *Chlamydia* sp. EM CORTES HISTOLÓGICOS DE POMBOS (*Columba livia*) DE VIDA LIVRE

Capítulo reservado para o artigo “Uso de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para detecção de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de pombos (*Columba livia*) de vida livre”. Este capítulo segue as normas para publicação da revista *Avian Pathology*.

**Detecção de *Chlamydia* sp. em pombos (*Columba livia*) de vida livre por
hibridização fluorescente *in situ* (FISH)**

Carolina Fontana¹, Vinicius Dahm¹, Arthur Colombari Cheng¹, Joice Andrade²,
Amália Ferronato¹, Karim Cristhine Pase Montagnini¹, Leonardo Gruchouskey³,
Nelson Luis Mello Fernandes², Aline de Marco Viott^{1*}

¹Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Palotina, Paraná, Brasil.

²Laboratório de Doenças Parasitárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Palotina, Paraná, Brasil.

³Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Realeza, Paraná, Brasil.

* Autor correspondente. Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Palotina, Paraná, Brasil. E-mail: alinedemarco@yahoo.com.br.

Resumo. Dentre as doenças zoonóticas de importância para saúde única, se destaca a clamidiose. Devido ao impacto em saúde pública, o uso de testes eficientes e de rápido diagnóstico são de extrema importância para o controle da doença. O presente trabalho objetiva descrever a detecção de *Chlamydia* sp. por meio da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em cortes histológicos de pulmão, baço e intestino de pombos-comuns (*Columba livia*), fixados em formol 10%. Amostras de 74 pombos-comuns de vida livre foram avaliados pela técnica de FISH e por histopatologia usual. A sonda utilizada utilizou uma sequência de 20 bases para anelamento, correspondente ao gene codificados das MOMP (*Major Outer Membrane Protein*) das bactérias do gênero *Chlamydia*, e acrescida do fluorocromo Alexa Fluor 555®. As alterações histológicas evidenciaram em intestino enterite linfocitocitária e/ou granulocítica, e serosite/miosite linfocitocitária em 28,1% das amostras, em baço observou-se esplenite granulomatosa e linfocitocitária, perivasculite, e áreas

multifocais de necrose em 78,4% das amostras. Em pulmão foram observados quadros de pneumonia linfocitocitária e/ou granulocítica, perivasculite linfocitocitária 62,2%, e hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) em 36,5%. As 74 amostras submetidas a técnica de FISH foram classificadas quanto a distribuição de sinalizações em focal (+), multifocal em até 25% do tecido (++), sinalizações entre 25 e 50% dos tecidos (+++), e sinalizações superiores em 50% dos tecidos avaliados (++++). Destas foram observadas sinalizações positivas em 76% em intestinos, sendo 39,28% com sinalizações em +; 33,9% sinalizações ++; 16,% sinalizações +++, e 10,7% apresentaram sinalizações de +++++. As amostras esplênicas, 80% foram positivas pela técnica, destas 30,5% classificadas em +; 37,3% sinalizações em ++; 23,7% com sinalizações em +++, e 8,5% apresentaram sinalização em +++++. A sinalização positiva foi observada em 88% das amostras pulmonares avaliadas, sua classificação em + foi observada em 18,5%, seguida de 50,8% com classificação em ++. A classificação em +++ foi observada em 18,5% das amostras e +++++ em 12,3%. O FISH mostrou-se uma técnica eficaz para detecção de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de intestino, baço e pulmão de pombos-comuns (*Columba livia*).

Destaques da pesquisa

- Possibilidade do uso da técnica de FISH para diagnóstico e quantificação de *Chlamydia* sp em aves.
- Elevada positividade pela técnica de FISH: 80% em baço, 76% em intestino e 88% em pulmão;
- Observação de amostras positivas no FISH associada a ausência de alterações histopatológicas, evidenciando animais portadores assintomáticos.

Palavras-chave: histopatologia, ornitopatologia, clamidiose aviária, psitacose, saúde única, zoonose.

2.1 - INTRODUÇÃO

Os pombos-comuns (*Columba livia*) são aves sinantrópicas de distribuição mundial com alta densidade populacional, principalmente em ambiente urbano, devido a sua capacidade de adaptação na presença de abrigo e alimento. Esta espécie desperta também um interesse no que se refere a saúde única, uma vez que se mostra naturalmente infectado a um número crescente de agentes (Vázquez *et al.* 2010). A clamidiose é uma das doenças listados como transmitidas por pombos, sendo considerado o mais frequente nessa espécie (Magnino *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2016).

A clamidiose aviária, também denominada psitacose ou ornitose é uma doença de grande importância na ornitopatologia, com susceptibilidade em mais de 470 espécies aviárias (Chen *et al.*, 2021). Além disso possui uma considerável relevância na saúde humana por seu potencial zoonótico (Miyairi *et al.*, 2011). O agente causador é *Chlamydia psittaci*, bactéria intracelular obrigatória e Gram-negativa pertencente ao gênero *Chlamydia* (Chen *et al.*, 2021).

Os sinais clínicos em aves dependem de fatores como virulência do agente, estresse, idade e condições imunológicas do hospedeiro, variando desde doença inaparente até quadros sintomáticos com dificuldade respiratória, secreções respiratórias e oftálmicas exsudativas, conjuntivite, diarreia e urato amarelo-esverdeado. Além disso, podem apresentar quadros inespecíficos caracterizados por apatia, anorexia, plumagem eriçada e diminuição na produção de ovos (Harkinezhad, Geens & Vanrompay, 2009; Balsamo *et al.*, 2017).

Mundialmente, tem-se o conhecimento de Columbiformes de vida livre portadoras de *Chlamydia psittaci*. Este fato é evidenciado por trabalhos com

levantamento do agente em populações de pombos, como demonstrado por Magnino et al, (2009) ao se relatar quadros em toda a Europa e na China por Ling et al, (2015).

Surtos de psitacose em humanos são relatados mundialmente, com transmissão por inalação de aerossóis de excretas e secreções respiratórias de aves contaminadas, além do contato com carcaças, plumagem e vísceras de animais no momento do abate (Lagae *et al.*, 2014). O quadro evidencia desde sinais gripais leves como mialgia, dor de cabeça, febre alta e coriza, podendo evoluir para quadros de pneumonia atípica e morte (Cadario *et al.*, 2017).

