UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FRANCIELLE GIBSON DA SILVA ZACARIAS

Diagnóstico molecular e sorológico de *Chlamydophila* spp em amostras biológicas de animais experimentalmente e naturalmente infectados

Londrina
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FRANCIELLE GIBSON DA SILVA ZACARIAS

Diagnóstico molecular e sorológico de *Chlamydophila* spp em amostras biológicas de animais experimentalmente e naturalmente infectados

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas

Londrina
2007

Diagnóstico molecular e sorológico de *Chlamydophila* spp em amostras biológicas de animais experimentalmente e naturalmente infectados

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr.Ernst Eckehardt Müller
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 31 de julho de 2007

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Leptospirose Animal, Virologia Animal e de Microbiologia e Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

1. **CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**

2. **FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Paulino e Marize,
minhas irmãs Gisele e Mariele, meu sobrinho Pedro e à Brenda, nossa irmãzinha, pela compreensão e amor incondicional.

À minha nova família, meu marido Ademir e meus filhotes caninos e felinos, Margot, Malu, Fiapo e Frida, pelo amor a mim dedicado, companheirismo e por ter tornado essa jornada bem mais prazerosa.

A família Luize, fundamentais na formação do meu caráter e que me "adotou" de coração.

A toda família Silva e Rosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus...

Ao professor e orientador Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas pelo exemplo de profissionalismo e dedicação nestes 10 anos de convivência, compartilhando seus conhecimentos e amizade. Obrigada pela paciência e pelo carinho.

Ao professor Dr. Amauri A. Alfieri pelo voto de confiança, ensinamentos e palavras de encorajamento.

Ao professor Dr. Carlo Turilli por ter tornado esta tese possível.

Ao professor Dr. Ernst E. Muller pelo carinho e bom humor em todos estes anos, pelas contribuições na qualificação e também pelo " empréstimo" dos soros de bovinos.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Prof. Dr. João Luis Garcia e Prof. Dr[a] Alice Fernandes Alfieri pelas valiosas contribuições.

À professora Dr[a] Roberta Lemos Freire pela amizade e prontidão em me ajudar sempre que necessário, além de sua contribuição "estatística".

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná pela concessão de Bolsa de Doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica.

Ao pessoal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG).

À técnica e amiga Lucimara A. Alves pelo carinho, cumplicidade, colo nos momentos difíceis e principalmente pelas risadas nestes 10 anos de excelente convivência.

Aos técnicos e amigos Luciene G. Pretto Garcia, José Aldevino e Kerlei Cristina Médici principalmente pelo carinho, disponibilidade e auxílio técnico fundamentais para a realização desta tese.

Aos técnicos de laboratório Ademir, Hélio, Cristina, Dalíria e Maria pela ajuda incondicional.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial, aos secretários Valdecir, Reinaldo, Nelson e Helenice pela paciência e trâmites burocráticos.

Aos queridos amigos, mestrandos, Bruna e Kledir, meus cúmplices, imprescindíveis para a realização desta tese e que tornaram estes anos muito mais agradáveis e divertidos.

À amiga Juliana (Ju Dias) pelas ajuda na amostragem dos soros de bovinos, por toda a análise estatística dos resultados dos mesmos, mas principalmente pelo carinho.

Às amigas Eleine e Vanessa, tão especiais e queridas, que fizeram muita falta nesta reta final. Muito obrigada pela amizade e carinho, mesmo que à distância.

Aos amigos Betinha, Flora, Marlise e Fábio pela amizade, paciência e doação de tantos ensinamentos, essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Aos amigos Gisele, Fernando, Mariana, Estevan (Capi), Wanessa, Thales, Mauro, Rodrigo, Éder e Yurika pelo apoio, acolhimento e boas risadas. A todos os colegas da Falm (UENP-Bandeirantes), muito obrigada!

Agradeço também os queridos amigos, Daniela, Walfrido, Danilo, Vanessa (Carioca), Daniel (Frango), Michele, Aline, Kátia, Michelle, Valéria.

E a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

SILVA-ZACARIAS, F. G. **Diagnóstico molecular e sorológico de C*hlamydophila* spp em amostras biológicas de animais experimentalmente e naturalmente infectados.** 2007. 80f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

Chlamydophila abortus (anteriormente classificada como *Chlamydia psittaci* sorotipo 1) tem sido descrita em muitos países, associada principalmente com distúrbios reprodutivos em ovinos, bovinos e caprinos. A detecção de *C. abortus* é usualmente realizada por métodos sorológicos (fixação de complemento, ELISA) e de cultivo em células de linhagens ou ovo embrionado de galinha. O diagnóstico pela amplificação do DNA pela PCR tem sido proposto por apresentar alta sensibilidade e especificidade. Este trabalho teve por objetivo detectar C*hlamydophila* spp por técnicas molecular e sorológica em amostras biológicas de animais experimentalmente e naturalmente infectados. Um sistema de PCR foi desenvolvida para a amplificação do espaço intergênico 16S-23S do RNAr da família *Chlamydiaceae*, em órgãos de camundongos (*n*=15) experimentalmente infectados com a estirpe de referência S26/3 da *C. abortus*. Os resultados encontrados foram comparados a outro sistema de PCR previamente descrito para o gene *Omp*2 (*outer major protein*). Dos 15 camundongos inoculados com *C. abortus*, 13 foram positivos na RNAr PCR e nove na *Omp*2 PCR. O limite de detecção de *C. abortus* pela RNAr PCR (1,05 unidades formadoras de inclusão -UFI) foi cem vezes superior à *Omp*2 PCR (105 UFI). A RNAr PCR também foi utilizada para a detecção da *C. abortus* em uma coleção de abortos bovinos (*n*=85), ovinos (*n*=12) e caprinos (*n*=8), em amostras de muco vaginal de ovelhas (*n*=90) e de cabras (*n*=20) e em sêmen de ovinos (*n*=10) e caprinos (*n*=5), coletados no período de 2002 a 2007. Um controle interno (PCR com os primers BOV1 e BOV2 para o gene ND5 do DNA mitocondrial de bovino) foi utilizado nas amostras de aborto bovino para a avaliação da eficiência das técnicas de extração e de amplificação do DNA. Todas as amostras de aborto, muco vaginal e sêmen foram negativas para *C. abortus* na RNAr PCR. O controle interno amplificou um produto de 626 pb para o gene ND5 em todas as amostras de aborto bovino. Para o diagnóstico sorológico, 3.102 amostras de soro de fêmeas bovinas (idade ≥ 24 meses) provenientes de 373 propriedades, com histórico de abortamento, foram testadas pela prova de fixação de complemento. As propriedades rurais com abortamento foram selecionadas dentro do delineamento amostral do Plano Nacional para o Controle e Erradicação da Brucelose no estado do Paraná. Ao total, 44 (1,42%) animais foram positivos com títulos ≥32. A soroprevalência estimada para *Chlamydophila* spp nas propriedades foi de 8,82% (6,15%-12,17%). A criação de animais confinados ou semiconfinados foi considerada uma associação de risco (OR= 2,21; p= 0,031). Apesar da falta de evidência de *C. abortus* nas amostras de aborto, muco vaginal e sêmen, avaliadas pela PCR neste trabalho, os resultados sorológicos positivos das fêmeas bovinas de propriedades com histórico de abortamento no estado do Paraná sugerem a presença da bactéria. Assim, novos estudos sobre a ocorrência de *Chlamydophila* spp. em rebanhos bovinos, ovinos e caprinos do país devem ser realizados.

Palavras-chave: *Chlamydophila abortus*, aborto, diagnóstico, PCR, fixação de complemento

ABSTRACT

SILVA-ZACARIAS, F. G. **Molecular and serologic diagnosis of C*hlamydophila* spp in samples of experimentally and naturally infected animals.** 2007. 80f. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

Chlamydophila abortus (previously *Chlamydophila psittaci* serotype 1) is reported in many countries, related with reproductive disorders mainly in ovine, bovine and goat. Usually, *C. abortus* detection is carry out by serologic methods (complement fixation test, ELISA) and in cell cultures or embryonated chicken eggs. DNA amplification diagnosis by PCR showed high sensibility and specificity. The aim of this study was to detect *Chlamydophila* spp. by molecular and serologic methods in samples of experimentally and naturally infected animals. A PCR was developed to amplified the 16S-23S rRNA intergenic space of *Chlamydiaceae* in organs of mice experimentally infected with S26/3 strain of *C. abortus* (*n*=15). The results were compared with other PCR, previously described, and based in the *Omp*2 gene (outer major protein) of *Chlamydiaceae* family. Of the 15 mice inoculated with *C. abortus*, 13 had been positive in rRNA PCR and 9 in *Omp*2 PCR. The detection limit of *C. abortus* in rRNA PCR (1,05 UFI) was a hundred times superior to *Omp*2 PCR (105 UFI). This rRNA PCR was also used to detect *C. abortus* in a collection of bovine abortions (*n*=85), sheep (*n*=12) and goat (*n*=8), in samples of ewe (*n*=90) and goat vaginal discharge (*n*=20) and ram (*n*=10) and goat semen (*n*=5), collected between 2002 a 2007. An internal control (PCR with BOV1 and BOV2 primers for gene ND5 of bovine mitochondrial DNA) was used in bovine abortion samples for evaluation of efficiency of DNA extration and PCR. All abortion, vaginal discharge and semen samples were negative in PCR for *C. abortus*. The internal control amplified a product of 626 pb for ND5 gene in all bovine abortion samples. To serologic diagnosis, 3.102 serum samples of cows (age ≥ 24 months), from 373 herds with abortion were analyzed by complement fixation test. These herds were selected inside the sampling design of National Program of Control and Erradication of Brucellosis in Paraná state. Forty four (1.42%) animal were positive with titers ≥ 32. The seroprevalence of *Chlamydophila* spp in the herds was 8.82% (6.15%-12.17%). Confined or semi-confined breeding was a risk association (OR = 2.21, p = 0.031). Although the lack of evidence of *C. abortus* in abortion, vaginal discharge e semen by PCR in this study, positive serologic results in cows from herds with abortions in Paraná state, Brazil suggest the occurrence of the bacterium infection. Thus, more studies should be done about the occurrence of *Chlamydophila* spp. in bovine, ovine and caprine in Brazil.

Key Words: *Chlamydophila abortus*, abortion, diagnosis, PCR, complement fixation

SUMÁRIO

1. ARTIGO PUBLICADO
REVISÃO DE LITERATURA
Chlamydophila abortus em animais de produção 14
2. OBJETIVOS
2.1. Objetivo Geral 21
2.2. Objetivos Específicos 21

3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1. Desenvolvimento e avaliação de um sistema de PCR para a detecção do gene RNAr de *Chlamydophila abortus*.
Resumo 24
Abstract..... 25
Introdução..... 25
Material e Métodos 27
Chlamydophila abortus 27
Camundongos 27
Extração do DNA 27
Reação em cadeia pela polymerase (PCR) 28
Visualização dos produtos amplificados 29
Análise com enzima de restrição (RFLP-PCR)..... 29
Sensibilidade 29
Especificidade 30
Análise estatística..... 30
Resultados 30
Discussão 31
Conclusão 34
Agradecimentos 34
Referências 34

3.2. Utilização da PCR para a detecção de *Chlamydophila abortus* em amostras biológicas de bovinos, ovinos e caprinos.
Resumo 43
Abstract..... 43
Referências..... 48

3.3. Soroprevalência de *Chlamydophila* spp. em propriedades com histórico de abortamento bovino do estado do Paraná, Brasil.
Resumo 52
Abstract..... 52
Introdução..... 53
Material e Métodos 56
População estudada 56
Amostras de soro..... 56
Prova de fixação de complemento..... 57
Análise estatística..... 57
Resultados 58

Discussão 58
Conclusão..... 60
Agradecimento 60
Referências 60

4. CONCLUSÕES 66

APÊNDICES

A. Lista de reagentes 68
B. Soluções e tampões 70
C. Protocolo de técnicas 72

ANEXOS

Normas de publicação do periódico *Ciência Rural* 75
Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal 79

LISTA DE TABELAS

Desenvolvimento e avaliação de um sistema de PCR para a detecção do gene RNAr de *Chlamydophila abortus*.

Tabela 1. Resultados de dois sistemas de PCR realizados em amostras de órgãos de camundongos inoculados com a estirpe S26/3 de *Chlamydophila abortus*, Londrina, 2007.....……..……... 38

Tabela 2. Tamanho esperado dos fragmentos após digestão com a enzima *Alu*I dos produtos amplificados na PCR para o espaço intergênico 16S-23S RNAr da família *Chlamydiaceae*, Londrina, 2007. .....…….……... 39

Soroprevalência de *Chlamydophila* spp. em propriedades rurais com histórico de abortamento bovino do estado do Paraná, Brasil.

Tabela 1. Resultados da prova de fixação de complemento para *Chlamydophila* spp. em propriedades rurais, com histórico de abortamento, de sete circuitos produtores do estado do Paraná-Brasil, 2007….....……... 63

Tabela 2. Associação de variáveis e soroprevalência para *Chlamydophila* spp em propriedades rurais com histórico de abortamento do estado do Paraná-Brasil, 2007. 64

LISTA DE FIGURAS

Desenvolvimento e avaliação de um sistema de PCR para a detecção do gene RNAr de *Chlamydophila abortus*.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos nas técnicas de PCR (RNAr PCR, A e *Omp2* PCR, B) com enzima *Alu*I em *pool* de órgãos de camundongos infectados experimentalmente com *Chlamydophila abortus*. **A)** RNAr PCR (856 pb) canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2, 4, 6, 8 e 10 produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 pós-inoculação, respectivamente; 3, 5, 7, 9 e 11: RFLP dos produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 pós-inoculação, respectivamente. **B)** *Omp*2 PCR (587 pb) canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2: controle positivo (ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*); 3: RFLP do controle positivo; 4, 6 e 8: produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10 e 15 pós-inoculação, respectivamente; 5, 7 e 9: RFLP dos produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10 e 15 pós-inoculação, respectivamente; 10: controle negativo. 40

Figura 2. Limite de detecção da *Chlamydophila abortus* em *pool* de órgãos de aborto bovino pelas técnicas RNAr PCR (856 pb, A) e *Omp2* PCR (587 pb, B). **A)** canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2: controle positivo (ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*); 3: filtrado do *pool* de órgãos de feto bovino contaminado artificialmente com *C. abortus*; 4, 5, 6, 7: diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, respectivamente; coluna 8: controle negativo. **B)** canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2, 3, 4 e 5: diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, respectivamente; coluna 6: controle negativo ..... .41

Utilização da PCR para a detecção de *Chlamydophila abortus* em amostras biológicas de bovinos, ovinos e caprinos.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR, RNAr (856 pb) para *Chlamydophila abortus* e BOV1/2 para o gene ND5 do DNA mitocondrial de bovinos (controle interno, 626 pb) em amostras de aborto bovino. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2: controle positivo (ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*); 3: ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*, negativo para o controle interno; 4, 6, 8 e 10: amostras de aborto bovino negativas para *C. abortus*; 5, 7, 9 e 11: amostras de aborto bovino positivas para o controle interno..... 50

1. REVISÃO DE LITERATURA

Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.1, p.342-348, jan-fev, 2006
ISSN 0103-8478

Chlamydophila abortus em animais de produção

Chlamydophila abortus in production animals

Francielle Gibson da Silva[1] Julio Cesar de Freitas[2*] Ernst Eckehardt Müller[2]

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

*A **Chlamydophila abortus** (anteriormente classificada como **Chlamydia psittaci** sorotipo 1) tem sido descrita em muitos países, associada principalmente com distúrbios reprodutivos em ovinos, bovinos e caprinos. O aborto enzoótico dos ovinos e caprinos e o aborto epizoótico dos bovinos são as doenças mais importantes causadas por esta bactéria. No Brasil, as pesquisas com **C. abortus** são praticamente inexistentes. O objetivo desta revisão é apresentar informações sobre modificações taxonômicas, ciclo de vida, epidemiologia, patogenia, sinais clínicos e diagnóstico da infecção por **C. abortus** principalmente em ovinos, bovinos e caprinos.*

Palavras- chave: ***Chlamydophila abortus**, ovino, bovino, caprino, aborto, problema reprodutivo.*

ABSTRACT

***Chlamydophila abortus** (previously known as **Chlamydia psittaci** serovar 1) has been reported in many countries, associated with reproductive disorders in sheep, cattle, and goats. The enzootic abortion of sheep and goats and the epizootic bovine abortion are the most important diseases produced by this bacterium. In Brazil, there is scarce information about **C. abortus**. The objective of this review is to show information about taxonomic changes, life cycle, epidemiology, pathogenesis, clinical signs and diagnosis of **C. abortus** in sheep, cattle and goats.*

Key words: ***Chlamydophila abortus**, sheep, cattle, goat, abortion, reproductive disorders.*

INTRODUÇÃO

As bactérias da família ***Chlamydiaceae*** são Gram negativas possuem forma cocóide, são intracelulares obrigatórias, com ciclo de vida que se alterna entre formas infectantes (corpos elementares-CE) e vegetativas (corpos reticulados-CR). Estas bactérias infectam várias espécies de animais domésticos e selvagens, além do homem, causando manifestações clínicas bastante variadas (SCHACHTER & CALDWELL, 1980; CORSARO et al., 2003). Dependendo da espécie animal envolvida, pode ocorrer aborto, pneumonia, rinite, conjuntivite, artrite e enterite, entretanto é comum a ocorrência da infecção em animais clinicamente sadios (SHEWEN, 1980; EVERETT, 2000).