O diagnóstico de *Chlamydia* sp. é realizado a partir de técnicas como cultivo celular, sorologia e principalmente a detecção do agente por técnicas de PCR.. Entretanto o resultado de falso-negativo pode ser observado em quadros de eliminação intermitente do agente, além disso a técnica muitas vezes se mostra dificultada na detecção *in situ* dos agentes em cortes histológicos (Proença *et al.*, 2011).

O diagnóstico rápido e definitivo em casos suspeitos de clamidiose são de grande importância, associado ao seu potencial zoonótico (Longbottom & Coulter 2003). Em virtude disso, o desenvolvimento de técnicas diagnósticas aliadas ao PCR, que apresentem rapidez, fácil desenvolvimento e alta especificidade e sensibilidade se faz cada vez mais necessário. Uma alternativa é o uso da hibridização fluorescente *in situ* (FISH), uma técnica molecular de alta especificidade na identificação de microrganismos, tanto *in vivo* como *in situ*, dispensando a necessidade de cultivo celular, tendo sua utilização demonstrada em trabalhos anteriores na detecção de *Chlamydia* sp. (Poppert *et al.*, 2002; Piccoli, 2020).

O levantamento epidemiológico de ornitopatologia circulante em ambiente urbano, como a clamidiose, é de grande relevância tanto para humanos quanto para fauna nativa. O presente trabalho busca descrever a utilização da hibridização fluorescente

in situ (FISH) na detecção de *Chlamydia* sp. em cortes histológicos de baço, pulmão e segmentos de intestino de pombos-comuns (*Columba livia*) de vida livre.

2.2- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido sob aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina com protocolo CEUA/Palotina 24/2020.

Amostras. Foram utilizados fragmentos teciduais de baço, pulmão e segmentos de intestino (ceco e colón) de 74 pombos-comuns (*Columba livia*) de vida livre, de área urbana do município de Toledo, Paraná, Brasil, pertencentes à coleção biológica do Laboratório de Patologia Animal (LPA) da UFPR-Setor Palotina. As amostras utilizadas foram mantidas fixadas em formaldeído 10% por um período superior a um ano. O processamento histológico se deu de maneira usual (Tolosa *et al.*, 2003), seguido da inclusão em parafina e submetidas a cortes histológicos de cinco micras (μm) utilizando-se micrótomo Leica® modelo Rm2245. Foram confeccionadas lâmina histológicas em duplicata, uma reservada para a coloração de hematoxilina e eosina (HE) e outra para a realização de FISH, estas em lâminas previamente silanizadas.

Histopatologia. Após a confecção das lâminas histológicas, os cortes de baço, pulmão e intestino foram avaliados em microscópio óptico e então classificadas de acordo com o padrão e intensidade em leve, moderada e acentuada, e a localização classificada quanto as regiões de parabrônquios e capilares aéreos em tecido pulmonar, e regiões de mucosa, camada muscular e serosa em intestino. Buscou-se lesões sugestivas da presença do agente, sendo em tecido esplênico lesões de necrose fibrinóide com infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e a hemossiderose, em pulmões deposição de fibrina com infiltrado inflamatórios predominantemente de macrófagos no lúmen de parabrônquios, e as lâminas de intestino investigadas quanto as lesões sugestivas de enterite (Casagrande *et al.*, 2014; Proença, Fagliari & Raso, 2011).

Hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Para a realização da técnica de FISH, utilizou-se uma sonda sintetizada (Invitrogen®) com base em trabalhos anteriores (Hewinson *et al.*, 1997; Ferreira, 2014), tendo como sequência de anelamento a região relacionada ao gene *ompA*, codificador das MOMP (*major outer membrane protein*) de Chlamydiaceae: CPF-5'GCA AGA CAC TCC TCA AAG CC-3'. A análise de especificidade das sequências da sonda foi realizada por alinhamento simples local no algoritmo BLAST (NCBI), demonstrando 100% de identidade com as bactérias do gênero *Chlamydia*. A sonda foi marcada com o fluorocromo Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher®) e purificada pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Os cortes histológicos de baço, pulmão e intestino em lâminas silanizadas, foram desparafinadas em bateria dupla de xilol por 10 minutos cada e então reidratados durante cinco minutos em soluções de etanol absoluto, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70% e em água destilada. Estas lâminas foram secas em temperatura ambiente, 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 acrescida de 80µl de solução tampão hibridizadora (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl, 0,1% de dodecil sulfato de sódio) e em seguida incubadas com 100µL de solução contendo 2 ng de sonda comercial, a 37°C por 16 horas.

Após este período, as lâminas foram então lavadas três vezes com 100µL tampão de hibridização pré-aquecido a 37°C, três vezes com 100µL solução de lavagem pré-aquecida 37°C (100 mM Tris, pH 7,2, 0,9 M NaCl) e por último 100µL de água destilada por dois minutos. Passado esse processo, as lâminas foram secas em estufa a 45°C e em seguida foram montadas utilizando meio de montagem próprio para microscopia de fluorescência a base de glicerol (PorLong Diamond Antifade

Mountant, Thermo Fisher®). De imediato após a montagem, realizou-se a leitura da técnica em microscópio de fluorescência (Olympus, FSX 100, Japão) aumento de 40 a 60 vezes, buscando as sinalizações fluorescentes com emissão de cor laranja, em filtro de excitação adequado para o fluorocromo (555 nm). Em caso de sinalizações sugestivas, a região era reavaliada em filtros de excitação inferior (450 – 550 nm), para assim se excluir os casos de autofluorescência. Foram consideradas positivas, sinalizações brilhantes, fortes e de formato arredondado, com tamanho de 0,3 a 2µm e que desapareciam com a troca de filtro de luz.

As amostras foram classificadas em um padrão de cruzes, adaptado do proposto por Terzian *et al.*, (2007), sendo: negativo (-) na ausência de sinalizações; uma cruz (+) sinalização focal; duas cruzes (++) para sinalização multifocais com até 25% de acometimento do tecido avaliado; três cruzes (+++) para sinalizações entre 25% e 50% do tecido avaliado, e quatro cruzes (++++) para sinalizações superiores a 50% do tecido. Realizou-se também a classificação quanto a localização das sinalizações, sendo em intestino distribuídas em lâmina própria, cripta intestinal e ápice das vilosidades, e em pulmão classificadas quanto as regiões de parabrônquios e capilares aéreos.

Controle positivo. Como controle positivo para a técnica de FISH foram utilizadas amostras histológicas de fígado de *Columba livia* positivas para *Chlamydia* sp. em PCR e FISH, conforme descrito por Piccoli (2020).

2.3 - RESULTADOS

Histopatologia. Das 74 amostras de intestino analisadas em histologia em HE, observou-se quadros de enterite linfocitocitária e/ou granulocítica, e serosite/miosite linfocitocitária. Essas lesões observadas estão evidenciadas no Quadro 1. Em 38/74 (51,3%) das amostras apresentaram algum grau das lesões acima citadas.

Das amostras de baço, em 58/74 (78,4%) das amostras analisadas observou-se lesões histopatológicas em diferentes graus. Os quadros observados foram de

esplenite granulomatosa linfocitocitária e/ou granulocítica e perivasculite e/ou vasculite linfocitocitária granulocítica. Focos multifocais leves a moderados de necrose foram observados no parênquima. Além disso, foram observadas formações de granulomas circundados por células gigantes multinucleadas e por infiltrado mononuclear (Figura 1A), conforme demonstrado no Quadro 1.

As amostras de pulmão evidenciaram infiltrado linfocitocitário e/ou granulocítico em região de capilares aéreos, parabronquios e interstício pulmonar (pneumonia) e presença de material necrótico circundado por macrófagos (granuloma) (Figura 1B). Além disso, foi possível observar quadros de perivasculite linfocitocitária em 46/74 (62,2%) das amostras e hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) em 27/74 (36,5%). (Quadro 1).

Hibridização fluorescente *in situ*. Das 74 amostras de intestino analisadas pela técnica de FISH, foram observadas sinalizações positivas em 56 (76%). A maior porcentagem dos cortes histológicos (39,3%) apresentou sinalizações de +, seguida pela distribuição em ++ (33,9%). Em 9/56 (16,%) das amostras, foram observadas sinalizações em +++, e sinalizações ++++ foram observadas em 6/56 (10,7%) das amostras.

No baço, das amostras avaliadas 80% (59/74) foram positivas para *Chlamydia* sp., no parênquima esplênico. Das 59 lâminas positivas, 30,5% (18/59) foram classificadas em +; 37,3% (22/59) foram classificadas com ++; Em 23,7% (14/59) das amostras foram observadas sinalizações em +++ e 8,5% (5/59) apresentaram sinalização em ++++.

Já das 74 amostras pulmonares, 65/74 (88%) destas apresentaram positividade pela técnica, sendo 18,5% (12/65) com sinalização em +; sinalizações em ++ foram observadas em 50,8% (33/65); 18,5% (12/65) apresentaram sinalizações em +++ e 12,3% (8/65) apresentaram sinalização em ++++. Dentre os positivos, 54/65

(83%) localizavam-se somente em capilares aéreos e 11/65 (17%) em capilares aéreos e parabrônquios. A intensidade de lesões em intestino, baço e pulmão pode ser observada no Quadro 2.

Além disso, dos indivíduos avaliados 60,8% (45/74) apresentaram sinalizações positivas nos três órgãos, em diferentes classificações de intensidade e distribuição.

2.4 - DISCUSSÃO

Em virtude da significância clínica da clamidiose aviária, esforços para estabelecimento de técnicas diagnósticas efetivas ainda são necessários. Os resultados da técnica de FISH utilizada no presente trabalho demonstram a aplicabilidade da técnica para diagnóstico de *Chlamydia* sp. em cortes de baço, pulmão e intestino de aves, compatíveis com os resultados demonstrados por Piccoli (2020), que primeiramente utilizou a técnica em espécies aviárias.

A elevada positividade apresentada neste trabalho, 80% em baço, 76% em intestino e 88% em pulmão, são similares aos observados por Piccoli (2020), de 67% de positividade ao empregar a mesma técnica de FISH em amostras hepáticas. Entretanto, o presente trabalho apresenta positividade relativamente alta quando comparado com as investigações por técnica de PCR em excretas de pombos de vida livre realizadas por Leal et al (2015) e Burt et al (2018), que apresentaram positividade de 11,7% e 33,3% respectivamente, isto pode ser justificado pelo fato de ambos os trabalhos apresentarem como metodologia a investigação ativa em animais assintomáticos, e ainda a obtenção de amostras únicas de excretas, não atingindo a janela de eliminação intermitente do agente ou portadores assintomáticos, evidenciado neste trabalho pela observação de sinalizações positivas sem a presença de lesão tecidual associada.

O fenômeno de autofluorescência foi observado em todos os tecidos deste trabalho, confirmando ao relatado por Moter e Göbel (2000), que correlaciona esse

fenômeno a células sanguíneas e tecidos ricos em elastina e colágeno. Entretanto as sinalizações positivas foram facilmente diferenciadas da autofluorescência gerada, por meio da reavaliação da região em filtro de excitação com intensidade inferior, o que permite que amostras positivas em filtro adequado, cessem sua emissão de luz.

A disseminação sistêmica da *Chlamydia* sp. após a infecção oral é demonstrada pela positividade alta em órgãos de diferentes sistemas, principalmente baço, fígado, pulmão e intestino, esse em sua maior proporção em segmentos de ceco. Isso pôde ser evidenciado por Thierry *et al.* (2016) em avaliação histológica e imuno-histoquímica destes tecidos após a inoculação do agente em patos. Isto pode justificar a elevada positividade simultânea (60%) nos três órgãos avaliados no presente trabalho.

Ainda pode-se correlacionar a alta positividade pela técnica de FISH em pulmão e intestinos com o fato de estes serem os principais epitélios de eliminação do agente, assim como pode ser observado por Ornelas-Eusebio *et al.* (2016) pela identificação de *C. psittaci* por *nested*-PCR em suabes cloacais (75%) e de coanas (50%) de aves envolvidas em surto de mortalidade de psitacídeos ameaçados de extinção. Estas vias de eliminação também podem ser comprovadas pela investigação de diagnóstico *in vivo* como demonstrado por Raso *et al.* (2006) e Leal *et al.* (2015) e Kabeya *et al.* (2015).