Pelas suas características, as bactérias da ordem ***Chlamydiales*** possuem apenas uma família, a ***Chlamydiaceae***. Até recentemente era reconhecido apenas o gênero ***Chlamydia***, com duas espécies, a ***trachomatis*** e a ***psittaci***, com vários sorovares (EVERETT, 2000). Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, principalmente análises do gene 16S e 23S do RNAr, foi possível a divisão da família ***Chlamydiaceae*** em dois gêneros: ***Chlamydia*** e ***Chlamydophila*** e em nove espécies: ***Chlamydia trachomatis, C. suis, C. muridarum, Chlamydophila psittaci, C. pneumoniae, C. pecorum, C. felis, C. caviae*** e ***C. abortus*** (PUDJIATMOKO et al., 1997;

[1]Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná , Brasil.
[2]Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCA, UEL, Londrina, Paraná, Brasil.
*Autor para correspondência: Prof. Dr. Julio Cesar de Freitas, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380, CP 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil. Tel: (43) 3371-4765; Fax: (43) 3371-4714, E-mail: freitasj@uel.br.

Recebido para publicação 16.03.05 Aprovado em 06.09.05

TAKAHASHI et al., 1997; EVERETT, 2000; HERRMANN et al., 2000).

A nova espécie ***Chlamydophila abortus*** (***C. abortus***), anteriormente classificada como ***Chlamydia psittaci*** (***C. psittaci***) sorovar 1, é freqüentemente associada a distúrbios reprodutivos em ovinos, caprinos, bovinos e esporadicamente em suínos e eqüinos (EVERETT, 2000). O aborto enzoótico dos ovinos e caprinos e o aborto epizoótico dos bovinos são as manifestações mais importantes e têm sido documentados por vários autores (NANDA et al., 1992; GRIFFITHS et al., 1995; OGINO et al., 1996; RODOLAKIS et al., 1998; REKIKI et al., 2002; SZEREDI & BACSADI, 2002). O aborto enzoótico dos ovinos foi primeiramente diagnosticado por STAMP et al. (1950) na Escócia e a partir de 1956, em vários países da Europa, enquanto STORZ et al. (1960) realizaram o primeiro isolamento de bactérias da família ***Chlamydiaceae*** a partir de aborto bovino.

Relatos em vários países mostram a atual importância da ***C. abortus*** nos problemas reprodutivos de ovinos e bovinos (WITTENBRINK et al., 1993; DANNATT et al., 1998; REKIKI et al., 2002; AMIM, 2003; LONGBOTTOM & COULTER, 2003). Na Suíça, a prevalência do aborto enzoótico dos ovinos foi estimada em aproximadamente 19% (BOREL et al., 2004) e na Espanha, a soroprevalência foi de 50,5% nos 52 rebanhos estudados (MAINAR-JAIME et al., 1998). Levantamentos epidemiológicos realizados na Índia por NANDA et al. (1992) detectaram 80,7% de bovinos sororreatores para ***C. abortus***, enquanto na Itália PUGLIESE et al. (1991) encontraram 53,7% bovinos positivos utilizando a reação de fixação de complemento.

No Brasil, não há dados sobre a ocorrência de infecção por ***C. abortus*** em ovinos e caprinos. Na espécie bovina, os dados também são praticamente inexistentes, o que dificulta o conhecimento da doença no país. O primeiro trabalho relatando a ocorrência de bactérias da família ***Chlamydiacae*** no país foi realizado em bubalinos do Estado do Pará por FREITAS & MACHADO (1988), que isolaram ***C. psittaci*** de animais abatidos para consumo, com quadro de serosite. A seguir, no Rio de Janeiro, ROMIJN & LIBERAL (1990) também isolaram ***C. psittaci*** de pulmões de bezerros com pneumonia. GOMES et al. (2001), no Rio Grande do Sul, isolaram ***C. psittaci*** a partir de amostras de sêmen de touros com vesiculite seminal, sendo que os animais também apresentaram títulos positivos na fixação de complemento. SOUZA (2002), utilizando fêmeas bovinas com distúrbios reprodutivos do estado de São Paulo, detectou 12,5% de animais positivos na reação de fixação de complemento no único levantamento sorológico para o gênero ***Chlamydophila*** do país.

Apesar da existência de diferentes técnicas de diagnóstico, no Brasil são poucos os laboratórios veterinários de doenças infecciosas que se dedicam à ***C. abortus***, dificultando o desenvolvimento de estudos epidemiológicos direcionados para o conhecimento da verdadeira situação da doença no país. Assim, esta revisão de literatura tem o objetivo de apresentar informações sobre modificações taxonômicas, ciclo de vida, epidemiologia, patogenia, principais sinais clínicos e diagnóstico da infecção por ***C. abortus*** principalmente em ovinos, bovinos e caprinos.

Ciclo de vida

Bactérias da família ***Chlamydiaceae*** possuem um ciclo de vida único, porém dimórfico. O ciclo de replicação ocorre no citoplasma da célula hospedeira infectada e se inicia pela adesão do CE na membrana da célula, seguido por internalização que dá origem a um vacúolo endossomal (VANROMPAY et al., 1995). Um mecanismo ainda desconhecido, impede a fusão de lisossomos primários permitindo a sobrevivência do CE, no interior do endossomo, que com o início da divisão por fissão binária, se diferencia em CR. Após a replicação, estes CR são reorganizados, através de formas intermediárias, em novos CE. Aproximadamente 48 a 72h após infecção *in vitro*, uma inclusão clamidial pode conter centenas de estruturas em vários estágios de desenvolvimento, incluindo CE, CR e formas intermediárias (VANROMPAY et al., 1995; EVERETT, 2000). A liberação dos CE pode ocorrer por lise da célula hospedeira ou por liberação de inclusões clamidiais pela membrana celular, entretanto estes mecanismos não estão bem esclarecidos (VANROMPAY et al., 1995).

Epidemiologia

O aborto enzoótico ovino tem ampla distribuição em regiões criadoras de ovinos (O.I.E., 2005). AITKEN et al. (1990) e LEONARD et al. (1993) consideraram a ***C. abortus*** a maior causa de abortamento em ovelhas na Europa, sendo responsável por 45% dos abortamentos diagnosticados no Reino Unido, onde aproximadamente 1,5 milhão de ovelhas (8,6 % dos rebanhos) são infectadas anualmente. Entretanto, em áreas tradicionais da ovicultura como Austrália e Nova Zelândia, esta enfermidade não é considerada um problema (LONGBOTTOM & COULTER, 2003). O aborto enzoótico caprino é semelhante em severidade ao dos ovinos, porém faltam dados epidemiológicos, não apenas no Brasil, que permitam a compreensão da disseminação e do impacto

econômico decorrente da doença (AITKEN et al., 1990; LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

A ocorrência de surtos de abortamentos em rebanhos leiteiros da Inglaterra despertou o interesse pela pesquisa de ***C. abortus*** em distúrbios reprodutivos (DANIEL et al., 1993). A doença é descrita como aborto epizoótico bovino por suas características epidemiológicas e está disseminada em quase todos os países da Europa e nos Estados Unidos da América (STORZ et al., 1968; SHEWEN, 1980; HOLLIMAN et al., 1994). O conhecimento da ocorrência da doença em um número restrito de países, provavelmente é resultante da falta de pesquisas com ***C. abortus***.

Abortamentos em suínos e eqüinos por ***C. abortus*** têm sido relatados, entretanto acredita-se que ocorram em menor freqüência quando comparado às espécies ovina e bovina (THOMA et al., 1997; LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Os animais podem se infectar com ***C. abortus*** em qualquer idade ou estação do ano (LONGBOTTOM & COULTER, 2003; DeGRAVES et al., 2004). As fontes de infecção mais comuns são os fetos abortados, a placenta e as descargas uterinas. Após o abortamento ou parto, ***C. abortus*** são eliminadas em grande número nos fluidos, nos envoltórios fetais e na placenta e continuam sendo eliminadas até 7-14 dias nas secreções vaginais (LONGBOTTOM & COULTER, 2003). A transmissão pode ser vertical, por infecção congênita do feto, horizontal e por contaminação direta por via alimentar, conjuntival ou genital. A infecção por ingestão de CE é a via de transmissão mais importante (DeGRAVES et al., 2004)

Poucas são as evidências de transmissão sexual de ***C. abortus*** em ovinos, entretanto em carneiros com infecções crônicas a ***C. abortus*** foi isolada do sêmen e glândulas sexuais acessórias (RODOLAKIS; BERNARD, 1977). A ocorrência de vesiculites, epididimites e orquites podem resultar na eliminação de ***C. abortus*** pelo sêmen, causando infertilidade, diretamente pelo desenvolvimento de infecção intrauterina pós-monta ou inseminação artificial ou indiretamente, pela pioespermia que leva à diminuição da qualidade do sêmen (STORZ et al., 1968; LONGBOTTOM & COULTER, 2003). Em bovinos, trabalhos experimentais demonstraram a participação da via sexual na epidemiologia da doença, resultando em redução dos índices de fertilidade (BOWEN et al., 1978; PAPP; SHEWEN, 1996; JONES, 1999). DeGRAVES et al. (2004) demonstraram que novilhas que receberam ***C. abortus*** diretamente no útero apresentaram um risco 8,5 vezes maior de desenvolver infertilidade quando comparado às fêmeas que não foram expostas à bactéria.

Patogenia

A maioria dos estudos de infecção natural ou experimental por ***C. abortus*** foi realizada utilizando a espécie ovina como modelo, assim dados sobre a epidemiologia e patogenia da infecção nesta espécie animal são extrapolados para as demais espécies acometidas (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Estudos realizados com ovelhas indicam as tonsilas como primeiro local de replicação, quando a infecção ocorre pela ingestão de CE, ocorrendo posteriormente a disseminação pelo sangue, linfa e outros órgãos (JONES & ANDERSON, 1988). Nos animais não gestantes a infecção torna-se latente e as ***C. abortus*** permanecem possivelmente em tecido linfóide, por um processo mediado por citocinas (ENTRICAN et al., 1998). Nesta fase de latência, a ***C. abortus*** não é detectada por métodos laboratoriais utilizados atualmente e somente na gestação subseqüente a bactéria começa a se replicar novamente, provavelmente por mecanismos imunomediados. Este início de bacteremia é relacionado com o desenvolvimento da placenta. NAVARRO et al., (2004) relataram que o início do desenvolvimento de hematomas na interface materno-fetal no hilo dos placentomas ocorre aproximadamente no 60° dia de gestação, entretanto nenhuma alteração patológica ocorre até o 90° dia de gestação. A ***C. abortus*** invade as células do epitélio coriônico de vários placentomas, onde se replica, formando inclusões intracitoplasmáticas. A infecção se dissemina para regiões intercotiledonárias do córion, causando lesão epitelial, edema e inflamação. Estas alterações resultam em coloração avermelhada e espessamento das membranas da placenta, característico da doença (ENTRICAN et al., 1998; LONGBOTTOM & COULTER, 2003; NAVARRO et al., 2004).

Os mecanismos responsáveis pelo abortamento não são claros, mas acredita-se ser resultado da associação das lesões epitélio coriônicas, que levam ao comprometimento da troca de oxigênio e de nutrientes entre mãe e feto, e das alterações patológicas fetais, principalmente necrose focal de fígado e com menor freqüência, nos pulmões, baço, cérebro e linfonodos (BUXTON et al., 1990; 2002). Infecções por ***C. abortus*** estimulam uma forte resposta inflamatória no animal, principalmente pela ativação de interferons (IFN-γ) e fator de necrose tumoral (TNF-α), que pode tanto controlar o processo infeccioso como agravar as alterações patológicas (KEER et al., 2005). Alterações nas concentrações plasmáticas dos hormônios progesterona e 17β estradiol e de prostaglandina E_2 no líquido amniótico e alantóideo, são conseqüências da infecção placentária pela *C*

abortus que também podem resultar em parto prematuro (KEER et al., 2005).

Os animais infectados congenitamente que não são abortados, geralmente nascem fracos, e quando sobrevivem, freqüentemente apresentam infecção latente que se manifesta logo na primeira gestação (PAPP & SHEWEN, 1996). O processo de saída de latência e desenvolvimento da doença é igual ao de um animal infectado por transmissão horizontal.

Sinais clínicos

Em ovinos, bovinos e caprinos, geralmente a ocorrência de abortamentos nas últimas duas ou três semanas de gestação é o primeiro indício de que a infecção por ***C. abortus*** está instalada no rebanho (LONGBOTTOM & COULTER, 2003; NAVARRO et al., 2004). Após a instalação da infecção no rebanho, os índices de abortamento são superiores a 30% no primeiro ano, permanecendo entre 5-10% nos anos seguintes se não forem adotadas medidas de controle (LONGBOTTOM; COULTER, 2003). Com o desenvolvimento de imunidade específica contra ***C. abortus***, dificilmente um animal infectado aborta duas vezes, entretanto, alguns animais podem desenvolver imunidade incompleta e abortarem novamente, elevando o percentual de abortamentos no rebanho no segundo ano de infecção (PAPP et al., 1994). A eliminação intermitente de ***C. abortus*** nestes animais pode ocorrer por até três anos (KEER et al., 2005).

Os fetos abortados podem apresentar-se normais ou com graus variados de edema. A placenta encontra-se espessada, com coloração vermelho-amarelada e exudato vaginal de coloração rósea suja pode ser observado até 7 a 10 dias pós-abortamento (LONGBOTTOM &; COULTER, 2003). Em bovinos e caprinos, a ocorrência de retenção placentária, endometrites e vaginites são freqüentes e ocasionalmente pode ocorrer metrite e morte por infecção bacteriana secundária (RODOLAKIS et al., 1984; WITTENBRINK et al., 1993a,b; PAPP et al, 1994). Além do abortamento, outros sinais de distúrbios reprodutivos como nascimento prematuro e de animais fracos e natimortos também são associados à infecção por ***C. abortus***. Animais recém-nascidos podem apresentar quadros respiratórios inespecíficos e de encefalites, que geralmente morrem 48 horas após o nascimento, mesmo recebendo tratamento de suporte (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Especificamente em bovinos, outros sinais clínicos como repetição de cio em intervalos irregulares, aumento no intervalo de partos e de número de serviços ou de inseminação é observado nos rebanhos infectados (SHEWEN, 1980; WITTENBRINK et al., 1993b).

Nos machos em idade reprodutiva, os sinais clínicos observados são vesiculites, epididimites e orquites (STORZ et al., 1968, GOMES et al., 2001).

Diagnóstico

A ***C. abortus*** pode ser detectada diretamente na placenta e órgãos fetais, na excreção vaginal até 14 dias pós-abortamento ou no sêmen, pelo cultivo em ovo embrionado ou cultivo de células, imunofluorescência direta, imunohistoquímica, ELISA e testes de detecção de DNA (STORZ et al., 1968; JOHNSON et al., 1983; MOORE et al., 1987; BROWN & NEWMAN, 1989; DAGNAL & WILSMORE, 1990; GRIFFITHS et al., 1992; BUXTON et al., 1996; LAROUCAU et al., 2001).

A amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido indicada para a identificação das diferentes espécies pertencentes à família ***Chlamydiaceae*** (EVERETT, 2000; MADICO et al., 2000). Atualmente, outras técnicas como PCR em tempo real, Multiplex e sistemas fluorescentes de detecção da seqüência amplificada têm sido utilizadas (CREELAN; McCULLOUGH, 2000; MADICO et al., 2000). A diferenciação da ***C. abortus*** pode ser realizada utilizando oligonucleotídios iniciadores (*primers*) específicos, análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição e também pelo seqüenciamento genômico dos produtos obtidos na PCR (WATSON et al., 1991; SHEEHY et al., 1996; EVERETT, 2000; HARTLEY et al., 2001).

Para a detecção de anticorpos contra ***C. abortus*** diferentes testes como ELISA, imunofluorescência indireta e fixação de complemento têm sido utilizados (OIE, 2004). Apesar de apresentarem vários inconvenientes como a dificuldade de padronização e produção de antígenos, estes testes apresentam alta sensibilidade e facilidade de execução em todo o rebanho, por isso são extensivamente empregadas principalmente nos países onde existem programas de controle da doença (DONN et al., 1997; KALTENBOECK et al., 1997; GOMES et al., 2001). A técnica de imunofluorescência indireta é amplamente utilizada na rotina de diagnóstico das infecções por outras espécies de ***Chlamydia*** e ***Chlamydophila*** em humanos, porém não tem sido usada na medicina veterinária (PEREZ-MARTINEZ et al., 1986; MARKEY et al., 1993; GRIFFTHS et al., 1995; BUENDÍA et al., 2001; OIE., 2004). Entre os diferentes testes para a detecção de anticorpos, o de fixação de complemento é o mais utilizado no diagnóstico de rotina, sendo o teste recomendado pelo *Office International dês Epizooties* (OIE). Ele detecta anticorpos produzidos contra o epítopo do antígeno lipopolissacarídeo

presente em todas as espécies da família ***Chlamydiaceae*** (EVERETT, 2000).

Tratamento e controle

A família ***Chlamydiaceae*** é suscetível a vários antibióticos, sendo as tetraciclinas os antibióticos preferenciais para o tratamento das infecções. A oxitetraciclina de longa ação (20mg kg^{-1}, intramuscular) é a mais usada nas infecções por ***C. abortus*** nos animais de produção (LONGBOTTOM & COULTER, 2003). A administração de antibióticos, durante um surto, não elimina a infecção do rebanho, mas suprime a replicação do microrganismo, diminuindo a severidade dos sinais clínicos e aumentando o número de nascimentos de animais vivos. Para melhores resultados, o tratamento de ser iniciado após o 90º dia de gestação, quando são detectadas as primeiras alterações na placenta e uma segunda dose deve ser administrada duas semanas após a primeira dose (BUXTON, 1990; LONGBOTTOM & COULTER, 2003). A antibioticoterapia deve ser sempre associada ao correto manejo sanitário e à profilaxia com vacinas. Estas medidas são mais eficientes tanto para impedir a entrada da ***C. abortus*** como para o controle da infecção (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Em rebanhos considerados livres de ***C. abortus***, os animais de reposição também devem ser procedentes de áreas livres, monitoradas sorologicamente (ENTRICAN et al., 2001). Quando a infecção já se instalou na propriedade, o manejo sanitário inclui o isolamento, por pelo menos duas a três semanas, de todas as fêmeas que abortaram, destruição das placentas e limpeza dos piquetes contaminados durante os abortamentos, além da vacinação (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Atualmente existem dois tipos de vacinas disponíveis comercialmente apenas para ovinos, uma inativada e outra, viva atenuada, entretanto nenhuma confere proteção absoluta (GARCIA DE LA FUENTE et al. 2004; OIE., 2004). As vacinas inativadas são preparadas no saco da gema de ovos embrionados ou em cultivos celulares, utilizando apenas frações ou todo o microrganismo e adjuvantes oleosos. Este tipo de vacina pode ser administrado em animais gestantes e o período de cobertura pode chegar até dois anos (O.I.E., 2004). A vacina viva atenuada utiliza uma estirpe mutante termolábil, quimicamente induzida, de ***C. abortus***, por isso, somente animais não gestantes podem ser vacinados. Esta vacina confere imunidade por até três gestações e reduz drasticamente a eliminação de ***C. abortus*** no ambiente e o número de abortamentos, importantes para a erradicação da doença (GARCIA DE LA FUENTE et al. 2004; OIE., 2004; LONGBOTTOM & LIVINGSTONE, 2004). Os dois tipos de vacina podem ser administrados via intramuscular ou subcutânea e a vacinação deve ser sempre antes da monta natural ou inseminação artificial (GARCIA DE LA FUENTE et al. 2004; OIE., 2004).

CONCLUSÃO

Apesar da ***C. abortus*** ser identificada com freqüência em vários países, principalmente nos abortamentos de ovinos e caprinos (aborto enzoótico) e de bovinos (aborto epizoótico), no Brasil não há dados epidemiológicos suficientes que demonstrem a participação desta bactéria nos problemas reprodutivos das espécies de animais de produção. Espera-se que as informações, apresentadas nesta revisão, tenham demonstrado a necessidade de desenvolver estudos sobre o envolvimento deste microrganismo nos problemas reprodutivos em nosso país, visando principalmente medidas que permitam a prevenção da infecção por esta bactéria nas espécies de animais de produção.

REFERÊNCIAS

AITKEN, I.D. et al. Enzootic abortion of ewes. **Veterinary Record**, v.126, p.136-138, 1990.

AMIM, A.S. Comparison of polymerase chain reaction and cell culture for the detection of ***Chlamydophila*** species in the semen of bulls, buffalo-bulls and rams. **Veterinary Journal**, v.166, p.86-92, 2003.

BOREL, N. et al. Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.65, p.205-216, 2004.

BOWEN, R.A. et al. Mechanisms of infertility in genital tract infections due to ***Chlamydia psittaci*** transmitted through contamined semen. **Journal of Infectious Diseases**, v.138, p.95-98, 1978.

BROWN, P.A.; NEWMAN, J.A. Methods of chlamydial antigen detection. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.195, n.11, p.1567-1570, 1989.

BUENDÍA, A.J. et al. Field evaluation of a new commercially avaiable ELISA base on a recombinat antigen for diagnosing ***Chlamydophila abortus*** (***Chlamydia psittaci*** serotype 1) infection. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.229-239, 2001.

BUXTON, D. et al. Observations on the pathogenesis of ***Chlamydia psittaci*** infection of pregnant sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.102, p.221-237, 1990.

BUXTON, D. et al. Pathogenesis of ***Chlamydia psittaci*** infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p.221-230, 1996.

BUXTON, D. et al. Ovine chlamydial abortion; histopathological identification and analysis of immune cells in placental tissues. **Journal of Comparative Pathology**, v.127, p.133-141, 2002

CORSARO, D. et al. Increasing diversity within ***Chlamydiae***. **Critical Reviews in Microbiology**, v.29, n.1, p.37-78, 2003.

CREELAN, J. L.; McCULLOUGH, S.J. Evaluation of strain-specifc primer sequences from an abortifacient strain of ***Chlamydophila abortus*** (***Chlamydia psittaci***) for the detection of EAE by PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.190, p.103-108, 2000.

DAGNAL, G.J.R.; WILSMORE, A.J. A simple staining method for the identification of chlamydial elementary bodies in the fetal membranes of sheep affected by the Ovine Enzootic Abortion. **Veterinary Microbiology**, n.21, p.233-239, 1990.

DANIEL, R.G. et al. Bovine chlamydiosis in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.133, p.352-355, 1993.

DANNATT, L. et al. Investigation of a possible role for chlamydia in a new disease syndrome in dairy cattle. **Veterinary Record**, v.19, n.26, p.691-693, 1998.

DeGRAVES, F.J. et al. Reinfection with ***Chlamydophila abortus*** by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to ***Chlamydophila***. **Infection and Immunity**, v.72, n.5, p.2538-2545, 2004.

DONN, A. et al. Standardizzazione della tecnica di fissazione del complemento per la dimostrazione di anticorpi anti-***Chlamydia*** nel siero di sangue. **Il Progresso Veterinario**, v.4, p.125-128, 1997.

ENTRICAN, G. et al. Cytokines and the protective host immune response to ***Chlamydia psittaci***. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.21, p.15-26, 1998.

ENTRICAN, G. et al. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. **Journalof the Royal Society of Medicine**, v.94, p.273-277, 2001.

EVERETT, K. D.E. ***Chlamydia*** and ***Chlamydiales***: more than meets the eye. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.109-126, 2000.

FREITAS, J.A.; MACHADO, R.D. Isolamento de ***Chlamydia psittaci*** em búfalos abatidos para consumo em Belém, Pará, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.8, p.43-50, 1988.

GARCIA DE LA FUENTE et al. Efficacy of different comercial and new inactivated bacines against ovine enzootic abortion. **Veterinary Microbiology,** v.100, p.65-76, 2004.

GOMES, M.J.P. et al. Isolamento de ***Chlamydia psittaci*** em touros com vesiculite seminal, no Rio Grande Do Sul. **A Hora Veterinária**, n.119, p.43-46, 2001.

GRIFFITHS, P.C. et al. Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of ***Chlamydia psittaci*** of ovine origin. **Veterinary Microbiology**, v.30, p.165-177, 1992.

GRIFFITHS, P.C. et al. Epizootic bovine abortion in a dairy herd: characterization of a ***Chlamydia psittaci*** isolate and antibody response. **British Veterinary Journal**, v.151, n.6, p.683-693, 1995.

HARTLEY, J.C. et al. PCR detection and molecular identification of ***Chlamydiaceae*** species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.9, p.3072-3079, 2001.

HERRMANN, B. et al. Characterization of the rnp B gene and the RNase P RNA in the order ***Chlamydiales***. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.50, p.149-158, 2000.

HOLLIMAN, A. et al. Chlamydiosis and abortion in a dairy herd. **Veterinary Record**, v.134, p.500-502, 1994.

JOHNSON, F.W. A. et al. Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (***Chlamydia psittaci***) in cell cultures. **Veterinary Record**, v.113, p.413-414, 1983.

JONES, G.E. Chlamydial diseases of the reproductive tract of domestic ruminants. In: HITCHCOCK, P.J. et al. **Sexually transmitted diseases and adverse outcomes of pregnancy**. *Washington*: ASM, 1999. p.293-309.

JONES, G.E.; ANDERSON, I.E. ***Chlamydia psittaci***: is tonsilar tissue the portal of entry in ovine enzootic abortion? **Research in Veterinary Medicine**, v.44, p.260-261, 1988.

KALTENBOECK, B. et al. Use of syntethic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic ***Chlamydia psittaci*** in ruminants. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2293-2298, 1997.

KEER, K. et al. Immunopathology of ***Chlamydophila abortus*** infection in sheep and mice. **Research in Veterinary Science**, v.78, p.1-7, 2005.

LAROUCAU, K. et al. Improved sensitivity of PCR for ***Chlamydophila*** using pmp genes. **Veterinary Microbiology**, v.82, p.155-164, 2001.

LEONARD, C. et al. An estimate of the prevalence of enzootic abortion of ewes in Scotland. **Veterinry Record**, v.133, p.180-183, 1993.

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

LONGBOTTOM, D.; LIVINGSTONE, M. Vaccination against chlamydial infections of man and animals. **Veterinary Journal**, (*in press*). Acessado em: 05/04/2005. Online disponível em: www.sciencedirect.com/science .

MADICO, G. et al. Touchdown enzyme time release- PCR for detection and identification of ***Chlamydia trachomatis***, ***Chlamydia pneumoniae*** and ***Chlamydia psittaci***: using the 16S-23S spacer rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1085-1093, 2000.

MAINAR-JAIME, R.C. et al. Epidemiologic study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain. **Small Ruminant Research**, v.28, p.131-138, 1998.

MARKEY, B.K. et al. Comparison of serological tests for diagnosis of ***Chlamydia psittaci*** infection of sheep. **Veterinary Microbiology**, v.36, p.233-252, 1993.

MOORE, F.M. et al. Detection of chlamydial inclusions in cell cultures or biopsy tissue by alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase staining. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.1864-1867, 1987.

NANDA, N.K. et al. Diagnosis of bovine chlamydial abortion in cattle. **Indian Veterinary Journal**, v.69, p.483-486, 1992.

NAVARRO, J.A. et al. Kinetics of infection and effects on the placenta of ***Chlamydophila abortus*** in experimentally infected pregnant ewes. **Veterinary Pathology**, v.41, p.498-505, 2004.

OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES). Ovine chlamydiosis. In: **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. 4.ed. Paris: OIE, 2000. Acessado em: 22/03/2004. Online. Disponível em http://www.oie.int/.

OIE. (OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES). 2005. Acessado em: 25/07/2005. Online. Disponível em http://www.oie.int .

OGINO, H. et al. Pathology of bovine abortion and newborn calf death caused by dual infection with ***Chlamydia psittaci*** and infectious bovine rhinotracheitis virus. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.58, n.1, p.67-70, 1996.

PAPP, J.R. et al. Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep during estrus. **Infection and Immunity**, v.62, p.3786-3792, 1994.

PAPP, J.R.; SHEWEN, P.E. Localization of chronic ***Chlamydia psittaci*** infection in the reproductive tract of sheep. **Journal of Infectious Diseases**, v.174, p.1296-1302, 1996.

PEREZ-MARTINEZ, J.A.; STORZ, J. Bovine chlamydial abortion: serodiagnosis by modified complement-fixation and indirect inclusion fluorescence tests and enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.1501-1506, 1986.

PUDJIATMOKO, F.H. et al. Phylogenetic analysis of the genus ***Chlamydia*** based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.425-431, 1997.

PUGLIESE, A. et al. Epidemiological studies on the prevalence of bovine chlamydiosis in Calabria. **Atti dela Societa Italiana di Buiatria**, v.23, p.183-188, 1991.

REKIKI, A. et al. Isolation and characterisation of local strains of ***Chlamydophila abortus*** (***Chlamydia psittaci*** serotype 1) from Tunisia. **Veterinary Research**, v.33, p.215-222, 2002.

RODOLAKIS, A.; BERNARD, K. Isolament de chlamydia des organes genitaux de beliers atteints d´epididymite. **Bulletin de l´Academie Veterinaire de France**, v.50, p.65-70, 1977.

RODOLAKIS, A. et al. ***Chlamydia psittaci*** experimental abortion in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.2086-2089, 1984.

RODOLAKIS, A. et al. Recent advances on ovine chlamydial abortion. **Veterinary Research**, v.29, p.275-288, 1998.

ROMIJN, P.C.; LIBERAL, M.H.T. Cultivo de ***Chlamydia*** em diferentes sistemas celulares: um estudo comparativo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.1, p.15-18, 1990.

SCHACHTER, J.; CALDWELL, H.D. ***Chlamydiae***. **Annual Review of Microbiology**, v.34, p.285-309, 1980.

SHEEHY, N. et al. Diferentiation of ***Chlamydia psittaci*** and ***C. pecorum*** strains by species-specific PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.3175-3179, 1996.

SHEWEN, P.E. Chlamydial infection in animals: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.21, p.2-11, 1980.

SOUZA, C.A. I. **Ocorrência de anticorpos anti- *Chlamydophila* em bovinos e sua relação com distúrbios reprodutivos**. 2002. 63f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Aplicada às Zoonoses e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

STAMP, J.T. Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. **Veterinary Record**, v.62, p.251-254, 1950.

SZEREDI, L.; BACSADI, A. Detection of ***Chlamydophila*** (***Chlamydia***) ***abortus*** and ***Toxoplasma gondii*** in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method. **Journal of Comparative Pathology**, v.127, n.4, p.257-63, 2002.

STORZ, J. et al. The isolation of a viral agent from epizootic bovine abortion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.137, p.509-514, 1960.

STORZ, J. et al. Isolation of a psittacosis agent (***Chlamydia***)from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, v.29, p.549-555, 1968.

TAKAHASHI, T. et al. Phylogenetic analysis of ***Chlamydia psittaci*** from birds based on 16S rDNA gene sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2908-2914, 1997.

THOMA, R. et al. ***Chlamydiae*** in porcine abortion. **Veterinary Pathology**, v.34, p.467-469, 1997.

VANROMPAY, D. et al. ***Chlamydia psittaci*** infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. **Veterinary Microbiology**, v.45, p.93-119, 1995.

WATSON, M.W. et al. Genetic diversity and identification of human infection by amplification of chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1188-1193, 1991.

WITTENBRINK, M.M. et al. Infection of the bovine female genital tract with ***Chlamydia psittaci*** as a possible cause of infertility. **Repreoduction of Domestic Animals**, v.28, p.129-136, 1993a.

WITTENBRINK, M.M. et al. Endometrits in cattle experimentally induced by ***Chlamydia psittaci***. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v.40, p.437-450, 1993b.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Detectar C*hlamydophila* spp. por técnicas molecular e sorológica em amostras biológicas de animais experimentalmente e naturalmente infectados.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e avaliar um sistema de PCR, para a detecção do espaço intergênico 16S-23S do RNAr da *Chlamydophila abortus* em órgãos de camundongos experimentalmente infectados;
- Comparar os resultados obtidos na RNAr PCR com um sistema de PCR, descrito na literatura para o gene *Omp*2, em órgãos de camundongos experimentalmente infectados;
- Utilizar a RNAr PCR para o diagnóstico da *Chlamydophila abortus* em fragmentos de órgãos de aborto bovino, ovino e caprino e em amostras de muco vaginal e sêmen de ovino e caprino;
- Estimar a soroprevalência de *Chlamydophila* spp. em propriedades com histórico de abortamento bovino do estado do Paraná;
- Identificar possíveis associações de risco para a infecção por *Chlamydophila* spp. nas propriedades rurais com abortamento bovino do estado do Paraná.