Apesar da elevada positividade pela técnica de FISH em intestino, somente 52% (29/56) apresentaram consecutivamente lesões intestinais na histologia, isso se deve fato de as clamídias estarem bem adaptadas ao trato gastrointestinal pois estão presentes nesse sistema em praticamente todos os hospedeiros naturais, onde podem persistir por um longo período sem qualquer inflamação ou patologia evidente (Thierry *et al.*, 2016).

Ou seja, a ausência de lesões histopatológicas pode ser associada aos quadros de infecções assintomáticas, característica observada também em baço e pulmão. Esse fato ressalta a eficiência da técnica de FISH, que permite não só a identificação portadores, mas também animais doentes, uma vez que podemos detectar a presença do agente espacialmente no tecido, e correlacionar este com as lesões histológicas observadas.

Apesar da alta incidência de lesões histológicas sugestivas, elas são classificadas como não específicas, podendo ser observadas em diversos processos patológicos, não sendo recomendadas como método diagnóstico para *C. psittaci* quando usadas isoladamente. No presente trabalho isso foi evidenciado pela presença de lesões histológicas em pulmão, baço e intestino, acompanhadas da ausência de sinalizações na técnica de FISH.

A utilização de FISH é uma alternativa de diagnóstico útil na detecção e identificação de bactérias de crescimento lento ou de cultura difícil, possível de ser utilizada em muitos agentes como *Helicobacter pylori* (Rüssmann *et al.*, 2001), *Legionella* sp. (Whiley *et al.*, 2011) e *Brachyspira* sp. (Wilberts *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2021).

A principal vantagem da técnica de FISH é a possibilidade de se associar os resultados positivos espacialmente no tecido avaliado, e assim sua relatividade com as lesões observadas tanto macro quanto microscopicamente, permitindo identificar, quantificar e determinar localização dos agentes nos tecidos (Moter & Göbel, 2000; Poppert *et al.*, 2002). Além disso, a técnica apresenta-se mais rápida para detecção direta do agente quando comparada ao cultivo celular e dispensa processos de extração prévio quando comparada ao PCR (Frickmann *et al.*, 2017; Moter & Göbel, 2000).

Ao se comparar a técnica de FISH com as avaliações imuno-histoquímicas, Neves & Guedes (2012) ressaltam que o FISH apresenta maior vantagem pela maior sensibilidade e especificidade, além da maior facilidade para se sintetizar sondas específicas do que na aquisição de anticorpos monoclonais e policlonais, além do fato que a intensidade de marcação imuno-histoquímica por ser afetada pelo tempo de fixação da amostra em formol.

O presente trabalho evidenciou a presença de pombos-comuns, provenientes de área urbana com elevada circulação de pessoas, com alta positividade para *Chlamydia* sp., ressaltando a importância desse patógeno no que se refere à saúde pública, uma vez que os resultados observados evidenciam a circulação do agente em ambiente urbano tendo os Columbiformes como dispersores. Leal e colaboradores (2015) evidenciam também a importância da atuação dos pombos na disseminação do agente para outras aves silvestres, ao se verificar pombos infectados por *Chlamydia* sp. em zoológicos e um centro de triagem de animais silvestres (CETAS), representando importância para conservação de espécies ameaçadas.

A utilização da hibridização fluorescente *in situ* para diagnóstico de *Chlamydia* sp. se mostrou uma técnica possível de ser empregada em cortes histológicos de baço, pulmão e intestino de pombos-comuns, evidenciando sua aplicabilidade no diagnóstico rotineiro deste agente em amostras *in situ*.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. ABDUL-AZIZ, T.; FLETCHER, O.; BARNES, H.J. (2008). 2. Hepatobiliary system. In: O. Fletcher (Ed.); *Avian Histopathology*. 1st ed., (p.202–237), Omni Press, Madison.

2. BACHMANN, N. L.; POLKINGHORNE, A.; TIMMS, P.; (2014) Chlamydia genomics: Providing novel insights into chlamydial biology. *Trends in Microbiology*, 22, 464-472.
3. BALSAMO, G.; MAXTED, A. M.; MIDLA, J. W.; MURPHY, J.M.; WOHRLE, R.; EDLING, T.M; FISH, P.H.; FLAMMER, K.; HYDE, D.; KOBAYASHI, M.; OIULFSTAD, B.; RITCHIE, B.W.; STOBIERSKI, M.G.; EHNERT, K.; TULLY Jr, T.N. (2017) Compendium of measures to control *Chlamydia psittaci* infection among humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 31, n. 3, 262–282.
4. BAYRAMOVA, F.; JACQUIER, N.; GREUB, G. (2018) Insight in the biology of Chlamydia-related bacteria. *Microbes and Infection*, 20, 432-440.
5. Borel, N.; Polkinghorne, A.; Pospischil, A. (2018) A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? *Veterinary Pathology*, 55, 374-390.
6. Burnard, D.; Polkinghorne, A. (2016) Chlamydial infections in wildlife–conservation threats and/or reservoirs of ‘spill-over’ infections? *Veterinary Microbiology*, 196, 78-84.
7. Burt, S. A.; Roring, R. E.; Heijne, M. (2018) *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.
8. Cadario, M. E.; Frutos, M. C.; Arias, M. B.; Origlia, J.A.; Zelaya, V.; Mariaga, M.J.; Lara, C.S.; Ré, V.; Cuffini, C.G.; (2017). Epidemiological and molecular characteristics of *Chlamydia psittaci* from 8 human cases of psittacosis and 4 related birds in Argentina. *Revista Argentina de Microbiologia*, v. 49, n. 4, p. 323–327,
9. Casagrande, R. A; Machado, V. R.; De Souza, S. O.; Watanabe, T.T.N.; Sonne, L.; Pavarini, S.P.; Driemeier, D.; (2014) Diagnóstico imuno-histoquímico e caracterização anatomopatológica de clamidiose em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 9, p. 885–889,
10. Chen, W.-T.; Teng, C.-A.; Shih, C.-H.; Huang., W-H.; Jiang, Y-F.; Chang, H-W.; Jeng, C-R.; Lai, Y-H.; Guo, J-C.; Wang, P-J.; Cheng, C-H & Chang, Y-C; (2021) Investigation of Lethal Concurrent Outbreak of Chlamydiosis and Pigeon Circovirus in a Zoo. *Animals*, 11, 1654