3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1. Desenvolvimento e avaliação de uma técnica de PCR para a detecção do gene RNAr de *Chlamydophila abortus.*

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico ***Ciência Rural***

Desenvolvimento e avaliação de um sistema de PCR para detecção do gene RNAr de C*hlamydophila abortus*

Development and evaluation of a PCR assay to RNAr gene detection of *Chlamydophila abortus*

RESUMO

Chlamydophila abortus (*C. abortus*) é freqüentemente associada a distúrbios reprodutivos em bovinos, ovinos, caprinos e, esporadicamente, em suínos e eqüinos. Para o diagnóstico, os métodos de cultivo em ovo embrionado de galinha e em células de linhagem contínua apresentam baixa sensibilidade. Técnicas de amplificação do DNA, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido utilizadas em placenta, órgãos fetais, secreção vaginal e sêmen para o diagnóstico da *C. abortus*. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de PCR para a amplificação de um fragmento de 856 pb do gene RNAr da família *Chlamydiaceae*. A PCR foi avaliada em órgãos de 15 camundongos infectados experimentalmente com a estirpe de referência S26/3 da *C. abortus*. Os resultados foram comparados ao outro sistema de PCR, previamente descrito para o gene *Omp*2 (*outer major protein*) da família *Chlamydiaceae*. Dos 15 camundongos inoculados com *C. abortus*, 13 (K=0,84, erro padrão=0,20) foram positivos na RNAr PCR e nove (K=0,55, erro padrão=0,18) na *Omp*2 PCR. O limite de detecção da *C. abortus* na RNAr PCR (1,05 UFI) foi 100 vezes superior à *Omp*2 PCR (105 UFI). A maior sensibilidade em comparação ao sistema de PCR anteriormente descrito, bem como a especificidade demonstrada frente a diferente microrganismos patogênicos do sistema reprodutivo, abrem a perspectiva da utilização da PCR desenvolvida nesse trabalho para o diagnóstico molecular da *C. abortus* em casos de abortamentos e outros distúrbios reprodutivos em bovinos, ovinos e caprinos.

Palavras-chave: bovino, ovino, caprino, abortamento, PCR, *Chlamydophila abortus*

ABSTRACT

Chlamydophila abortus (*C. abortus*) is often associated with reproductive failures in cattle, sheep, goat, and rarely in swine and equine. The diagnosis by culture in embryonated chicken eggs or in lineage cells shows lower sensitivity. DNA amplification by PCR assay, have been used for *C. abortus* diagnosis in placenta, organ of fetuses, vaginal discharge or semen. The aim of this study was to develop one PCR assay to amplify an 856 bp fragment of 16S rRNA gene of *Chlamydiaceae*. The PCR assay was validate in organs fragments of 15 mice experimentally inoculated with *C. abortus* strain S26/3. The results were compared with other PCR assay, previously described to detection of *Omp*2 gene (outer major protein) of *Chlamydiaceae* family. Of 15 mice inoculated with *C. abortus*, 13 (k=0.84, standard error=0,20) were positive in rRNA PCR and nine (k=0.55, standard error=0,18) in *Omp*2 PCR. The detection limit of *C. abortus* in rRNA PCR (1.05 inclusion-forming unit - IFU) was a hundred times superior to *Omp*2 PCR (105 IFU). The higher sensibility of rRNA PCR as well as the specificity showed face to different microorganisms of reproduction system, open the perspective of the use of rRNA PCR assay to molecular diagnosis of *C. abortus* in cattle, sheep and goat abortions and reproductive failures.

Key-words: cattle, sheep, goat, abortion, PCR, *Chlamydophila abortus*

INTRODUÇÃO

As bactérias da ordem *Chlamydiales* são intracelulares obrigatórias, Gram negativas, com ciclo de vida que se altera entre formas infectantes (corpos elementares) e vegetativas (corpos reticulados). As espécies da família *Chlamydiaceae* provocam infecções no homem e em animais, sendo o gênero *Chlamydophila* o de maior importância na medicina veterinária (SCHACHTER & CALDWELL, 1980; CORSARO et al., 2003).

Chlamydophila abortus (*C. abortus*) é freqüentemente associada a distúrbios reprodutivos em bovinos, ovinos, caprinos e, esporadicamente, em suínos e eqüinos (EVERETT, 2000). O aborto epizoótico dos bovinos e o aborto enzoótico dos ovinos e caprinos são as manifestações clínicas mais importantes e têm sido relatados (GRIFFITHS et al., 1995; RODOLAKIS et al., 1998; REKIKI et al., 2002; SZEREDI & BACSADI, 2002).

A infecção por *C. abortus* também tem sido relatada em casos de abortamento de animais de laboratório (camundongos, cobaios e coelhos), entretanto, a virulência da estirpe envolvida é determinante no desenvolvimento ou não de um quadro clínico (BUENDÍA et al, 1999; EVERETT, 2000). A inoculação de *C. abortus* em modelos biológicos, como camundongos jovens (4-8 semanas de idade), pode ser utilizada para cultivo bacteriano e para testes de virulência, mas atualmente tem sido utilizada para a avaliação de vacinas após desafio experimental destes animais (SHEWEN, 1980; ROMIJN & LIBERAL, 1990; BOUAKANE et al., 2003; OIE, 2004).

C. abortus pode ser detectada na placenta e órgãos fetais, em secreção vaginal e no sêmen. Vários métodos de diagnóstico podem ser utilizados para a identificação da *C. abortus* incluindo o cultivo em ovo embrionado de galinha ou em células de linhagem contínua (McCoy, VERO e L929); técnicas para a detecção de proteínas (imunofluorescência direta, imunoistoquímica e ELISA) e para a detecção do ácido nucléico, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (STORZ et al., 1968; MOORE et al., 1987; DAGNAL & WILSMORE, 1990; BUXTON et al., 1996; LAROUCAU et al., 2001).

A PCR tem sido indicada para a identificação das diferentes espécies pertencentes à família *Chlamydiaceae* (EVERETT, 2000; MADICO et al., 2000). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares às regiões conservadas do gene *omp* (*outer major*

protein) e ao espaço intergênico do gene 16S-23S do RNA ribossômico (RNAr) têm sido os mais utilizados (KALTENBOECK et al., 2005). Entretanto, a seqüência do gene *omp* é extremamente variável, dificultando a identificação de regiões conservadas (WATSON et al., 1991; KALTENBOECK et al., 2005). O operon RNAr possui vários segmentos conservados em todas as espécies de *Chlamydiaceae* e, por isso, vêm sendo utilizado não só para propor uma nova taxonomia e identificação de novas espécies, como também para o diagnóstico (EVERETT et al., 1999; KALTENBOECK et al., 2005).

A diferenciação das espécies da família *Chlamydiaceae* pode ser realizada por meio da análise do polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP-PCR) ou pelo seqüenciamento de nucleotídeos dos produtos amplificados pela PCR (SHEEHY et al., 1996; EVERETT, 2000; HARTLEY et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de PCR, baseada no espaço intergênico 16S-23S do gene RNAr da família *Chlamydiaceae*, para a identificação de *C. abortus* em órgãos de camundongos infectados experimentalmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Chlamydophila abortus

A estirpe de referência *C. abortus* S26/3 foi propagada no saco vitelino de ovos embrionados de galinha (OIE, 2004) e utilizada como controle positivo na PCR.

Camundongos

Foram utilizados 25 camundongos (*Mus musculus*) albinos, fêmeas, com 4 semanas de idade, divididos em dois grupos. Um grupo de 15 camundongos foi inoculado via intraperitoneal (IP) com 0,2 mL de uma solução de saco vitelino de embrião de galinha previamente inoculado com 1000 unidades formadoras de inclusão (UFI) de *C. abortus* a 10% (p/v) em solução salina 0,9%. Outro grupo de 10 camundongos, que constituiu o grupo controle negativo, foi inoculado (IP) com 0,2 mL de solução salina. Três animais do

grupo inoculado com *C. abortus* e dois do grupo controle negativo foram eutanasiados nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 pós-inoculação. *Pool* das suspensões de macerados de fígado, baço, pulmão e rim a 10% (p/v) em PBS, foram centrifugadas a 1000 g por 5 min a 4^{o}C e o sobrenadante utilizado para a extração do DNA.

Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada pela técnica da sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990).

Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A amplificação de DNA foi realizada por dois sistemas:

PCR 1: RNAr PCR: os *primers* Ldn 2 (5'-CCCAAGGTGAGGCTGATGAC-3'), polaridade positiva, nt. 1470-1489 do gene 16S RNAr e Ldn 4 (5'-GTTTCAGGTTCTATTTCACTCCC-3'), polaridade negativa, nt. 2303-2325 do gene 23S RNAr, foram desenhados para amplificar um produto de 856 pb, compreendendo regiões do genes 16S e 23S RNAr e todo espaço intergênico. O desenho dos *primers* foi baseado na seqüência genômica da estirpe EBA de *C. abortus* (número de acesso no GeneBank, U76710). As estirpes 6BC de *Chlamydophila psittaci* (U68447), UR 629 de *Chlamydophila pecorum* (U68434), UR 120 de *Chlamydophila felis* (U68457), N16 de *Chlamydophila pneumoniae* (U68426), SFPD de *Chlamydophila muridarum* (U68437), CPIC U813 *Chlamydia caviae* (U68451), R22 de *Chlamydia suis* (U68420) e L2434.BU de *Chlamydia trachomatis* (U68443) também foram alinhadas à seqüência selecionada para a determinação da região mais conservada entre as espécies da família *Chlamydiaceae*. Para o desenho, alinhamento das seqüências e análise prévia dos *primers* foram utilizados os seguintes programas: Gene Runner versão 3,05 (Hastings Software Inc., Hastings, EUA) (http://www.generunner.com), CLUSTAL W Multiple Alignment

Program (http://www.ebi.ac.uk/clustalw) e BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Para a amplificação, 5 µL do DNA extraído foi adicionado a 45 µL de PCR mix constituído de tampão PCR 1,5x (30mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75mM KCl), 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada *primer*, 2,5 unidades de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, EUA) e água ultra pura estéril para o volume final de 50 µL. A reação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research Co. Water Town, MA, EUA) com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa inicial de 4 min/94 °C; 40 ciclos de 1 min/94 °C, 1min/59 °C, 1 min/72 °C e uma etapa final de 7 min/72 °C.

PCR 2: *Omp*2 PCR: foram utilizados os *primers* Ch1 (5'-ATGTCCAAACTCATCAGACGAG-3'), polaridade positiva, nt. 529-550 e Ch2 (5'-CCTTCTTTAAGAGGTTTTACCCA -3'), polaridade negativa, nt. 1093-1115, desenhados para amplificar um produto de 587 pb do gene *omp*2, específico para a família *Chlamydiaceae*. A reação foi realizada pela técnica descrita por HARTLEY et al. (2001).

Análise dos produtos amplificados

Os produtos obtidos na PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), e visualizados sob luz ultravioleta.

Análise com enzima de restrição (RFLP-PCR)

A especificidade dos produtos amplificados pelas duas técnicas de PCR foi avaliada pela análise do perfil de restrição frente à enzima *Alu*I (Invitrogen™ Life Technologies, EUA). A clivagem foi realizada de acordo com as especificações do fabricante e os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Para a análise comparativa, o perfil de restrição das nove espécies de *Chlamydophila* e *Chlamydia* foi obtido pela análise *in silico* no programa Gene Runner versão 3,05.

Sensibilidade

Para a determinação do menor limite de detecção do DNA na PCR, sobrenadantes das suspensões de pulmão, baço e fígado de um aborto bovino negativo para as espécies da família *Chlamydiaceae*, no isolamento em ovo embrionado de galinha e nos dois sistemas de PCR avaliados nesse trabalho, foram contaminados artificialmente com corpos elementares da estirpe S26/3 de *C. abortus*. Um *pool* dos sobrenadantes de órgãos foi filtrado em membrana 45 μm e submetido à contagem de unidades formadoras de inclusão (UFI) segundo HARTLEY et al. (2001). A partir do eluído do filtrado, foram realizadas diluições seriadas na base 10 e o DNA extraído pela técnica de sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990).

Especifidade

Para a avaliação da especificidade das técnicas de PCR foram testados DNA extraídos de *Chlamydophila psittaci* (estirpe Dade Behring, Alemanha), *Chlamydophila felis* (vacina Fel-o-vax IV Fort Dodge®, EUA), de *Leptospira* spp sorovares Hardjo (Hardjoprajitno), Icterohaemorrhagiae (RGA) e Canicola (Hond Utretcht), *Brucella abortus* (antígeno, TECPAR-Pr) e de microrganismos rotineiramente diagnosticados em abortos bovinos ou no ambiente: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus, Streptococcus* sp., *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovis, Ureaplasma* sp. e herpesvírus bovino 1.

Análise estatística

O indicador Kappa (*K*) (COHEN, 1960) foi utilizado para estabelecer a concordância entre os resultados obtidos pelos dois sistemas de PCR avaliados neste

trabalho, quando comparados à inoculação experimental dos camundongos (padrão-ouro) de acordo com o seguinte critério: *K*=0 (concordância pobre); *K*=0,1-0,2 (concordância pequena); *K*=0,21-0,4 (concordância média); *K*=0,41-0,6 (concordância moderada); *K*=0,61-0,8 (concordância substancial) e *K*>0,81 (concordância quase perfeita) (LANDIS & KOCH, 1977).

RESULTADOS

Do total de 15 camundongos inoculados com a *C. abortus*, 13 (*K*=0,84, erro padrão=0,20) foram positivos na técnica RNAr PCR e nove (*K*=0,55, erro padrão=0,18) na *Omp*2 PCR (Tabela 1). Os 10 camundongos do grupo controle negativo foram negativos nas duas técnicas de PCR. Todos os produtos amplificados foram confirmados, quanto à especificidade, pela técnica de RFLP com a enzima *Alu*I (Figura 1). Nenhuma banda extra, resultante de amplificações inespecíficas, foi visualizada em gel de agarose. Nenhum camundongo veio a óbito durante a realização do experimento.

O DNA extraído dos órgãos do aborto bovino, inoculados experimentalmente com a estirpe S26/3 de *C. abortus* foi amplificado pela PCR até a diluição 10^{-3} (1,05 UFI) com os *primers* Ldn 2/Lnd 4 e até 10^{-1} (105 UFI) com os *primers* Ch1/Ch2 (Figura 2).

Na avaliação da especificidade da RNAr PCR e *Omp*2 PCR, foi observado, respectivamente, um produto de aproximadamente 856 pb e 587 pb para *C. psittaci* e *C. felis*. As outras estirpes bacterianas e viral foram negativas nos dois sistemas de PCR. Nenhum resultado falso-positivo ou falso-negativo foi observado nas reações de PCR com água ultrapura estéril ou com a estirpe S26/3 de *C. abortus* (controle positivo) incluídas em todas as reações.

Os perfis de restrição dos produtos amplificados na RNAr PCR para as nove espécies da família *Chlamydiaceae* estão representados na tabela 2.

DISCUSSÃO

A *C. abortus* é um dos principais microrganismos associados a distúrbios reprodutivos em ovinos, caprinos e bovinos (DEGRAVES et al., 2003a). As técnicas padrão para o diagnóstico laboratorial, como isolamento bacteriano em cultivo celular, coloração de Gimenez ou Stamp apresentam limitações principalmente quanto à sensibilidade. O recente desenvolvimento e validação de diferentes sistemas de PCR para o diagnóstico de *C. abortus* tentam suprir essas falhas (PELLETIER et al., 2006). A técnica de PCR é considerada a mais adequada para a detecção da *C. abortus* em amostras biológicas provenientes de abortamentos (REITT et al., 2007). Entre as variações existentes, os sistemas que amplificam fragmentos dos genes 16S e 23S do RNAr apresentam alta sensibilidade e especificidade, além de permitir a identificação de todas as espécies da família *Chlamydiaceae* (MEIJER et al., 1997; MADICO et al., 2000). Neste trabalho foi possível o desenvolvimento e validação de um sistema de PCR para a detecção do espaço intergênico 16S-23S do RNAr da família *Chlamydiacea*. A RNAr PCR, em comparação à utilizada por HARTLEY et al. (2001) que detecta o gene *Omp*2, apresentou um limite de detecção 100 vezes superior quando utilizada tanto em macerado de órgãos de aborto bovino inoculado com *C. abortus*, quanto nos órgãos dos camundongos infectados experimentalmente. A concordância entre a RNAr PCR e a inoculação experimental dos camundongos (*K*= concordância quase perfeita) também foi superior a encontrada para *Omp*2 PCR (*K*= concordância moderada). DEGRAVES et al. (2003a) também encontraram diferença significativa na sensibilidade entre os sistemas de PCR, *Omp* e 23S RNAr, utilizadas em amostras de citologia vaginal de novilhas. Prevalência de *C. abortus* de 53% foi observada na 23S RNAr PCR, enquanto que com a *Omp* PCR não passou de 22%, quando utilizada nas mesmas amostras. A baixa sensibilidade da técnica *Omp* PCR pode estar associada ao alto grau de degradação dos *primers* utilizados (DEGRAVES et al.,

2003b). Durante a realização deste trabalho também foi observada a degradação dos *primers* Ch1 e Ch2, desenhados para o gene *omp,* após seis meses de estocagem a -20^{o}C.

O desenho correto dos *primers*, a região a ser amplificada e a otimização da reação de PCR, interferem diretamente na sensibilidade e especificidade da técnica (EVERETT et al., 1999; BURLER et al., 2001). Os *primers* desenhados neste trabalho para o espaço intergênico 16S-23S do RNAr, possuem temperatura de anelamento similar, com apenas dois graus de diferença e nenhuma formação de *primer-dimer*, *primer-hairpin loops*, *primer-bulge loops* e *primer-internal loops*. A região amplificada pelos *primers* Ldn 2 e Ldn 4 é altamente conservada e específica para toda a família *Chlamydiaceae* e apresenta segmentos heterogêneos que permitem a diferenciação entre as espécies pela clivagem com enzimas de restrição ou pelo seqüenciamento do produto amplificado. A enzima *Alu*I permitiu a diferenciação da *C. abortus* das outras espécies da família *Chlamydiaceae*.

O uso de técnicas adequadas de extração do ácido nucléico também é importante na otimização da PCR (INNIS & GELFAND, 1990). As técnicas de extração utilizando fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989), sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990) e a associação das duas técnicas (ALFIERI et al., 2006), foram avaliadas comparativamente para a detecção da *C. abortus* em órgãos de aborto bovino inoculado experimentalmente com a bactéria (dados não mostrados). Como a sílica/isotiocianato de guanidina e a associação fenol/clorofórmio/álcool isoamílico - sílica/isotiocianato de guanidina apresentaram resultados semelhantes, optou-se pelo uso isolado da técnica de extração pela sílica/isotiocianato de guanidina por ser mais simples evitando-se, dessa forma, etapas adicionais no processo de extração. Este método é eficaz em remover inibidores da PCR da amostra a ser analisada e proporciona maior estabilidade do ácido nucléico extraído (ROMERO, 1999; RASSOL et al., 2002; PAULA et al., 2003).

O uso de uma única técnica de extração resulta em menor tempo e custo final por reação de PCR.

O risco de contaminação vertical, entre as amostras, foi controlado pelo uso de diferentes ambientes para a amplificação e para cada fase da PCR, bem como pelo uso de controle negativo e positivo em todas as etapas da técnica (CORSARO & GREUB, 2006).

Durante a condução do experimento nenhum camundongo infectado com a estirpe S26/3 de *C. abortus* morreu ou apresentou qualquer sinal clínico. Apesar dos camundongos serem suscetíveis à infecção, as manifestações clínicas estão diretamente relacionadas às espécies da família *Chlamydiaceae*, virulência da estirpe, dose infectante e aos fatores imunológicos do animal (EVERETT, 2000; BOUAKANE et al., 2003). Nos animais eutanasiados nos dias 20 e 30 pós-inoculação, todos os órgãos de dois animais e apenas o rim de um outro animal foram negativos na RNAr PCR. A remoção da *C. abortus* nos órgãos examinados destes animais, pelo desenvolvimento de uma resposta imune especifica, deve ser considerada (MESTECKY et al., 2005).

CONCLUSÃO

A PCR para a detecção do espaço intergênico 16S-23S do RNAr mostrou sensibilidade superior, quando comparada à PCR previamente descrita para o gene *omp*, para o diagnóstico e identificação da *C. abortus* em fragmentos de órgãos de camundongos, inoculados experimentalmente e também em suspensões de fragmentos de órgãos de um feto bovino contaminado artificialmente.

Os resultados obtidos no desenvolvimento e avaliação da PCR descrita nesse trabalho abrem a perspectiva da realização de estudos epidemiológicos para a detecção de *C. abortus* em abortos bovinos, ovinos e caprinos.

AGRADECIMENTOS

Ao professores: Dr. Carlo Turilli (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova, Itália) pela doação da estipe C26/3 de *Chlamydophila abortus* e ao Dr. João Pessoa de Araújo Júnior (Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" Campus de Botucatu, São Paulo) pela doação da estirpe Dade Behring, Alemanha de *Chlamydophila psittaci*.

REFERÊNCIAS:

ALFIERI, A.A. et al. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health Production**, v.38, p.521-526, 2006.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

BOUAKANE, A. et al. Abortive potency of *Chlamydophila abortus* in pregnant mice is not directly correlated with placental and fetal colonization levels. **Infection and Imunnity**, v.71, n.12, p.7219-7222, 2003.

BUENDÍA, A.J. et al. Differences in the immune response against ruminant chlamydial strains in a murine model. **Veterinary Research**, v.30, p.495-507, 1999.

BURLER, J.M. et al. Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.369, p.200-205, 2001.

BUXTON, D. et al. Pathogenesis of ***Chlamydia psittaci*** infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p.221-230, 1996.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scale. **Educational and Psychological Measurement**, v.20, p.37-46, 1960

CORSARO, D. et al. Increasing diversity within Chlamydial. **Critical Review in Microbiology**, v.29, n.1, p.37-78, 2003.

CORSARO, D.; GREUB, G. Pathogenic potencial of novel chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.2, p.283-297, 2006.

DAGNAL, G.J.R.; WILSMORE, A.J. A simple staining method for the identification of *Chlamydial* elementary bodies in the fetal membranes of sheep affected by the Ovine Enzootic Abortion. **Veterinary Microbiology**, v.21, p.233-239, 1990.

DEGRAVES, F.J. et al. Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1726-1729, 2003a.

DEGRAVES, F.J. et al. High-sensitivity quantitative PCR plataform. **Biotechniques**, v.34, p.106-115, 2003b.

EVERETT, K.D.E. et al. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamidiaceae,* including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v.49, p.415-440, 1999.

EVERETT, K.D.E. Chlamydial and Chlamydiales: more than meet the eye. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.109-126, 2000.

GRIFFITHS, P.C. et al. Epizootic bovine abortion in a dairy herd: characterization of a ***Chlamydia psittaci*** isolate and antibody response. **British Veterinary Journal**, v.151, n.6, p.683-693, 1995.

HARTLEY, J.C. et al. PCR detection and molecular identification of ***Chlamydiaceae*** species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.9, p.3072-3079, 2001.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A. et al. **PCR protocols**. San Diego, Califórnia: Academic press, Inc., 1990. Cap.1, p.3-13.

KALTENBOECK, B. et al. Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? **Veterinary Research Communications**, v.29 (suppl. 1), p. 1-15, 2005.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p.159, 1977.

LAROUCAU, K. et al. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using *pmp* genes. **Veterinary Microbiology**, v.82, p.155-164, 2001.

MADICO, G. et al. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of ***Chlamydia trachomatis***, ***Chlamydia pneumoniae*** and ***Chlamydia psittaci***: using the 16S-23S spacer rRNA genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1085-1093, 2000.

MEIJER, A. et al. Species identification of *Chlamydia* isolates by analyzing restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA spacer region. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.5, p. 1179-1183, 1997.

MESTECKY, J. et al. Immunologic uniqueness of the genital tracts: challenge for vaccine development. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.208-214, 2005.

MOORE, F.M. et al. Detection of Chlamydial inclusions in cell cultures or biopsy tissue by alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase staining. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.1864-1867, 1987.

O.I.E (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). Ovine chlamydiosis. In: **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5th edition**. Paris: OIE, 2004. Acessado em 02.10.2006. Online. Disponivel em http://www.oie.int/.

PAULA, V.S. et al. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.7, p. 135-141, 2003.

PELLETIER, C. et al. Validation of an internal method for the diagnosis of infections with *Chlamydophila abortus* and *Coxiella burnetii* by real-time multiplex PCR. **Developmental Biology**, v.126, p.219-226, 2006.

RASSOL, N.B.G. et al. Determination of a universal nucleic acid extraction procedure PCR detection of gastroenteritis viruses in fecal specimens. **Journal of Virology Methods**, v.100, p. 1-16, 2002

REITT, K. et al. Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986 to 1995 – a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, v.54, n.1, p.15-22, 2007.

REKIKI, A. et al. Isolation and characterisation of local strains of ***Chlamydophila abortus*** (***Chlamydia psittaci*** serotype 1) from Tunisia. **Veterinary Research**, v.33, p.215-222, 2002.

RODOLAKIS, A. et al. Recent advances on ovine Chlamydial abortion. **Veterinary Research**, v.29, p.275-288, 1998.

ROMERO, J.R. Reverse transcription polymerase chain reaction detection of the enterovirusis. **Archive of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 123, p. 1161-1169, 1999.

ROMIJN, P.C.; LIBERAL, M.H.T. Cultivo de *Chlamydia* em diferentes sistemas celulares: um estudo comparative. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.25, n.1, p.15-18, 1990.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition.** Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory press., 1989.

SCHACHTER, J.; CALDWELL, H.D. *Chlamydiae*. **Annual Review of Microbiology**, v.34, p.285-309, 1980.

SHEEHY, N. et al. Diferentiation of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* strains by species-specific PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.3175-3179, 1996.

SHEWEN, P.E. Chlamydial infection in animals: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.21, p.2-11, 1980.

STORZ, J. et al. Isolation of a psittacosis agent (Chlamydia) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, v.29, p.549-555, 1968.

SZEREDI, L.; BACSADI, A. Detection of *Chlamydophila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma Gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by streptavidin-biotin method. **Journal of Comparative Pathology**, v.127, p.257-263, 2002.

WATSON, M.W. et al. Genetic diversity and identification of human infection by amplification of Chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1188-1193, 1991.

Tabela 1. Resultados de dois sistemas de PCR realizados em amostras de órgãos de camundongos inoculados com a estirpe S26/3 de *Chlamydophila abortus*, Londrina, 2007.

PCR	*Pool* de órgãos						pulmão	baço	rim	fígado
	Dia5* +/total	Dia10* +/total	Dia15* +/total	Dia20* +/total	Dia30* +/total	Total +/total	+/total	+/total	+/total	+/total
RNAr (*K*=0,84)	3/3	3/3	3/3	2/3	2/3	13/15	13/15	13/15	12[a]/15	13/15
*Omp*2 (*K*=0,55)	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	9/15	9/15	9/15	9/15	9/15

* dias pós-inoculação
+ = amostras positivas
total = total de amostras avaliadas
[a] amostra de rim negativa de um animal eutanasiado no dia 20 pós-inoculação

Tabela 2. Tamanho esperado dos fragmentos* após digestão com a enzima *Alu*I dos produtos amplificados na PCR para o espaço intergênico 16S-23S RNAr da família *Chlamydiaceae*, Londrina, 2007.

Espécie	Fragmentos (pb)
Chlamydophila abortus	455, 390, 11
Chlamydophila caviae	455, 324, 68, 11
Chlamydophila felis	455, 324, 68, 11
Chlamydophila pecorum	455, 217, 93, 68, 11, 5
Chlamydophila pneumoniae	455, 323, 68, 11
Chlamydophila psittaci	455, 324, 68, 11
Chlamydia muridarum	467, 341, 58, 10
Chlamydia suis	277, 192, 176, 162, 58, 10
Chlamydia trachomatis	469, 343, 58, 10

* análise *in silico* no programa Gene Runner versão 3,05.

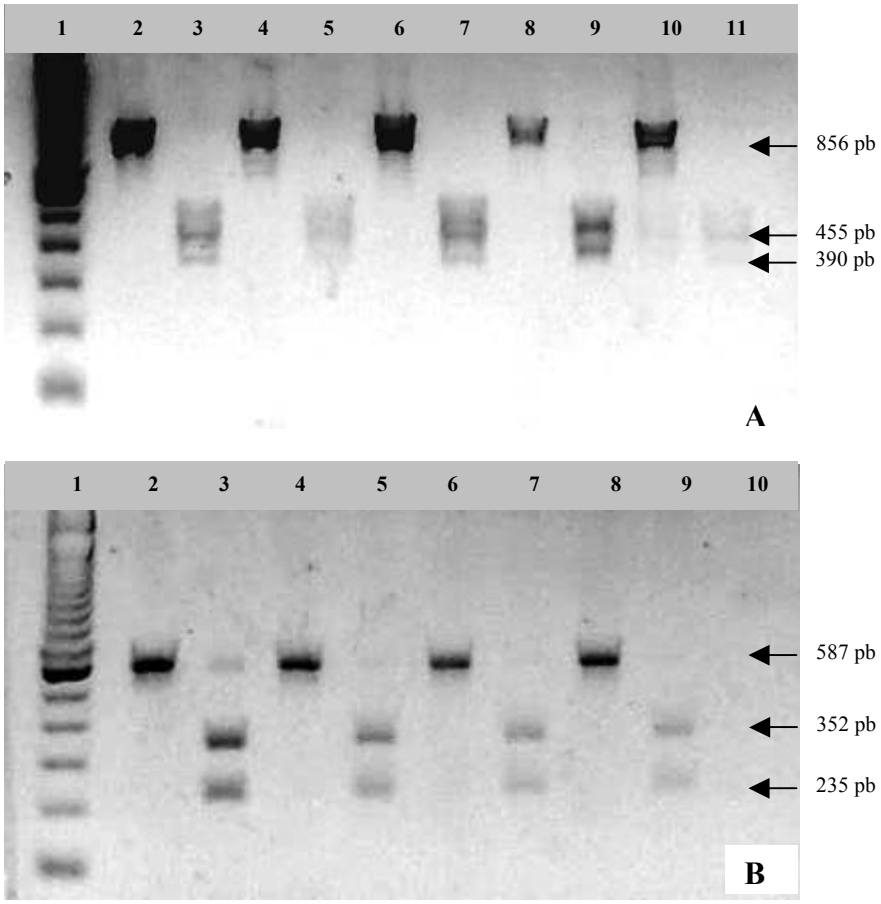

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos nas técnicas de PCR (RNAr PCR, A e *Omp2* PCR, B) com enzima *Alu*I em *pool* de órgãos de camundongos infectados experimentalmente com *Chlamydophila abortus*. **A)** RNAr PCR (856 pb) canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2, 4, 6, 8 e 10 produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 pós-inoculação, respectivamente; 3, 5, 7, 9 e 11: RFLP dos produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10, 15, 20 e 30 pós-inoculação, respectivamente. **B)** *Omp*2 PCR (587 pb) canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2: controle positivo (ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*); 3: RFLP do controle positivo; 4, 6 e 8: produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10 e 15 pós-inoculação, respectivamente; 5, 7 e 9: RFLP dos produtos de PCR de *pool* de órgãos nos dias 5, 10 e 15 pós-inoculação, respectivamente; 10: controle negativo.

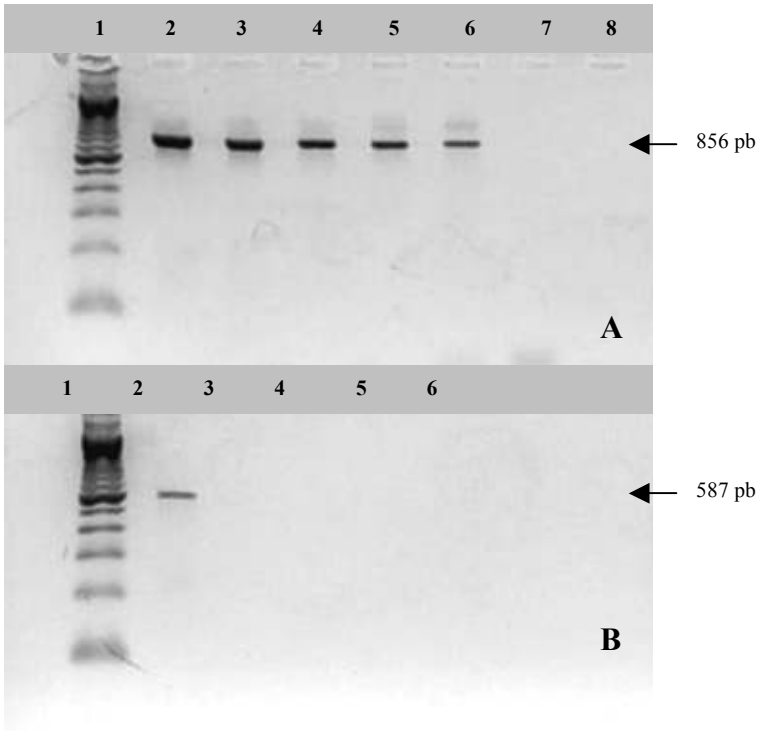

Figura 2. Limite de detecção da *Chlamydophila abortus* em *pool* de órgãos de aborto bovino pelas técnicas RNAr PCR (856 pb, A) e *Omp2* PCR (587 pb, B). **A)** canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2: controle positivo (ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*); 3: filtrado do *pool* de órgãos de feto bovino contaminado artificialmente com *C. abortus*; 4, 5, 6, 7: diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, respectivamente; coluna 8: controle negativo. **B)** canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2, 3, 4 e 5: diluições 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, respectivamente; 6: controle negativo.