11. Cheong, H.C.; Lee, C.Y.Q.; Cheok, Y.Y.; Tan, G.M.Y; Looi, C.Y; Wong, W. F.;(2019) Chlamydiaceae: Diseases in primary hosts and zoonosis. *Microorganisms*, 7, 146.
12. Dai, C.; Chen, Y.; Zheng, Q.; (2021). The Social and Cultural Importance of Keeping Wild Birds as Pets in an Ethnic Community in Guiyang City, China. *Human Ecology*, v. 49, p. 69–79.
13. De Matos, M. R.; Grzegozevski, A. P.; Da Cruz, A.; Cheng, A.C; Gerelli, A; Fusco, C; Gruchouskei, L; Viott, A. de M;(2021) Identification of *Brachyspira* spp. In the cecum of broiler chickens using histology and in situ diagnostic assays. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 42, n. 5, p. 2813–2824
14. Ebrahimi, M.; Fadii, A.; Mardani, M.; Aghazade, K; Divsalar, F & Minoeifar, J; (2019) Difficulties in diagnosis of psittacosis or ornithosis: A case report. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, 2019.
15. Ecco, R.; Preis, I. S.; Martins, S. N. R.; Vilela, R.D. A.; Shivaprasad, H. L. (2009) An Outbreak of Chlamydiosis in Captive Psittacines. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2, 85-90.
16. Ferreira, V. L.; Dias, R. A.; Raso, T. F. (2016) Screening of feral pigeons (*Columba livia*) for pathogens of veterinary and medical importance. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 18, n. 4, p. 701–704,
17. Franks, A.H.; Harmsen, H.J.M.; Raangs, G.C.; Jansen, G.J; Schut, F; Welling, G. W;(1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 9, p. 3336–3345,
18. Frickmann, H.; Zautner, A. E.; Moter, A.; Kikhney, J; Hangen, R; Stender, H; Poppert, S; (2017) Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43, 263-293.
19. Harkinezhad, T.; Geens, T.; Vanrompay, D.(2009a) *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary Microbiology*, v. 135, n. 1–2, p. 68–77.
20. Hewinson, I.G.; Griffiths, P.C.; Bevan, B.J.:(1997) Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 54, 155-166.

21. Kabeya, H.; Sato, S.; Maruyama, S.; (2015) Prevalence and characterization of Chlamydia DNA in zoo animals in Japan. *Microbiology and Immunology*, v. 59, n. 9, p. 507–515.
22. Lagae, S.; Kalmar, I.; Laroucau, K.; Vorimore, F.; Vanrompay, D. (2014) Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *Journal of Medical Microbiology*, v. 63, p. 399–407.
23. Laroucau Karinelaroucau, K.; Aaziz, R.; Meurice, L.; Servas, V; Chossa, T, I; Royer, H; Barbeyrac, De; Vaillant, V. Mayen, J.L; Meziani, F. Sachse, K & Rolland, P. (2003) Outbreak of psittacosis in a group of women exposed to *Chlamydia psittaci* infected chickens. *Euro surveill.* 20, 21155.
24. Leal, D. C.; Negrão, V. B.; Santos, 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. 3, 771–776.
25. Ling, Y; Chen, H; Chen, X; Yang, X; Yang, J; Bavoil, P. M; He, C (2015). Epidemiology of *Chlamydia psittaci* Infection in Racing Pigeons and Pigeon Fanciers in Beijing, China. *Zoonoses and Public Health*, 62, 401-406.
26. Longbottom, D.; Coulter, L. J. (2003) Animal chlamydiosis and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, 128, 217-244.
27. Lopes, L.; (2014). Detecção molecular de *Chlamydophila psittaci* em Columbiformes e Galliformes na Região Centro Sul do Estado de Goiás. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4057> . Acesso em: 10/1/2022.
28. Magnino, S; Haag-Wackernagel, D; Geigenfeind, I; Helmecke, S; Dovc, A; Prukner-Radovic, E; Residbegovic, E; Ilieski, V; Laroucau, K; Donati, M; Martinov, S; Kaleta, E. F;(2009). Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Veterinary Microbiology*, 136, 54-67.
29. Miyairi, I.; Laxton, J. D.; Wang, X.; Obert, C.A; Tatireddigari, V.R.R.A; Rooijen, N. Von; Hatch, T.P; Byrne, G. I; (2011) *Chlamydia psittaci* Genetic Variants Differ in Virulence by Modulation of Host Immunity. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 4, p. 654–663.
30. Moter, A.; Göbel, U. B. (200) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 41, n. 2, p. 85–112.

31. Neves, S. M. N.; Guedes, R. M. C. (2012) Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 79, n. 4, p. 627–632.
32. Ornelas-Eusebio, E.; Sánchez-Godoy, A. F. D.; Chávez-Maya, A. F.; Garza-García, J.A.D. La; HERNANDEZ-CASTRO, R; GARCÍA-ESPINOSA, G. (2016). Case Report-First Identification of *Chlamydia psittaci* in the Acute Illness and Death of Endemic and Endangered Psittacine Birds in Mexico. *Avian Diseases*, v. 60, p. 540–544,
33. Panzetta, M. E.; Valdivia, R. H.; Saka, H. A. (2018) Chlamydia persistence: A survival strategy to evade antimicrobial effects in-vitro and in-vivo. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3101.
34. Piccoli, R. J. (2020) Uso de hibridização fluorescente in situ (FISH) na identificação de *Chlamydia* sp. em tecido hepático de aves silvestres nativas e exóticas. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/68779>>. Acesso em: 7/1/2022.
35. Poppert, S.; Essig, A.; Marre, R.; Wagner, M.; Horn, M. (2002) Detection and differentiation of Chlamydiae by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 8, p. 4081–4089.
36. Proença, L. M.; Fagliari, J. J.; Raso, T. De F. (2011) Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Ciência Rural*, v. 41, n. 5, p. 841–847.
37. Raso, T. F de; Seixas, G. H. F.; Guedes, N. M. R.; Pinto, A. A. (2006) *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 117, n. 2–4, p. 235–241.
38. Raso, T. F.; Carrasco, A. O. T.; Silva, J. C. R.; Marvulo, M. F. V.; Pinto, A. A. (2010a) Seroprevalence of antibodies to *Chlamydophila psittaci* in zoo workers in Brazil. *Zoonoses and Public Health*, v. 57, n. 6, p. 411–416.
39. Reavill, D. R.; Dorrestein, G. (2018) Psittacines, Coliiformes, Musophagiformes, Cuculiformes. In: K. A. Terio; D. McAloose; J. st. Leger (Eds.); *Pathology of Wildlife and Zoo Animals*. 1st ed., p.775–788.
40. Rüssmann, H.; Kempf, V. A. J.; Koletzko, S.; Heesemann, J.; Autenrieth, I; (2001). Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 304–308.

41. Sachse, K.; Hotzel, H. (2003) Detection and Differentiation of Chlamydiae by Nested PCR. In: Sachse K.; J. Frey (Eds.); *PCR Detection of Microbial Pathogens*. 1st ed., p.123–136.
42. Sachse, K.; Laroucau, K.; Vanrompay, D.; (2015) Avian Chlamydiosis. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2, 10-21.
43. Sachse, K.; Vretou, E.; Livingstone, M.; Borel, N.; Pospischil; Longbottom, D.;(2009) Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, v. 135, p. 2–21.
44. Schnee, C.; Vanrompay, D.; Laroucau, K.; (2019) Avian chlamydiosis. In: World Organization for Animal Health (OIE) (ed.), *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, 783–795.
45. Shaw, K.A; Szablewski, C.M; Kellner, S.; Kornegay, L; Bair, P; Brennan, S; Kunkes, A; Davis, M; MCGovern, O. L.; Winchell, J; Kobayashi, M; Burton, N; Perio, M.A. De; Gabel, J; Drenzek, C; Murphy, J; Holsinger, C; Forlano, L; (2016). Psittacosis Outbreak among Workers at Chicken Slaughter Plants, Virginia and Georgia, USA, 2018. *Emerging Infectious Diseases*, v. 94, p. 52–60.
46. Sukon, P.; Nam, N. H.; Kittipreeya, P.; Sara-In, A.; Wawilai, P.; Inchuai, R.; Weerakhun; (2021) Global prevalence of chlamydial infections in birds: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 192, 105370
47. Terzian, A.C.B.; Zuccari, D.A.P.C.; Pereira, R.S.; Pavam, M.V.; Ruiz, C.M.; Sueiro, F.A.R.; Coelho, J.; (2007). Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 44, 96-102.
48. Thierry, S.; Vorimore, F.; Rossignol, C.; Scharf, S; Sachse, K; Berthon, P; Durand, B; Virlogeux-Payant, I; Borel, N; Laroucau, K; (2016) Oral Uptake of *Chlamydia psittaci* by Ducklings Results in Systemic Dissemination. *PLoS ONE*, 11(5).
49. Tolosa, E. M. C. De.; Rodrigues, C. Junqueira.; Behmer, O. Arruda.; Freitas Neto, A. G. De. (2003). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. 2. ed.
50. Uhlmann, V.; Silva, I.; Luttich, K.; Picton, S.; O’leary, J. J.; (1998) In cell amplification. *Journal of Clinical Pathology*, v. 51, p. 119–130.

51. Van Buuren, C. E.; Dorrestein, G. M.; Van Dijk, J. E.; (2011) *Chlamydia psittaci* infections in birds: A review on the pathogenesis and histopathological features. *Veterinary Quarterly*, 16, 38-41.
52. Vanrompay, D; (2020) Avian Chlamydiosis. In: D. E. Swayne (Ed.); *Diseases of Poultry*. 14th ed., p.1086–1107.
53. Vázquez, B.; Esperón, F.; Neves, E.; López, J.; Bellesteros, C; Muñoz, M.J.; (2010) Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 45.
54. Waar, K.; Degener, J. E.; Van Luyn, M. J.; Harmsen, H. J. M; (2005) Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, v. 54, n. 10, p. 937–944.
55. Whiley, H.; Taylor, M.; Bentham, R.; (2011) Detection of *Legionella* species in potting mixes using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Journal of Microbiological Methods*, v. 86, n. 3, p. 304–309.
56. Wilberts, B. L.; Warneke, H. L.; Bower, L. P.; Kinyon, J. M.; Burrough, E. R.; (2015a) Comparison of culture, polymerase chain reaction, and fluorescent in situ hybridization for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and “*Brachyspira hamptonii*” in pig feces. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 27, n. 1, p. 41–46.
57. Yin, L.; Kalmar, I. D.; Lagae, S.; Vandendriessche, S; Vanderhaeghen, W; Buraye, P; Cox, E; Vanrompay, D; (2013) Emerging *Chlamydia psittaci* infections in the chicken industry and pathology of *Chlamydia psittaci* genotype B and D strains in specific pathogen free chickens. *Veterinary Microbiology*, v. 162, n. 2–4, p. 740–749.

Tabela 1 – Distribuição e intensidade de lesão histológicas em amostras de baço, pulmão e intestino de *Columba livia*, coradas em hematoxilina e eosina.

| ÓRGÃO | LESÃO | INTENSIDADE | | | TOTAL |
|-----------|---------------------|---------------|---------------|-------------|-------|
| | | LEVE | MODERADA | ACENTUADA | |
| BAÇO | Esplenite | 25/53 (47,2%) | 27/53 (50,9%) | 1/53 (1,9%) | 53 |
| | Perivasculite | 8/32 (25%) | 24/32 (75%) | 0 | 32 |
| | Vasculite | 8/29 (27,6%) | 21/29 (72,4%) | 0 | 29 |
| | Necrose | 17/19 (89,5%) | 2/19 (10,5%) | 0 | 19 |
| INTESTINO | Enterite | 26/30 (86,7%) | 4/30 (13,3%) | 0 | 30 |
| | Serosite | 9/14 (68,3%) | 5/14 (35,7%) | 0 | 14 |
| | Miosite | 3/5 (60%) | 2/5 (30%) | 0 | 5 |
| PULMÃO | Granuloma | 7/7 (100%) | 0 | 0 | 7 |
| | Hiperplasia de BALT | 25/27 (92,6%) | 2/27 (7,4%) | 0 | 27 |
| | Pneumonia | 30/32 (93,7%) | 2/32 (6,2%) | 0 | 32 |
| | Perivasculite | 42/46 (91,3%) | 4/46 (8,7%) | 0 | 46 |

Tabela 2 – Frequência de sinalizações positivas em técnica de FISH para detecção de *Chlamydia* sp. em baço, intestino e pulmão de *Columba livia*

| Intensidade de sinalização | + | ++ | +++ | ++++ | Total |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-------|
| BAÇO (%) | 18/59 (30,5%) | 22/59 (37,3%) | 14/59 (23,7%) | 5/59 (8,5%) | 59 |
| INTESTINO (%) | 22/56 (39,3%) | 19/56 (34%) | 9/56 (16%) | 6/56 (10,7%) | 56 |
| PULMÃO (%) | 12/65 (18,5%) | 33/65 (50,8%) | 12/65 (18,5%) | 8/65 (12,3%) | 65 |

FIGURA 1- Fotomicrografia de alteração histológica em amostras de pombo-comum (*Columba livia*). (A) Granuloma em baço evidenciado por material necrótico circundado por células gigantes multinucleadas e infiltrado mononuclear (HE, 40X). (B) Pneumonia caracterizada por material necrótico circundado por células gigantes multinucleadas em interstício pulmonar (HE, 60X).

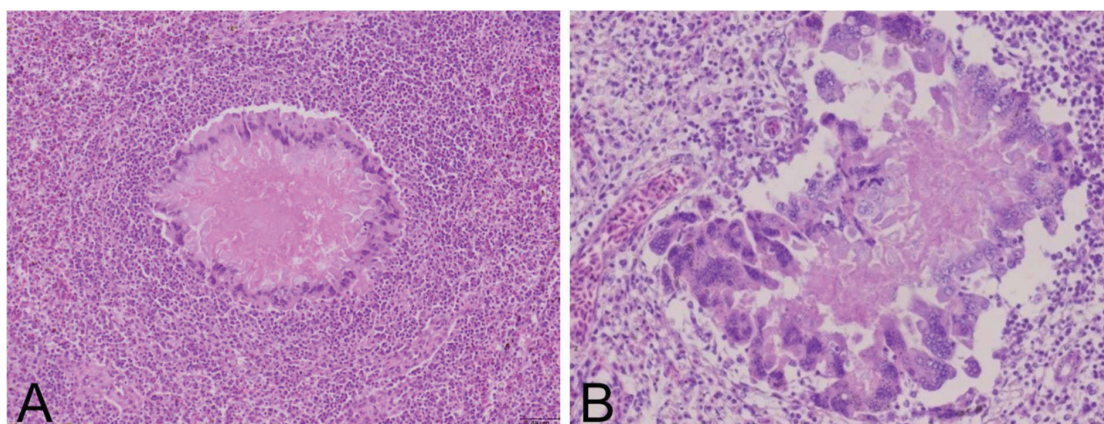
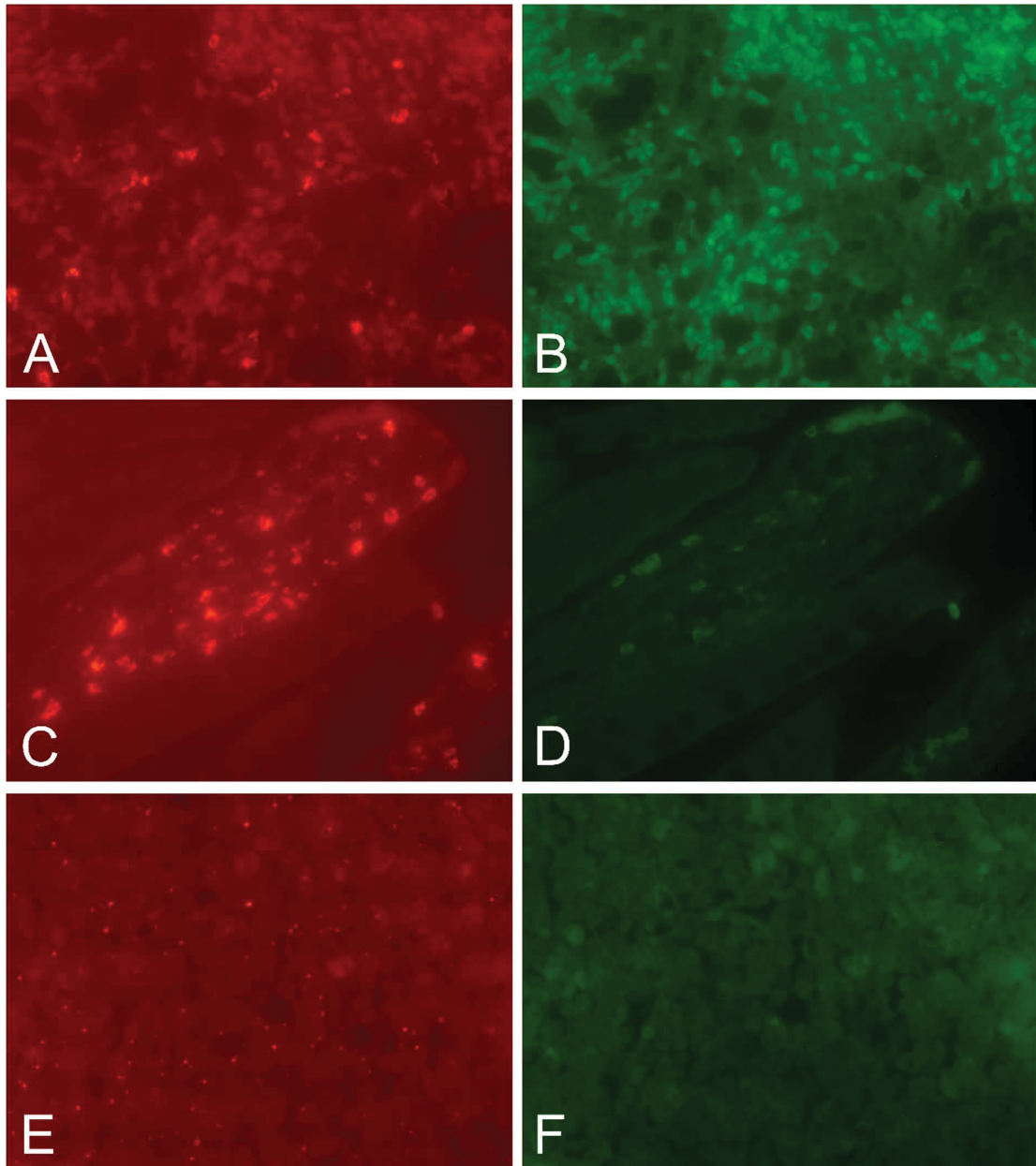


FIGURA 2 - Fotomicrografia de sinalizações positivas em técnica de FISH para *Chlamydia* sp. e teste de contraprova em teciduais de Pombo-comum (*Columba livia*). (A) Sinalizações positivas em região de capilares aéreos e sanguíneos de pulmão. (C) Sinalizações positivas em lâmina própria e ápice de vilosidade intestinal. (D) Sinalizações positivas em parênquima esplênico. (40x, excitação em filtro de 555nm). B, D e F ausência de sinalização em contraprova utilizando filtro de excitação de 450 -550nm em tecidos correspondentes a, C e D.



APÊNDICE A – PROTOCOLO FISH TECIDOS

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: Desparafinização e reidratação dos 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 luz¹, 3,3 microlitros da sonda com 10ng em 496,7 microlitros de água ultrapura, obtendo a concentração de 2ng por 100 microlitros;

OBS: A sonda é sensível a luz, logo, dessa fase em diante deve-se trabalhar com luminosidade reduzida ou com ausência de fontes luminosas.

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 acrescentadas as lâminas, porém, antes dessa etapa deve-se instilar uma gota de meio de montagem próprio para microscopia de fluorescência;

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

APÊNDICE B – PROTOCOLO FISH EXCRETAS

Passo 1: Misturar excretas uniformemente por 2 min;

Passo 2: Pesar 0,5 g de excretas e transferir para tubo de 15 ml identificado;

Passo 3: Acrescentar 4,5 ml de PBS;

Passo 4: Homogeneizar em Vórtex por 3 min;

Passo 5: Centrifugar 700 g por 1 minuto;

Passo 6: Transferir o sobrenadante para outro tubo e diluir na proporção 1:3 em Paraformaldeído 4% em PBS;

Passo 7: Manter amostras *overnight* (mínimo de 16 horas) a 4° C;

Passo 8: Centrifugar amostra 2100 rpm por 2 minutos;

Passo 9: Desprezar sobrenadante e ressuspender *pallet* em 1 ml de PBS;

Passo 10: Centrifugar amostra a 12000 rpm por 2 minutos;

Passo 11: Desprezar sobrenadante e ressuspender *pallet* em 1 ml de PBS;

Passo 12: Centrifugar amostra a 12000 rpm por 2 minutos;

Passo 13: Desprezar sobrenadante e ressuspender *Pallet* em 1 ml de solução Etano: PBS (1:1), e armazenar amostra a -20° C;

Passo 14: Em lâminas histológicas silanizadas, realizada marcação hidrofóbica circular de 2cm de diâmetro;

Passo 15: Instilar 15 microlitros de amostra fixadas ao centro da marcação hidrofóbica, e fixar lâminas em bandeja de incubação úmida;

Passo 16: Secar lâminas em temperatura ambiente;

Passo 17: Pipetar 80 microlitros de solução tampão hibridizadora no interior da marcação hidrofóbica;

Passo 18: Diluir, em ausência de luz, 3,3 microlitros da sonda com 10ng em 496,7 microlitros de água ultrapura, obtendo a concentração de 2ng por 100 microlitros;

OBS: A sonda é sensível a luz, logo, dessa fase em diante deve-se trabalhar com luminosidade reduzida ou com ausência de fontes luminosas.

Passo 19: Pipetar 100 microlitros de sonda no interior da circunferência hidrofóbica;

Passo 20: Tampar o suporte e incubar *overnight* (mínimo de 16 horas) à 37°C;

Passo 21: Após a incubação, escorrer lâminas para retirada do excesso de sonda, e realizar lavagem pipetando 100 microlitros de solução de lavagem aquecida a 37° C por 20 minutos;

Passo 22: Escorrer lâmina e pipetar 100 microlitros de água destilada, para retirada do excesso de sonda;

Passo 23: Secar as lâminas em estufa a 45°C até desaparecer toda a água, por tempo aproximadamente de 10 min;

Passo 24: Montar as lâminas. Após a limpeza das lamínulas essas devem ser acrescentadas as lâminas, porém, antes dessa etapa deve-se instilar uma gota de meio de montagem próprio para microscopia de fluorescência;

Passo 25: Fazer a leitura em microscópio de fluorescência, no aumento de 40X. Quando não conseguir foco, verificar se a lâmina não está suja com o meio de montagem.

APÊNDICE C – TAMPÃO HIBRIDIZADOR

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 à 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 D – 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 à solução de NaCl na proveta de 500 ml;

Passo 5: Completar com água destilada até 500 ml.

A solução 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 coautores 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. 70

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 online 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).

ANEXO B – CERTIFICAÇÃO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR PALOTINA UFPR (CEUA-PALOTINA)

Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Comissão de Ética no Uso de Animais



Certificado

Certificamos que o **Protocolo nº 25/2020** referente ao projeto de pesquisa **Uso da hibridização fluorescente in situ (FISH) para detecção de Chlamydia sp. em amostras de tecidos e fezes de pombo-comum (Columba livia) e fezes de aves silvestres** sob responsabilidade da **Profa. Aline de Marco Viott** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em **17/09/2020**.

O Docente responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:

- informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo;
- informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras

Palotina, 17 de setembro de 2020

Certificate

*Certify that the **Protocol n. 25/2020** regarding the research project **Use of fluorescent hybridization in situ (FISH) of Chlamydia sp. on tissue and faces of common pigeons (Columba livia) and wild birds faces of Aline de Marco Viott** is according to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the National Council for Animal Experiments Control (CONCEA) and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPR – Setor Palotina (CEUA / Palotina) in **September 17, 2020**.*

Palotina, September 17, 2020.

Prof. Geraldo Camilo Alberton
Coordenador/Coordinator
CEUA/Palotina - UFPR