3.2. Utilização da PCR para a detecção de *Chlamydophila abortus* em amostras biológicas de bovinos, ovinos e caprinos.

Nota editada de acordo com as normas de publicação do periódico ***Ciência Rural***

Utilização da PCR para a detecção de *Chlamydophila abortus* em amostras biológicas de bovinos, ovinos e caprinos

PCR assay to detection of *Chlamydophila abortus* in bovine, sheep and goat samples

RESUMO

A *Chlamydophila abortus* (C. *abortus*) é o agente etiológico do aborto enzoótico ovino e caprino (AEO) e do aborto epizoótico bovino (AEB). Altas taxas de abortamento são relacionadas à infecção pela *C. abortus* em rebanhos ovinos e caprinos. A redução na taxa de fertilidade de fêmeas e machos, em decorrência de endometrite e vesiculite seminal respectivamente, é a conseqüência mais observada em bovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença da *C. abortus* em uma coleção de abortos bovinos (*n*=85), ovinos (*n*=12) e caprinos (*n*=8), em amostras de muco vaginal ovino (*n*=90) e caprino (*n*=20) e sêmen ovino (*n*=10) e caprino (*n*=5), pela amplificação do espaço intergênico 16S-23S RNAr pela PCR. Um controle interno da reação, constituído pelos *primers* BOV1 e BOV2 que amplificam um fragmento do gene ND5 do DNA mitocondrial de bovino foi utilizado nas amostras de aborto bovino para a avaliação da eficiência das técnicas de extração e de amplificação do DNA. Todas as amostras avaliadas nesse trabalho foram negativas para a *C. abortus* na PCR. O controle interno da reação possibilitou a amplificação de um produto com 626 pb do gene ND5 em todas as amostras de aborto bovino indicando eficiência nas etapas de extração e amplificação do ácido nucléico. Esses resultados sugerem que a freqüência da infecção por *C. abortus* é baixa ou mesmo ausente nos materiais avaliados.

Palavras-chave: *Chlamydophila abortus*, aborto, muco vaginal, sêmen

ABSTRACT

Chlamydophila abortus (*C. abortus*) is the aetiologic agent of ovine enzootic abortion (OEA), in sheep and goat, and bovine epizootic abortion (BEA). High levels of

abortion are related with the infection of the *C. abortus* in sheep and goat flocks. In cattle herds, reduction of fertility by endometritis and seminal vesiculitis is often observed. The aim of this study was to detect *C. abortus* by PCR assay with primers for the intergenic space 16S-23S rRNA in a abortion collection of bovine (*n*=85), sheep (*n*=12) and goat (*n*=8); in vaginal discharge samples of ewe (*n*=90) and goat (*n*=20) and semen of ram (*n*=10) and goat (*n*=5). A PCR internal control with primers BOV1 and BOV2 for ND5 gene of bovine mitochondrial DNA was used in bovine abortion samples for efficiency evaluation of DNA extraction and PCR assay. All abortion, vaginal discharge and semen samples were negative in PCR for *C. abortus*. The internal control amplified a product of 626 bp of ND5 gene in all bovine abortion samples. These results appointed a low frequency or absence of *C. abortus* infection in the analyzed herds.

Key-words: *Chlamydophila abortus*, abortion, vaginal discharge, semen

Chlamydophila abortus (C. *abortus*), agente etiológico do aborto enzoótico ovino (AEO) e caprino e do aborto epizoótico bovino (AEB), é endêmica em ruminantes em todo o mundo (EVERETT, 2000; GRECO et al., 2005). O AEO pode ser responsável por taxas de abortamentos superiores a 30%, logo que a infecção se instala no rebanho, diminuindo para 5-10% na forma endêmica (MASALA et al., 2005). O AEO é considerado a principal causa de abortamento ovino na maioria dos países europeus, sendo responsável por 39% e 50% dos abortamentos diagnosticados na Suíça e no Reino Unido, respectivamente, e por 23% dos abortamentos caprinos na Suíça (WOOD, 1992; BOREL et al., 2004). Em bovinos, o abortamento é uma conseqüência esporádica da infecção pela *C. abortus*., com taxas inferiores a 20%. A conseqüência mais freqüente nessa espécie animal é a redução da fertilidade em decorrência de endometrite, em fêmeas e vesiculite seminal e epididimite, em machos (LIVINGSTONE & LONGBOTTOM, 2006). As taxas de positividade em

bovinos, utilizando-se diferentes sistemas de PCR, variaram de 0,8-60% (KALTENBOECK et al., 2005; REITT et al., 2007). Dados mundiais precisos sobre o impacto do AEB e das infecções por outras clamidófilas em bovinos nas taxas de fertilidade, como abortamento, intervalo de partos, repetição de cio e qualidade do sêmen são inexistentes até o momento (REINHOLD et al., 2007).

Diferentes métodos têm sido utilizados para o diagnóstico da *C. abortus*, entretanto as técnicas padrão (cultivo em ovo embrionado de galinha ou em células de linhagem contínua) apresentam baixa sensibilidade em comparação às técnicas moleculares como a PCR (EVERETT, 2000; TEANKUM et al., 2007). A PCR é considerada a técnica mais adequada para a detecção da *C. abortus* em amostras biológicas provenientes de abortamento e sêmen (AMIM, 2003; REITT et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a infecção pela *C. abortus* por meio da detecção do espaço intergênico 16S-23S do RNAr da família *Chlamydiaceae* pela técnica da PCR realizada em uma coleção de abortos bovinos, ovinos e caprinos e em amostras de muco vaginal e sêmen, de ovinos e caprinos.

Foram avaliados 85 abortos bovinos (estocados a -20^{o}C por até cinco anos), 12 abortos ovinos e oito abortos caprinos e amostras de muco vaginal de 90 ovelhas e 20 cabras e sêmen de 10 ovinos e cinco caprinos (estocados a -20^{o}C por até 30 dias) de propriedades com problemas reprodutivos, coletados no período de 2002 a 2007. Durante a necropsia dos fetos abortados foram coletados fragmentos de fígado, baço e pulmão. Suspensões a 10% (p/v) em PBS foram centrifugadas a 1000g (5 min a 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para a extração do DNA pela técnica de sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM et al., 1990).

A amplificação de DNA foi realizada pela PCR (produto de 856 pb, compreendendo regiões do gene 16S e 23S do RNAr e todo espaço intergênico). A reação

foi realizada com 5 μL do DNA extraído e 45 μL de PCR-mix constituído de tampão PCR 1,5x (30mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75mM KCl), 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada *primer* [Ldn 2 (5'-CCCAAGGTGAGGCTGATGAC-3', polaridade positiva, nt. 1470-1489 do gene 16S RNAr) e Ldn 4 (5'-GTTTCAGGTTCTATTTCACTCCC-3', polaridade negativa, NT. 2303-2325 do gene 23S RNAr], 2,5 unidades de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, EUA) e água ultra pura estéril para o volume final de 50 μL. A reação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research Co. Water Town, MA, EUA) em uma etapa inicial de 4 min/94 °C; 40 ciclos de 1 min/94 °C, 1min/59 °C, 1 min/72 °C e uma etapa final de 7 min/72 °C.

Controle positivo (saco vitelino de ovo embrionado de galinha inoculado com a estirpe S26/3 de *C. abortus*) e negativo (água ultra pura estéril) foram utilizados em todas as etapas da PCR. As amostras de aborto bovino também foram submetidas à PCR com controle interno da reação para avaliação da eficiência das técnicas de extração do ácido nucléico e de amplificação do DNA. Reações individuais de PCR foram realizadas com os *primers* BOV1 (5'-ATACGCCTTCATTACCAG-3') e BOV2 (5'-TTGAATGGAGTAGTGCTG-3'), desenvolvidos para a amplificação de um produto de 626 pb do gene ND5 do DNA mitocondrial bovino (WOSIACKI et al. 2005).

Os produtos obtidos na PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, com de brometo de etídeo (0,5 μg/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), e visualizados sob luz ultravioleta.

O limite de detecção da RNAr PCR em fragmentos de órgãos de um aborto bovino, contaminado artificialmente, foi de 1,05 UFI (unidades formadoras de inclusão) de *C. abortus* (dado não apresentados).

Todas as amostras incluídas nesse estudo e constituídas por fragmento de órgãos fetais, muco vaginal e sêmen foram negativas para *C. abortus* na PCR. Nenhuma

amplificação inespecífica (banda extra), foi visualizada em gel de agarose. Em todas as amostras de aborto bovino foi possível a amplificação de um produto com 626 pb, correspondente ao gene ND5 do DNA mitocondrial bovino (figura 1). A utilização do controle interno nestas amostras e o uso de controles negativo e positivo em todas as etapas das técnicas de extração e PCR minimizaram a ocorrência de resultados falsos-negativos em decorrência de erros na execução da técnica ou da presença de inibidores de PCR nas amostras avaliadas.

Os abortamentos decorrentes da infecção pela *C. abortus* geralmente ocorrem no terço final da gestação e são mais freqüentes em ovinos e caprinos (LONGBOTTOM & COULTER, 2003; LIVINGSTONE & LONGBOTTOM, 2006). Neste trabalho, somente dois abortamentos bovinos e dois caprinos ocorreram nesta fase da gestação, entretanto, estes abortos bovinos foram positivos para *Mycoplasma* sp. e os abortos caprinos para *Toxoplasma gondii* (dados não apresentados).

A confirmação da presença da *C. abortus* no Brasil foi efetuada por GOMES et al. (2001) pelo isolamento do microrganismo em amostras de sêmen de touros com vesiculite seminal no estado do Rio Grande do Sul e pela ocorrência de anticorpos contra *Chlamydophila* spp. demonstrada em soro de bovinos do estado de São Paulo por IGAYARA-SOUZA et al. (2004) e do Paraná (dados próprios não publicados) e de ovinos do município de Londrina, Paraná por LIMA (2007). Assim, apesar da falta de evidência da *C. abortus* nas amostras avaliadas pela PCR neste trabalho, a importância econômica atribuída à doença e o seu potencial zoonótico justificam a realização de mais estudos

sobre a ocorrência e a epidemiologia do AEO e AEB e das outras doenças ocasionadas por *Chlamydophila* spp. em bovinos, ovinos e caprinos.

REFERÊNCIAS:

AMIM, A.S. Application of touchdown enzyme time release (TETR)-PCR for diagnosis of *Chlamydophila abortus* infection. **Research in Veterinary Science**, v.74, p.213-217, 2003.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

BOREL, N. et al. Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.65, p.205-216, 2004.

EVERETT, K.D.E. Chlamydial and Chlamydiales: more than meet the eye. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.109-126, 2000.

GRECO, G. et al. Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep and goat flocks in southern Italy by PCR using four different primer sets. **Veterinary Research Communications**, v.29 (suppl 1), p.107-115, 2005.

GOMES, M.J.P. et al. Isolamento de *Chlamydia psittaci* em touros com vesiculite seminal, no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v.119, p.43-46, 2001.

IGAYARA-SOUZA, C.A.I. et al. Ocorrência de anticorpos anti-chlamydophila em bovinos e sua relação com distúrbios reprodutivos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.1, p.28-33, 2004.

KALTENBOECK, B. et al. Bovine *Chlamyophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? **Veterinary Research Communications**, v.29 (suppl. 1), p. 1-15, 2005.

LIMA, B.A.C. **Prevalência de anticorpos contra *Chlamydophila* spp em ovinos de propriedades localizadas na região de Londrina, Paraná.** 2007. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de Concentração Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina.

LIVINGSTONE, M.; LONGBOTTOM, D. What is the prevalence and economic impact of chlamydial infections in cattle? The need to validate and harmonise existing methods of detection. **The Veterinary Journal**, v.172, p.3-5, 2006.

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

MASALA, G. et al. Role of Chlamydophila abortus in ovine and caprine abortion in Sardinia, Italia. **Veterinary Research Communication**, v**.**29, n.1, p.117-123, 2005.

REINHOLD, P. Impact of latent infections with *Chlamydophila* species in young cattle. **The Veterinary Journal** (2007), doi:10.1016/j.tvjl.2007.01.004

REITT, K. et al. Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986 to 1995 – a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology, Pathology and Clinical Medicine**, v.54, n.1, p.15-22, 2007.

WOOD, R. Enzootic abortion costs home industry £20m pa. **Farmer Weekly**, v.117, p.60, 1992.

WOSIACKI , S.R. et al. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virology Methods**, v.126, p.215-219, 2005.

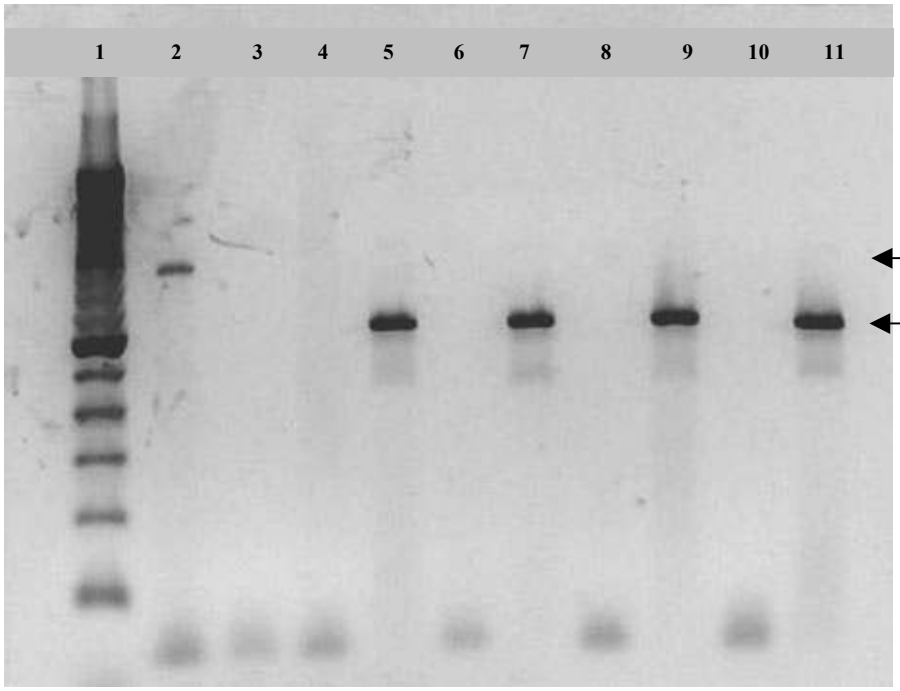

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR, RNAr (856 pb) para *Chlamydophila abortus* e BOV1/2 para o gene ND5 do DNA mitocondrial de bovinos (controle interno, 626 pb) em amostras de aborto bovino. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2: controle positivo (ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*); 3: ovo embrionado de galinha inoculado com *C. abortus*, negativo para o controle interno; 4, 6, 8 e 10: amostras de aborto bovino negativas para *C. abortus*; 5, 7, 9 e 11: amostras de aborto bovino positivas para o controle interno.

3.3 Soroprevalência de *Chlamydophila* spp. em propriedades rurais com histórico de abortamento bovino do estado do Paraná, Brasil.

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico ***Ciência Rural***

Soroprevalência de *Chlamydophila* spp. em propriedades rurais com histórico de abortamento bovino do estado do Paraná, Brasil

Seroprevalence of *Chlamydophila* spp. in herds with bovine abortion of Paraná state, Brazil

RESUMO

Chlamydophila abortus é o agente etiológico do aborto epizoótico bovino. O abortamento, nascimento de prematuros e de animais fracos, natimortalidade e repetição de cio em intervalos irregulares são as manifestações clínicas mais freqüentes. A prova de fixação de complemento é a técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico sorológico da infecção por *Chlamydophila* spp. O objetivo deste trabalho foi estimar a prevalência de anticorpos contra *Chlamydophila* spp em fêmeas bovinas de propriedades rurais com histórico de abortamento, selecionadas dentro do delineamento amostral do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose no estado do Paraná. Foram testadas pela prova de fixação de complemento 3.102 amostras de soro de fêmeas bovinas (idade ≥ 24 meses), provenientes de 373 propriedades. Ao total, 44 (1,42%) animais foram positivos com títulos ≥32. A prevalência estimada nas propriedades foi de 8,82% (6,15%-12,17%). A criação de animais confinados ou semiconfinados foi considerada uma associação de risco (OR= 2,21, p= 0,031).

Palavras-chave: *Chlamydophila abortus*, prova de fixação de complemento, bovino, diagnóstico, bactéria, prevalência.

ABSTRACT

Chlamydophila abortus is a recognized cause of bovine epizootic abortion. The abortion, premature birth and weak lamb/calf, stillbirth and repeat breeding in irregular intervals are the most frequent disease manifestations. The complement fixation test is the

recommended by the World Organization of Animal Health (OIE) for *Chlamydophila* spp serologic diagnosis. The aim of this study was estimate the seroprevalence of *Chlamydophila* spp in cattle herds with abortion, selected inside the sampling design of National Program of Control and Erradication of Brucellosis in Paraná state. Serums samples of 3.102 cows (age ≥ 24 months) from 373 herds were analyzed by complement fixation test. Totally, 44 (1.42%) animal were positive with titers ≥ 32. The seroprevalence of *Chlamydophila* spp in the herds was 8.82% (6.15%-12.17%). Confined or semi-confined breeding was a risk association (OR = 2.21, p = 0.031).

Keywords: *Chlamydophila abortus*, complement fixation test, bovine, diagnosis, bacteria, prevalence.

INTRODUÇÃO

Bactérias da família *Chlamydiaceae* infectam várias espécies de mamíferos e aves domésticas e selvagens, além do homem. As manifestações clínicas causadas por estas bactérias são variadas e dependem da espécie animal e bacteriana envolvida (SCHACHTER & CALDWELL, 1980; CORSARO et al., 2003). As espécies *Chlamydophila abortus* (*C. abortus*), anteriormente classificada como *Chlamydia psittaci* sorotipo 1, e *Chlamydophila pecorum* (*C. pecorum*), anteriormente classificada como *Chlamydia psittaci* sorotipo 2, são as mais importantes, do ponto de vista epidemiológico, para a espécie bovina (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

C. abortus é responsável por alterações reprodutivas denominadas aborto epizoótico bovino (EVERETT, 2000; OIE, 2004). O abortamento nas últimas duas ou três semanas de gestação normalmente é o primeiro sinal clínico da infecção por *C. abortus,* porém o nascimento de prematuros e de animais fracos, natimortalidade, repetição de cio em intervalos irregulares, aumento no intervalo de partos e de número de coberturas ou de

inseminações, por gestação, também são observados. Nos machos em idade reprodutiva, os sinais clínicos não são observados com freqüência, entretanto podem ocorrer vesiculites, epididimites e orquites (LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

O aborto epizoótico bovino já foi relatado em vários países, principalmente na Europa e nos EUA, com prevalências superiores a 45% em propriedades com problemas reprodutivos. (GRIFFITHS et al., 1995; CAVIRANI et al., 2001; KALTENBOECK et al., 2005; NIEMCZUK, 2005). No Brasil, o único levantamento sorológico realizado apontou 5,3% de bovinos sororreagentes para o gênero *Chlamydophila* no estado de São Paulo (IGAYARA-SOUZA et al., 2004).

A infecção por *C. pecorum* também ocorre em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e eqüinos (EVERETT, 2000). Apesar de relatos de abortamentos em bovinos, o quadro clínico mais expressivo é a encefalomielite esporádica, além de conjuntivite, pneumonia, encefalite, enterite e poliartrite em animais jovens. As infecções inaparentes são mais freqüentes, com a eliminação da *C. pecorum* nas fezes (KALTENBOECK et al., 2005).

Para o diagnóstico laboratorial da *C. abortus*, a prova de fixação de complemento é a técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e detecta anticorpos produzidos contra o lipopolissacarídeo presente em todos os membros da família *Chlamydiaceae* (STAMP et al., 1952; DONN et al., 1997a; OIE, 2004). A reação cruzada entre a *C. abortus* e a *C. pecorum* e outras bactérias Gram negativas, como *Acinetobacter* spp., é uma desvantagem desta técnica, porém os títulos observados nestas reações são freqüentemente inferiores a 32 (TWOMEY et al., 2006). A sensibilidade da prova de fixação de complemento é diretamente influenciada pela classe de imunoglobulina envolvida na resposta imune que o animal desenvolve frente à infecção. Em bovinos, a resposta humoral desenvolvida nas infecções por *C. abortus* são IgG1 e IgG2, mas somente a IgG1 (presente nas primeiras 3-4 semanas pós-infecção) fixa o

complemento de cobaio (SCHMEER et al., 1987; TWOMEY et al., 2006). Apesar de suas limitações, a prova de fixação de complemento tem sido utilizada em países onde existem programas de controle de abortamentos por *C. abortus* (BUENDÍA et al., 2001; LONGBOTTOM & COULTER, 2003).

Nos ruminantes, os abortamentos são responsáveis por elevadas perdas econômicas na pecuária mundial. Devido sua etiologia multifatorial, é necessária a utilização de provas laboratoriais para a determinação precisa do agente envolvido (OTTE et al., 1995; HÄSSIG & LUBSEN, 1998).

Considerando a escassez de informações no Brasil sobre a infecção por *C. abortus* em bovinos, o objetivo deste trabalho foi estimar a soroprevalência de *Chlamydophila* spp. em propriedades rurais com histórico de abortamento bovino do estado do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

População estudada

Foram estudadas propriedades selecionadas dentro do delineamento amostral, elaborado pelo Departamento de Defesa Animal-MAPA em colaboração com o Setor de Epidemiologia da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB-PR), para o estudo da prevalência de brucelose bovina no estado do Paraná dentro do contexto do Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose (DIAS, 2003). Destas propriedades, foram incluídas no levantamento sorológico para *Chlamydophila* spp. somente aquelas que informaram no questionário epidemiológico a ocorrência de abortamento nos últimos 12 meses.

Foram analisadas 3.102 amostras de soro de fêmeas bovinas, com idade igual ou superior a 24 meses, provenientes de 373 propriedades rurais, distribuídas em sete circuitos produtores selecionados de acordo com as características regionais da produção pecuária.

Amostras de soro

As amostras de sangue foram coletadas por veterinários e técnicos da SEAB-PR, por punção da veia jugular dos animais, utilizando agulha descartável estéril e tubo com vácuo previamente identificado. As amostras de soro obtidas foram armazenadas em microtubos de plástico e congeladas a -20ºC.

Prova de fixação de complemento

A pesquisa de anticorpos contra *Chlamydophila* spp. foi realizada pela prova de fixação de complemento em microplacas (DONN et al.,1997b; LIMA, 2007).

Como antígeno foi utilizada a estirpe S26/3 de *C. abortus*, titulado frente ao soro ovino (controle positivo) com título de 512 para *C. abortus*. Soro fetal bovino (Gibco®-EUA) foi utilizado como soro controle negativo.

Complemento de cobaios (Laborclin®) e hemolisina, anticorpo anti-hemácia de carneiro (Laborclin®) foram utilizados na diluição correspondente a duas unidades hemolíticas. O sistema hemolítico, usado como sistema revelador do teste, foi preparado adicionando igual volume de hemolisina a uma solução de hemácias de carneiro, previamente diluídas a 2,0% (v/v) em tampão veronal (CAMBREX®).

A leitura foi realizada visualmente e os soros que apresentaram a formação de um botão de hemácias na diluição ≥ 32 foram considerados reagentes (OIE, 2004).

Análise estatística

A prevalência estimada por propriedade (foco) foi calculada pelo programa EpiInfo 6 (DEAN et al., 1994). A propriedade foi considerada positiva quando apresentou pelo menos 1 (um) animal reagente na prova de fixação de complemento.

As variáveis relacionadas no questionário epidemiológico para a identificação dos fatores de risco foram: tipo de criação, número total de fêmeas existentes, raça predominante, presença de outras espécies animais, presença de espécies silvestres de vida livre, uso de inseminação artificial, destino de fetos e placentas, compra ou venda de

machos ou fêmeas para reprodução, local de abate dos animais, pastos comuns com outras propriedades, áreas alagadiças em que o gado tem acesso, piquete separado para fêmeas na fase de parto e/ou pós-parto e assistência veterinária. A análise univariada foi realizada para verificar associação entre o status do rebanho para *Chlamydophila* spp. e variáveis de risco, utilizando o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher e o *odds ratio* (OR). Variáveis com valor de $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

RESULTADOS

Dos 3.102 soros de fêmeas bovinas testados, 44 (1,42%) foram positivos na prova de fixação de complemento, com títulos variando entre 32 a 256. Estes soros positivos foram provenientes de propriedades de seis circuitos produtores, dos sete analisados. A prevalência estimada nas propriedades foi de 8,82% (6,15%-12,17%). Os resultados encontrados nos circuitos produtores do estado estão apresentados na tabela 1. Das 33 propriedades positivas, 25 apresentaram apenas um animal positivo. A propriedade com maior número de animais positivos (4/9) era localizada no município de Francisco Beltrão (circuito 7, região sudoeste). As três propriedades amostradas dos municípios de Ivaiporã (circuito 3, região norte pioneiro) e as três de Matelândia (circuito 5, região oeste) apresentaram pelo menos um animal positivo.

A análise univariada das propriedades e das variáveis de risco está apresentada na tabela 2. A OR (*odds ratio*) estimada para a variável tipo de criação foi 2,21 ($1,00<OR<4,87$, $p=0,031$).

DISCUSSÃO

Do total de 3.102 animais, alocados nas 373 propriedades rurais analisadas, 44 (1,42%) apresentaram resultados positivos. A maioria dos animais apresentou título de 32, um animal título de 64, um com 128 e outro com 256. Em bovinos, o desenvolvimento da

resposta imunológica ocorre principalmente após o abortamento, persistindo por vários meses e depois, com a cronicidade da doença os títulos tendem a cair (WILSMORE et al., 1984; SCHMEER et al., 1987). Neste trabalho, o critério de inclusão foram propriedades com histórico de pelo menos um abortamento nos últimos 12 meses. Assim, os baixos títulos observados podem ser decorrentes do declínio de anticorpos em conseqüência da cronicidade da doença ou pela não ocorrência de abortamento nos animais estudados, uma vez que o histórico de abortamento era da propriedade e não dos animais.

A prevalência por propriedades foi de 8,82% (33/373), resultado inferior ao encontrado por IGAYARA-SOUZA et al. (2004) no único levantamento sorológico realizado em bovinos no Brasil, que demonstrou a ocorrência de anticorpos contra *Chlamydophila* em 51,90% (14/27) dos rebanhos avaliados no estado de São Paulo. Na Europa, foram relatadas prevalências variando de 2% a 45% de animais sororreagentes para *C. abortus*, com predominância de títulos de 32 na Itália, Polônia e Alemanha (CAVIRANI et al., 2001; NIEMCZUK, 2005; WEHREND et al., 2005).

A OR da variável tipo de criação mostrou que propriedades com animais confinados ou semiconfinados apresentaram um risco 2,21 (1,00<OR<4,87) vezes maior de serem sororreagentes para *Chlamydophila* spp. em comparação às propriedades com animais criados extensivamente. MAINAR-JAIME et al. (1998), observaram um risco 2,4 vezes maior de ovinos serem sororreagentes para animais de propriedades de exploração leiteira e concluíram que esta associação pode estar relacionada à importância do contato animal na transmissão do microrganismo, que é maior nas criações intensivas. IGAYARA-SOUZA et al. (2004) também encontraram maior freqüência de animais com títulos de 32 em propriedades leiteiras. Duas das variáveis analisadas neste trabalho, mesmo não sendo estatisticamente significativas, apresentaram valor de p próximo a 0,05 e são biologicamente plausíveis como possíveis associações de risco. A variável presença de

ovinos e ou caprinos (p=0,072) está associada ao fato destes animais também serem reservatórios de *C. abortus* e a infecção em ovinos ser mais freqüente e endêmica, enquanto a variável arrendamento de pasto (p=0,086) está diretamente relacionada à introdução de outros animais, com diferentes condições sanitárias, na propriedade (MAINAR-JAIME et al., 1998; LONGBOTTOM & COULTER, 2003; DEGRAVES et al., 2004).

CONCLUSÃO

A soroprevalência de *Chlamydophila abortus* encontrada indica a presença da doença nas propriedades rurais analisadas do estado do Paraná.

Apenas o tipo de criação foi considerado uma associação de risco para a infecção por *Chlamydophila* spp..

AGRADECIMENTO

Ao professor Dr. Carlo Turilli (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova, Itália) pela doação da estipe S26/3 de *Chlamydophila abortus* e do soro ovino com título de 512 para *C. abortus*.

REFERÊNCIAS:

BUENDÍA, A.J. et al. Field evaluation of a new commercially avaiable ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. **Veterinary Microbiology**, v.78, p.229-239, 2001.

CAVIRANI, S. et al. Association between *Chlamydia psittaci* seropositivity and abortion in Italian dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.50, p.145-151, 2001.

CORSARO, D. et al. Increasing diversity within Chlamydial. **Critical Review in Microbiology**, v.29, n.1, p.37-78, 2003.

DEAN, A.G. et al. **Epi Info, Version 6: a word processing, data base and statistics program for epidemiology on microcomputers**. Atlanta, Georgia, USA: Centers for Disease Control and Prevention, 1994.

DEGRAVES, F.J. et al. Reinfection with *Chlamydophila abortus* by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to *Chlamydophila*. **Infection and Immunity**, v.72, n.5, p.2538-2545, 2004.

DIAS, J.A. **Soroepidemiologia da brucelose bovina e bubalina no estado do Paraná.** 2003. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de Concentração Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina.

DONN, A. et al. Serological diagnosis of chlamydial abortion in sheep and goats: comparison of the complement fixation test and an enzyme-linked immunosorbent assay employing solubilised proteins as antigen. **Veterinary Microbiology**, v.59, p.27-36, 1997a.

DONN, A. et al. Standardizzazione della tecnica di fissazione del complemento per la dimostrazione di anti-chlamydia nel siero de sangue. **II Progresso Veterinário**, v.4, p.125-128, 1997b.

EVERETT, K.D.E. Chlamydial and Chlamydiales: more than meet the eye. **Veterinary Microbiology**, v.75, p.109-126, 2000.

GRIFFITHS, P.C. et al. Epizootic bovine abortion in a dairy herd: characterization of a ***Chlamydia psittaci*** isolate and antibody response. **British Veterinary Journal**, v.151, n.6, p.683-693, 1995.

HÄSSIG, M.; LUBSEN, J. Relationship between abortions and seroprevalences to selected infectious agents in dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.45, p.435-441, 1998.

IGAYARA-SOUZA, C.A. I. et al. Ocorrência de anticorpos anti-chlamydophila em bovinos e sua relação com distúrbios reprodutivos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.1, p.28-33, 2004.

KALTENBOECK, B. et al. Bovine *Chlamyophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? **Veterinary Research Communications**, v.29 (suppl. 1), p.1-15, 2005.

LIMA, B.A.C. **Prevalência de anticorpos contra *Chlamydophila* spp em ovinos de propriedades localizadas na região de Londrina, Paraná.** 2007. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área de Concentração Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina.

LONGBOTTON, D.; COULTER, L.J. Animal chlamidiosis and zoonoic implication. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p.217-244, 2003.

MAINAR-JAIME, R.C. et al. Epidemiologic study of chlamydial infection in sheep farms in Madrid, Spain. **Small Ruminant Research**, v.28, p.131-138, 1998.

NIEMCZUK, K. Prevalence of antibodies against *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* in cattle in Poland. A preliminary report. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.49, p.293-297, 2005.

O.I.E (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH). Ovine chlamydiosis. In: **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 5th edition**. Paris: OIE, 2004. Acessado em 02.10.2006. Online. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00073.htm.

OTTE, M.J. et al. A pilot study of elevated abortion and stillbirth ratios in cattle in the foothills of the Eastern plains of Colombia. **Preventive Veterinary Medicine**, v.22, p.103-113, 1995.

SCHACHTER, J.; CALDWELL, H.D. ***Chlamydiae***. **Annual Review of Microbiology**, v.34, p.285-309, 1980.

SCHMEER, N. et al. Dominance of *Chlamydophila psittaci*-specific IgG2 subclass in the humoral responses of naturally and experimentally infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.15, p.311-322, 1987.

STAMP, J.T. et al. Enzootic abortion in ewes: complement fixation test. **Journal of Comparative Pathology**, v.62, p.93-101, 1952.

TRÁVNICEK, M. et al. Serological response of cattle to *Chlamydophila abortus* in Slovakia in 1996-2000. **Polish Journal of Veterinary Science**, v.51, n.1, p.25-7, 2002.

TWOMEY, D.F. et al. An investigation into the role of *Chlamydophila* spp. in bovine upper respiratory tract disease. **The Veterinary Journal**, v.171, p.574-576, 2006.

WEHREND, A. et al. Production, reproductive, and, metabolic factors associated with chlamydial seropositivity and reproductive tract antigens in dairy herds with fertility disorders. **Theriogenology**, v.63, p.923-930, 2005.

Tabela 1. Resultados da prova de fixação de complemento para *Chlamydophila* spp. em propriedades rurais, com histórico de abortamento, de sete circuitos produtores do estado do Paraná-Brasil, 2007.

Circuitos produtores	**Nº propriedades avaliadas**	
	Total	**Positivas (%)**
1 (região noroeste)	46	3 (6,52%)
2 (região centro-oeste/norte)	63	3 (4,76%)
3 (região norte pioneiro)	60	8 (13,33%)
4 (região centro-sul)	50	0 (0%)
5 (região oeste)	56	8 (14,29%)
6 (região leste/sul)	54	9 (16,67%)
7 (região sudoeste)	44	2 (4,54%)
Total	373	33 (8,82%)

Tabela 2. Associação de variáveis e soroprevalência para *Chlamydophila* spp em propriedades rurais com histórico de abortamento do estado do Paraná-Brasil, 2007.

Variáveis	Propriedades avaliadas		Valor de p
	Positivos (33)	Negativos (373)	
Tipo de criação			
confinado + semiconfinado	15	97	p=0,031*
extensivo	17	243	
Tipo de exploração			
leite	17	154	
misto	8	123	p=0,380
corte	8	64	
Número total de fêmeas bovinas			
< 35 fêmeas	7	126	p=0,071
> 35 fêmeas	26	215	
Raça predominante			
outras	19	185	p=0,718
puras	13	145	
Presença de outros animais na propriedade			
Ovino/caprino			
sim	2	63	p=0,072**
não	31	278	
Equídeos			
sim	20	239	p=0,260
não	13	102	
Suínos			
sim	20	240	p=0,244
não	13	101	
Aves			
sim	27	306	p=0,236**
não	6	35	
Cão			
sim	31	131	p=1,000**
não	2	28	
Gato			
sim	24	257	p=0,738
não	9	84	
Silvestres			
sim	7	102	p=0,297
não	26	239	
Inseminação artificial (IA)			
só IA	3	41	
IA / monta natural	5	48	p=0,882
não usa	24	244	
Destino de fetos abortados			
não faz nada/alimenta porco e cão	20	172	p=0,186
enterra/joga/queima	11	158	
Compra de reprodutores			
sim	19	182	p=0,681
não	14	156	
Venda de reprodutores			
sim	9	117	p=0,389
não	24	220	
Abate dos bovinos			
na própria fazenda	7	55	p=0,422
não abate/abate com e sem inspeção	25	282	
Arrendamento de pasto			

sim	10	61	p=0,086
não	23	278	
Pasto comum a outras propriedades			
sim	4	57	p=0,491
não	29	283	
Áreas alagadiças			
sim	8	81	p=0,994
não	29	254	
Piquete de parição			
sim	20	117	p=0,602
não	23	219	
Assistência Veterinária			
não	21	206	p=0,66
sim	11	128	

* Significância estatística p≤ 0,05
** Teste exato de Fisher

4. CONCLUSÕES

- A técnica de PCR para o espaço intergênico 16S-23S RNAr, mostrou sensibilidade superior, quando comparada à técnica previamente descrita para o gene *omp*, para o diagnóstico e identificação da *C. abortus* em amostras de camundongos inoculados experimentalmente.
- Apesar da falta de evidência da *C. abortus* nas amostras de aborto, muco vaginal e sêmen avaliadas pela PCR, neste trabalho, a importância econômica da doença e o seu potencial zoonótico justificam a realização de mais estudos sobre a ocorrência e a epidemiologia da *C. abortus* e das outras espécies de *Chlamydophila* nos rebanhos bovinos, ovinos e caprinos brasileiros.
- A soroprevalência de *Chlamydophila* spp. encontrada indica a presença da doença nas propriedades rurais analisadas do estado do Paraná.
- Apenas o tipo de criação foi considerado uma associação de risco para a infecção por *Chlamydophila* spp. do estado do Paraná.
- Os resultados encontrados justificam a pesquisa de *Chlamydophila* no diagnóstico das doenças reprodutivas de bovinos.

APÊNDICES

APÊNDICE A: lista de reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25µmol cada solução (100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP) (Invitrogen Life Technologies®)
2. tampão de PCR 10 x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies®)
3. 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies®)
4. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
5. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
6. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83
7. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
8. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_22H_2O$) P.M. 372,24 (Reagen®)
9. Agarose (Gibco BRL®)
10. Álcool etílico absoluto (C_2H_2OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
11. Álcool isoamílico ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) P.M. 88,15 (Synth®)
12. Azul de bromofenol (Sigma®)
13. Cloreto de Potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
14. Cloreto de Sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
15. Clorofórmio, P.A. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
16. Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}N_3Br$) P.M. 394,3 (Sigma®)
17. Glicina, P.A. (Nuclear®)
18. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
19. *Alu*I (5'- AG↓CT -3', 3'- TC↑GA – 5') 2500 units; 10 U/µl (Invitrogen Life Technologies®)
20. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)
21. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®
22. Metanol, P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
23. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 unidades (Invitrogen Life Technologies®)
24. Sacarose, P.A. – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) P.M. 342,31 (Reagen®)
25. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma®)
26. Triton x-100

27. Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) P.M. 192,13 (Synth®)
28. Citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) P.M. 294,10 (Synth®)
29. Glicose, P.A. – dextrose ($C_6H_{12}O_6$) P.M. 180,16 (Biotec®)
30. Soro fetal bovino (Gibco®-USA)
31. Tampão veronal (CAMBREX®)
32. Hemolisina (Laborclin®)
33. Complemento de cobaios (Laborclin®)
34. Hemácias de carneiro em solução de Alsever (Laborclin®)

APÊNDICE B: Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**

  - 60 g de sílica (Sigma®)
  - Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
  - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
  - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
  - Ressuspender a sílica em 500 ml de água bidestilada
  - Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar
  - Desprezar 440 mL do sobrenadante
  - Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
  - Aliquotar e autoclavar

- **Solução L6**

  - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
  - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
  - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
  - 2,6 mL de Triton x 100

- **Solução L2**

  - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
  - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de Amostra**

  - Azul de bromofenol 0,25%
  - Sacarose – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%

- **Tampão de corrida: TRIS – Ácido bórico – EDTA (TBE) 10 x**

  - 0,89 M TRIS
  - 0,89 M ácido bórico
  - 0,02 M EDTA dissodium
  - Água bidestilada qsp. 1 litro

    pH = 8,4

- **Tampão fosfato salina (PBS)**

  -137 mM cloreto de sódio (NaCl)

  - 3 mM cloreto de potássio (KCl)

  - 8 mM sódio fosfato dibásico anidro (Na_2HPO_4)

  - 15 mM potássio fosfato monobásico ($K_2H_2PO_{4)}$

  - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 litro

    pH = 7,2

- **Solução de Alsever**

  - 20,5 g de glicose ($C_6H_{12}O_6$)

  - 8 g de citrato de sódio

  - 4,2 g de cloreto de sódio (NaCl)

  - 0,55 g de ácido cítrico

  - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 litro

    pH = 6,1

APÊNDICE C: Protocolo de Técnicas

- **Extração do DNA: sílica/ tiocianato de guanidina**

  - 300 μL de suspensão (macerados de órgãos, muco vaginal ou sêmen)
  - 30 μL de sílica hidratada
  - 1000 μL de solução L6
  - Homogeneizar em vórtex
  - Agitar durante 30 minutos em temperatura ambiente
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos
  - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
  - Adicionar 500 μL de solução L2
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos
  - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
  - Adicionar 500 μL de solução L2
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos
  - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
  - Adicionar 1 mL de etanol a 70%
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos
  - Desprezar sobrenadante
  - Adicionar 1 mL de etanol a 70%
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos
  - Desprezar sobrenadante
  - Adicionar 1 mL de acetona PA
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 1 minuto
  - Desprezar sobrenadante
  - Secar o pellet em banho-maria à 56^{o} C durante 15 minutos (tubo aberto)
  - Adicionar 50 μL de água MilliQ autoclavada
  - Homogeneizar em vórtex

- Banho-maria à 56^{o} C durante 15 minutos (tubo fechado)
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 2 minutos
- Recolher sobrenadante em eppendorf de 0,5 µL
- Estacar a -20ºC

- **Digestão enzimática dos produtos de PCR – *Alu* I**
  - 1 µL da enzima de restrição *Alu* I
  - 2 µL do tampão da enzima (REACT 2)
  - 7 µL de água ultrapura estéril
  - 10 µL do produto da PCR
  - Incubar a 37ºC durante 1 a 2 horas

- **Gel de agarose a 2%**
  - 1 g de agarose
  - 50 mL TEB 1 x
  - 30 µL brometo de etídeo

- ***Omp* PCR (HARTLEY et al, 2001)**
  - 10 µL de DNA extraído

- Adicionar a 45 µL de PCR mix constituído de tampão PCR 1x (20mM Tris-HCl, pH 8,4 e 50mM KCl), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada *primer*, 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase e água ultra pura estéril para o volume final de 50 µL

- A reação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research Co. Water Town, MA, EUA) com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa inicial de 4 min/94 ^{o}C; 40 ciclos de 1 min/94 ^{o}C, 1min/55 ^{o}C, 1 min/72 ^{o}C e uma etapa final de 7 min/72 ^{o}C.

- **Fixação de complemento**
  - Diluir as hemácias de carneiro a 2,0% em tampão veronal (CAMBREX®)

- Diluir a hemolisina a duas unidades hemolíticas
- Diluir o complemento a duas unidades hemolíticas
- Preparar o sistema hemolítico, adicionando igual volume de hemolisina à solução de hemácias a 2,0%
- Incubar em banho-maria a 37ºC durante 15 minutos para sensibilização das hemácias
- Inativar os soros testes a 58ºC por 30 min e diluí-los em tampão veronal de 1:32 a 1:1024
- Adicionar em cada poço da microplaca de titulações 25 µL de soro, 25µL do antígeno e 25µL de complemento
- Agitar por 2 min
- Incubar a 37ºC por 30 minutos
- Adicionar 25µL do sistema hemolítico à microplaca de tiutlação
- Agitar por 2 min
- Incubar a 37ºC por 30 minutos
- Centrifugação a 1000 g por 2 min
- Leitura realizada visualmente

ANEXOS

NORMAS PARA PUBLICAÇAO

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos e notas devem ser encaminhados em três vias, revisões bibliográficas em quatro vias, datilografados e/ou editados em idioma Português ou Inglês e paginados. O trabalho deverá ser digitado em folha com tamanho A4 210 x 297mm, **com no máximo, 28 linhas em espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações**. Cada figura, ilustração ou tabela eqüivale a uma página. Enviar a forma digitalizada somente quando solicitada.

3. O **artigo científico** deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Agradecimento(s); Fontes de Aquisição, quando houver, e Referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas**. (Modelo .doc, pdf).

4. A **revisão bibliográfica** deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas**. (Modelo .doc, pdf).

5. A **nota** deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto [sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão (podendo conter tabelas ou figuras)]; Fontes de Aquisição, quando houver, e Referências. **Antes das referências deverá também ser descrito quando apropriado que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas**. (Modelo .doc, pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista (www.scielo.br/cr).

7. Os nomes dos autores deverão ser colocados por extenso abaixo do título, um ao lado do outro, seguidos de números que serão repetidos no rodapé, para a especificação (departamento, instituição, cidade, estado e país) e indicação de autor para correspondência (com endereço completo, CEP e obrigatoriamente E-mail). Faculta-se a não identificação da autoria em duas cópias dos artigos enviados.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos:
Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas conforme ABNT (NBR 6023/2000).

9.1. Citação de livro:
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.
TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques. 3.ed. New York** : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:
AUDE, M.I.S. et al. (Mais de 2 autores) Época de plantio e seus efeitos na produtividade e teor de sólidos solúveis no caldo de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.22, n.2, p.131-137, 1992.

9.5. Resumos:
RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:
COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas caracterísitcas digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:
ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:
identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:
MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

LeBLANC, K.A. **New development in hernia surgery**. Capturado em 22 mar. 2000. Online. Disponível na Internet http://www.medscape.com/Medscape/surgery/TreatmentUpdate/1999/tu01/public/toc-tu01.html.
UFRGS. Transgênicos. **Zero Hora Digital**, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: http://www.zh.com.br/especial/ index.htm.

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. Tabelas e figuras devem ser enviadas à parte, cada uma sendo considerada uma página. **Os desenhos e gráficos** (em largura de 7,5 ou 16cm) **devem ser feitos em editor gráfico impresso a laser, em papel fotográfico glossy sempre em qualidade máxima**, e devem conter no verso o nome do autor, orientação da borda superior e o número das legendas correspondentes, as quais **PODEM** estar em folhas à parte. **Alternativamente, após aprovação as figuras poderão ser enviadas digitalizadas com ao menos 800dpi, em extensão .tiff**. Fotografias, desenhos e gráficos devem ser enviados, obrigatoriamente, em três vias. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. O ofício de encaminhamento dos artigos deve conter, **obrigatoriamente**, a assinatura de todos os autores ou termo de compromisso do autor principal, responsabilizando-se pela inclusão dos co-autores.

13. Lista de verificação (Checklist pdf ou doc)

14. Taxas de publicação e tramitação
A Ciência Rural tem taxas de tramitação e publicação. **Para trabalhos enviados a partir de 01/01/2007 a taxa de tramitação será de US$ 15,00 e a taxa de publicação de US$ 20,00** por página impressa. A taxa de US$20,00 é obrigatória também para todos os trabalho publicados a partir de 2007. **Os pagamentos deverão ser feitos em reais (R$), de acordo com a taxa de câmbio comercial do dia**. Essas taxas deverão ser pagas no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 250945-8 em nome da FATEC - Projeto 96945. Alternativamente, poderá ser enviado um cheque no valor correspondente em nome da FATEC. Pagamentos por **cartão de crédito VISA** (pdf ou doc) e por boleto bancário (pdf ou doc) são também aceitos. A submissão do artigo (modelo pdf ou doc) deverá ser obrigatoriamente acompanhada do recibo da taxa de tramitação (cheque correspondente ou cartão de crédito). **A taxa de submissão e publicação é obrigatória para todos os trabalhos, independentemente do autor ser assinante da Revista**. A taxa de publicação (Faça o download do arquivo para pagamento da taxa de publicação, pdf ou doc) somente deverá ser paga (e o comprovante anexado) após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores. **Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação**. **No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de US$ 120,00 por página colorida impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página**. Este pagamento também deverá ser realizado até a publicação do artigo rubricado obedecendo uma das formas previamente mencionadas. O pagamento da taxa de publicação poderá ser realizado por boleto bancário (pdf ou doc), no caso de pessoa física fornecer o CIC e no caso de pessoa jurídica CNPJ em ambos os casos o endereço completo é obrigatório para a emissão da fatura.

15. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

16. Os artigos não aprovados serão devolvidos.

17. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Universidade Estadual de Londrina

Governo do Paraná

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 27/2005 Londrina, 21 de julho de 2005

Prezado Pesquisador

O CEEA/UEL, reunido aos 19 de julho do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado **"Pesquisa de *Chlamydophila abortus* em bovinos utilizando diferentes técnicas de identificação"**, registrado no CEEA sob o nº 19/05, processo nº 15970/2005, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o aprovado para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor Lisbôa
Coordenador do CEEA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Júlio César de Freitas
Coordenador do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias

Cópia para Paulo Sérgio Basoli (Chefe da DCA/PROPPG)

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

PESQUISA DE *CHLAMYDOPHILA ABORTUS* EM BOVINOS E OVINOS COM PROBLEMAS REPRODUTIVOS

Eu,_____, RG_____, proprietário do(s) animal(ais) _____ da propriedade _____ concordo em participar da pesquisa "Pesquisa de C*hlamydophila abortus* em bovinos e ovinos com problemas reprodutivos" que tem por objetivo pesquisar a ocorrência da bactéria *Chlamydophila abortus* em fetos abortados e a presença de anticorpos contra C*hlamydophila abortus* no soro de fêmeas bovinas e ovinas de propriedades rurais.

A coleta de sangue será realizada por um profissional habilitado, utilizando apenas material estéril e descartável. O material biológico será utilizado apenas para a elaboração desta pesquisa, ou seja, não será usado para qualquer outro tipo de análise. O mesmo será destruído ao término da pesquisa.

Será disponibilizada toda a informação sobre os resultados dos exames e orientações sobre medidas sanitárias a serem tomadas.

Estou ciente que as informações adquiridas são confidenciais e quando divulgados os resultados do trabalho (exclusivamente publicações científicas) serão de forma global e anônima, pois minha identidade será totalmente preservada. Sei também que não precisarei efetuar qualquer pagamento.

Em caso de dúvidas posso esclarecer com a pesquisadora, a médica veterinária Francielle Gibson da Silva, pelo telefone (43) 33714259, ou com o coordenador da pesquisa Dr. Julio Cesar de Freitas, professor de Doenças Infecciosas do Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, pelo telefone (43) 33714765. Entendo que tenho a liberdade de suspender a autorização para coleta de amostras a qualquer momento e de me recusar a participar, sem que isso acarrete prejuízo à continuidade da realização dos exames nas amostras já coletadas.

Londrina,.....de ..... de .....

ASSINATURA: _____

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo