

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA (CLÍNICA E
REPRODUÇÃO ANIMAL)

BÁRBARA SOUZA NEIL MAGALHÃES

**PESQUISA DE *Mycoplasma* spp. E *Chlamydia* spp. EM AVES E SERPENTES
DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO**

Niterói, RJ

2019

BÁRBARA SOUZA NEIL MAGALHÃES

**PESQUISA DE *Mycoplasma* spp. E *Chlamydia* spp. EM AVES E SERPENTES
DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientadora:

Profª Drª Nádia Regina Pereira Almosny

Coorientadora:

Profª Drª Virginia Léo de Almeida Pereira

Niterói, RJ

2019

Ficha catalográfica automática - SDC/BFV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

M188p Magalhães, Bárbara Souza Neil
Pesquisa de Mycoplasma spp. e Chlamydia spp. em aves e
serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro / Bárbara Souza
Neil Magalhães ; Nádia Regina Pereira Almosny, orientadora ;
Virginia Léo de Almeida Pereira, coorientadora. Niterói,
2019.
110 f. : il.

Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Niterói,
2019.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/MPV-CV.2019.d.11153273721>

1. Micoplasmose. 2. Clamidiose. 3. Squamata. 4. Aves
silvestres. 5. Produção intelectual. I. Almosny, Nádia
Regina Pereira, orientadora. II. Pereira, Virginia Léo de
Almeida, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense.
Faculdade de Veterinária. IV. Título.

CDD -

BÁRBARA SOUZA NEIL MAGALHÃES

**PESQUISA DE Mycoplasma spp. E Chlamydia spp. EM AVES E SERPENTES
DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 16 de outubro de 2019

BANCA EXAMINADORA

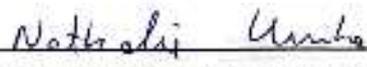


Prof.ª Dr.ª Nádia Regina Pereira Almosny - UFF

Orientadora



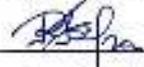
Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar - UFF



Prof.ª. Dr.ª. Nathalie Costa da Cunha - UFF



Prof. Dr. Daniel de Almeida Balthazar – UFRRJ



Dr.ª Rita de Cassia Figueira da Silva - PESAGRO

Niterói, RJ

2019

À minha família, meu bem maior, dedico esta e todas as conquistas passadas e que não de vir, pois sua torcida e fé sempre me foram dedicadas

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua criação, por me dar forças para seguir nessa caminhada, porque ele é bom para mim e coloca pessoas maravilhosas em minha vida.

Aos meus pais, Paulo e Dorotéia, que sempre acreditaram e torceram por mim, não medindo esforços (com muito amor) para que eu chegasse até aqui.

Às minhas irmãs, Débora e Tamara que, apesar da distância, estão sempre comigo, torcendo pelo meu sucesso e me tendo como exemplo em suas vidas.

Ao meu marido, Rafael, que esteve comigo nos momentos mais difíceis e nos mais alegres, desde o nosso pré-vestibular, compreendendo que a profissão e a carreira que escolhi não são fáceis.

Aos meus filhos de quatro patas, Jack e Drica, que deixam meus dias mais coloridos e minhas sobrinhas, também de quatro patas, Liza e Biscuit.

A toda minha família, especialmente minha prima Luísa, que sempre me incentivou e fez com que a mágica dos nossos sonhos acontecesse.

Aos meus amigos que alegam meus dias e entendem que nem sempre posso estar presente, mas que isso não muda em nada nossa amizade. Vocês são fundamentais na minha vida.

Aos meus companheiros da UFRJ, que são pessoas maravilhosas, que de cara acreditaram em mim e me apoiam quando estou desanimando.

À equipe do Riozoo, principalmente Dr. Luiz Paulo, que com sua sabedoria e tranquilidade sempre tem um bom conselho a dar e aos biólogos, veterinários e estagiários da antiga Fundação, que faziam os dias de coleta serem leves e alegres.

À minha primeira orientadora, Flavya, que aceitou me orientar com tanta dedicação e carinho, como foi no TCC.

À minha orientadora, Nádia, que topou o desafio e me abraçou sem vacilar, agradeço demais a confiança e carinho.

À minha coorientadora, Virginia, pessoa fundamental no direcionamento do meu projeto, que sempre acreditou em mim e me incentivou a seguir em frente sempre com muita dedicação e amizade, não sei o que seria de mim sem ela.

A todos os professores e alunos do MSV, sem os quais meu estudo não seria possível, em especial ao Elmiro, Dayse, Nathalie, Leandro, Thomas, Arthur e Mariane. Não citarei outros nomes, pois foram muitos que me ajudaram e corro o risco de ser injusta ao esquecer alguém.

Ao Professor e amigo Daniel, que foi quem plantou a sementinha que originou o tema do meu projeto e sempre me ajudou a encontrar os caminhos a seguir.

Aos membros da banca, que prontamente aceitaram meu convite e disponibilizaram seu tempo para estar aqui.

Às instituições de fomento, FAPERJ, CAPES e CNPq, que contribuíram para a realização desse trabalho, ao Riozoo e à Plataforma de Sequenciamento da FIOCRUZ.

Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.

Ana Carolina Vilela Da Costa

RESUMO

Micoplasmose e clamidiose são doenças de grande importância em animais sob cuidados humanos por causarem alterações respiratórias e reprodutivas, alta mortalidade e morbidade. O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp. em aves e serpentes no Zoológico do Rio de Janeiro (Riozoo). Para pesquisa de *Mycoplasma* spp., foram estudados 81 indivíduos do plantel total de 635 aves, contidos para exames rotineiros de avaliação da condição de saúde e pertencentes às Ordens Psittaciformes (n=45), Accipitriformes (n=18), Galliformes (n=7), Piciformes (n=5), Strigiformes (n=4), Falconiformes (n=1) e Cariamiformes (1), além de 82 patos-crioulos de vida livre. No cultivo, não houve isolamento de *Mycoplasma* spp. em nenhuma das amostras testadas das aves do plantel, já à PCR, 63,0% (51/81) foram positivas para presença de bactéria da classe Mollicutes, 1,2% (1/81) para *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e 12,3% (10/81) para *M. sinoviae* (MS). Já nos patos, foram isoladas bactérias da Classe Mollicutes em 21,9% (18/82) das amostras e à PCR, 17,1% (14/82) foram positivas para Mollicutes, sendo 6,1% (5/82) MG e 3,6% (3/82) MS. Amostras de patos no sequenciamento, apresentaram similaridade com MG (GenBank MN067530); *Acholeplasma laidlawii*; *Acholeplasma* spp.; *M. glycyphilum*; *M. columborale*; *M. gallinaceum* e *M. ansersalpingitis*. Também foram estudadas todas as 26 serpentes do Riozoo por isolamento e PCR para *Mycoplasma* spp. Ao isolamento, houve positividade em 19,23% (5/26), enquanto à PCR, a positividade foi de 65,38% (17/26). Nas sequências obtidas houve similaridade (95 a 97%) com *M. agassizii*, *M. testudineum* e algumas espécies de micoplasmas ainda não identificadas encontradas em quelônios. Pela primeira vez foi observado *Mycoplasma* spp. em indivíduos das famílias Boidae e Viperidae. Para o estudo de *Chlamydia* spp. foram testados 123 animais: sete serpentes (Família Pythonidae), 68 aves das Ordens Psittaciformes (n=48), Galliformes (n=6), Accipitriformes (n=5), Piciformes (n=3), Strigiformes (n=4), Falconiformes (n=1) e Cariamiformes (n=1) e 48 indivíduos da espécie *Cairina moschata* (pato-crioulo) de vida livre, dos quais foram coletados suabes cloacais e nenhum foi positivo. Estudos mais aprofundados sobre a presença de *Chlamydia* spp. são necessários para estudo da epidemiologia desse agente em animais de zoológicos. A presença de *Acholeplasma* spp., e *Mycoplasma* spp. em aves e serpentes do Riozoo confirma a circulação destes agentes e a necessidade de mais estudos sobre sua disseminação e análise epidemiológica em zoológicos.

Palavras-chave: Clamidiose, micoplasmose, Squamata, aves silvestres

ABSTRACT

Mycoplasmosis and chlamydiosis are diseases of great importance in animals under human care, because they cause respiratory and reproductive disorders, high mortality and morbidity. The aim of this study was looking for *Mycoplasma* spp. and *Chlamydia* spp. in birds and snakes at Rio de Janeiro Zoo (Riozoo). For detection of *Mycoplasma* spp. 81 birds were studied from the 635 avian flocks, when taken for routine health assessment evaluations, belonging to the following Orders: Psittaciformes (n=45), Accipitriformes (n=18), Galliformes (n=7), Piciformes (n=5), Strigiformes (n=4), Falconiformes (n=1) and Cariamiformes (n=1) and 82 free-living Muscovy ducks. There was no isolation of Mollicutes in any of the tested samples of the birds of the stock, but at PCR, 63.0% (51/81) of them were positive for Mollicutes, 1.2% (1/81) for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and 12.3% (10/81) for *M. sinoviae* (MS) and 17.1% (14/82). In the Muscovy ducks, 21.9% (18/82) were positive in isolation and at PCR 17,1% (14/82) were positive for Mollicutes, being 6.1% (5/82) MG and 3.6% (3/82) MS. Ducks samples in sequencing showed similarity with MG (GenBank MN067530); *Acholeplasma laidlawii*; *Acholeplasma* spp. ; *M. glycyphilum*; *M. columborale*; *M. gallinaceum* and *M. ansersalpingitis*. All 26 snakes from Riozoo were also studied for isolation and PCR for *Mycoplasma* spp. Upon isolation, there was positivity in 19.23% (5/26), whereas in PCR, the positivity was 65.38% (17/26). In the sequences obtained there was similarity (95 to 97%) with *M. agassizii*, *M. testudineum* and some species of unidentified mycoplasmas found in chelonians. This is the first report of *Mycoplasma* spp. in individuals of families Boidae and Viperidae. For the study of *Chlamydia* 123 animals were tested: seven snakes (Pythonidae), 68 birds, Orders Psittaciformes (n=48), Galliformes (n=6), Accipitriformes (n=5), Piciformes (n=3), Strigiformes (n=4), Falconiformes (n=1) and Cariamiformes (n=1) and 48 free-living *Cairina moschata* (Muscovy ducks), from which cloacal swabs were collected, neither was positive. The presence of *Acholeplasma* spp., MG and *Mycoplasma* spp. in avian and snakes of Riozoo confirms the circulation of these agents and the need for further studies on the dissemination and epidemiological analysis of mycoplasmas in zoos. Further studies on the presence of *Chlamydia* spp. are necessary to study the epidemiology of this agent in zoo animals

Keywords: Chlamydiosis, mycoplasmosis, Squamata, wild birds

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, TABELAS E QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1 Lista dos micoplasmas mais frequentes que afetam as aves e seus hospedeiros usuais, p. 20

CAPÍTULO I: Investigation of *Mycoplasma* spp. in birds of the Rio de Janeiro Zoo by isolation and PCR.

Table 1 Order, species, common name and number of birds of the Rio de Janeiro Zoo evaluated for the detection of *Mycoplasma* spp., p 42

Table 2 Primer oligonucleotides for PCR for detection of avian *Mycoplasma* with their sequences, amplified product size and reference, p.43

Table 3 Isolation and PCR detection of *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by the order of the birds of Rio de Janeiro Zoo, p.43

CAPÍTULO III: *Mycoplasma* spp. in captive snakes (*Boa constrictor* and *Bothrops atrox*) from Brazil.

Figure 1 Phylogenetic tree inferred by using the Maximum Likelihood method in MEGA X of six 16S rRNA sequences of *Mycoplasma* sp. obtained from captive snakes from the Rio de Janeiro Zoo, RJ, Brazil (◇), compared to others *Mycoplasma* sequences from reptiles deposited in GenBank database., p.68

Table 1 Primers, expected amplicon size for detection of *Mycoplasma* spp., p. 69

Table 2 Snakes tested for *Mycoplasma* spp. grouped by family, species and identification number of each the animal, results for clinical signs and presence/absence of *Mycoplasma* by isolation and PCR, and accession number of the sequences deposited in GenBank database., p. 70

CAPÍTULO IV: Estudo Epidemiológico Transversal sobre a Infecção por *Chlamydia* spp. em Aves e Serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Quadro 1 Ordem, espécie, nome popular e número de animais coletados., p. 80

LISTA DE ABREVIATURAS

CE	Corpo Elementar
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais de Laboratório
CF	Fixação de Complemento
CFSPH	Center For Food Security And Public Health
CR	Corpo Reticular
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTRS	Doenças do Trato Respiratório Superior
EBA	Aglutinação de Corpos Elementares
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
G	Força G
GI	Inibição do Crescimento
HI	Inibição da Hemaglutinação
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IgM	Imunoglobulina M
LGV	Vírus do Grupo Psitacose
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
MLVA	Multiple locus variable number tandem repeat analysis
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
Mssp.	Classe Mollicutes
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
Pb	Pares de Base
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RNA	Ácido Ribonucleico
SAR	Teste de Soroaglutinação Rápida
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
UV	Ultravioleta
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 AVES DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO	15
2.2 RÉPTEIS DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO	16
2.3 MANUTENÇÃO DE ANIMAIS <i>EX SITU</i> E PRINCIPAIS AFECÇÕES	16
2.4 MICOPLASMOSE	18
2.4.1 Histórico e Etiologia	18
2.4.2 Hospedeiros	20
2.4.2.1 Micoplasmas em Aves Silvestres	21
2.4.2.2 Micoplasmas em Répteis	22
2.4.3 Ciclo Biológico Vias de Eliminação e Transmissão	23
2.4.4 Sinais Clínicos	24
2.4.5 Diagnóstico	25
2.5 CLAMIDIOSE	26
2.5.1 Histórico e Etiologia	26
2.5.2 Hospedeiros	28
2.5.2.1 Clamídia em Aves Silvestres	28
2.5.2.2 Clamídia em Répteis	29
2.5.3 Ciclo Biológico, Vias de Eliminação e Transmissão	30
2.5.4 Sinais Clínicos	31
2.5.5 Diagnóstico	32
3 OBJETIVOS	35
3.1 GERAIS	35
3.2 ESPECÍFICOS	35
4 CAPÍTULO I: Investigation of <i>Mycoplasma</i> spp. in birds of the Rio de Janeiro Zoo by isolation and PCR	36
5 CAPÍTULO II: Occurrence of Avian Mycoplasmas in Free-Living Muscovy-Ducks (<i>Cairina Moschata</i>)	44
6 CAPÍTULO III: <i>Mycoplasma</i> spp. in captive snakes (<i>Boa constrictor</i> and <i>Bothrops atrox</i>) from Brazil	54

7 CAPÍTULO IV: Estudo Epidemiológico Transversal sobre a Infecção por <i>Chlamydia</i> spp. em Aves e Serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.	72
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÊNDICE	95
ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

As aves são um dos grupos animais mais estudados e valorizados no mundo, tanto por seu valor na criação comercial para consumo quanto como aves ornamentais e de companhia. Existem mais de 11.000 espécies diferentes com uma variedade extraordinária. Algumas delas ocorrem em abundância e outras são representadas por poucos indivíduos remanescentes (SICK, 1997; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2018). Estima-se que no Brasil haja de 1600 a 1900 espécies de aves, sendo mais de 10% delas, endêmicas, o que faz com que seja um dos países com maior avifauna do mundo (LEWINSOHN; PRADO, 2005).

Já as serpentes, que possuem distribuição cosmopolita, são historicamente temidas, devido à possibilidade de acidentes ofídicos por algumas espécies. A temperatura influencia seu metabolismo e todas as suas atividades. Existem espécies terrícolas, arborícolas, aquáticas e fossórias, que exploram ambientes sob o folhço, dentro de troncos em decomposição e pedras. O período de inatividade é amplamente diurno, quando as espécies são encontradas predominantemente em repouso enroladas. No mundo, existe cerca de 2.900 espécies de serpentes que fazem parte da Ordem Squamata, subordem Serpentes, das quais em nosso país existem 371 espécies de 81 gêneros, representantes de nove famílias (BÉRNILS, 2010).

Devido ao crescimento no interesse em criações de animais silvestres como “pets” e aos altos valores cobrados por criadores legalizados, tem aumentado a captura desses animais na natureza para o comércio ilegal. Na maioria das vezes, quando são apreendidos por autoridades ambientais, estão em péssimas condições e são levados para Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) para os primeiros cuidados até que seja encontrado um local para destinação. Em grande parte dos casos, os animais não podem voltar à vida livre e são então encaminhados para instituições como zoológicos (BARROS, 2013).

O confinamento de diversos animais em pequenos ambientes, associado ao contato próximo aos seres humanos facilitam a disseminação de patógenos nestes locais (CUBAS, 2008). Diante disso, os zoológicos brasileiros, que historicamente eram locais de exibição de coleções de animais, deixaram de servir apenas como espaços de lazer e passaram a se preocupar com o bem-estar e saúde dos animais,

a desempenhar funções socioambientais, por meio da conscientização da população em relação ao tráfico de animais e também vêm contribuindo com a conservação da biodiversidade por meio de pesquisa, já que muitas vezes acabam abrigo indivíduos de espécies ameaçadas de extinção, principalmente por perda de habitat (ICMBio, 2016).

Devido a importância dos zoológicos para manutenção dessas espécies, é crucial reduzir os riscos de infecções nas suas populações, avaliar o controle sanitário das criações, bem como do controle de zoonoses. Para tal, deve-se conhecer e monitorar as doenças mais comuns nestes ambientes por meio de um estudo epidemiológico no local. Doenças como clamidiose e micoplasmose fazem parte da lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, além de sua importância pelos prejuízos que provocam em populações.

A clamidiose pode causar sinais que variam de acordo com a cepa infectante e com a condição do hospedeiro, podendo resultar em febre, anorexia, letargia, rinite, conjuntivite, desconforto respiratório, diarreia, queda na produção e má formação de ovos, além de morbidade podendo chegar a 20-30% (SHI et al., 2003; ZHOU et al., 2010). Indivíduos podem se tornar cronicamente infectados sem demonstrar sinais clínicos até uma situação de estresse. O gênero *Chlamydia* é composto por 11 espécies que podem infectar humanos e animais, dentre eles aves, répteis, mamíferos e anfíbios. Algumas espécies são hospedeiras específicas, enquanto outras, como *C. psittaci* e *C. pneumoniae*, possuem caráter zoonótico (TAYLOR-BROWN, 2015).

A micoplasmose pode representar uma doença desafiadora importante para a conservação e criação de aves selvagens e de cativeiro, incluindo aves de companhia, pois causa sinais respiratórios como tosse, espirros, estertores, corrimentos oculares e nasais, conjuntivite uni ou bilateral com presença ou não de inchaço da face (PHALEN et al., 2006), além de relatos de doença reprodutiva grave em aves (CARNACCINI et al., 2016). Isso prejudica a reabilitação, e deve ser controlado para reduzir a mortalidade de embriões bem como de aves jovens e maduras (GOMES et al., 2010). Os micoplasmas estão entre os principais causadores de doenças do trato respiratório superior em répteis, sendo suas principais manifestações clínicas exsudato nasal e ocular, edema palpebral, rinite, traqueíte, pneumonia e estomatite, sendo também relatados casos de animais com

manifestações subclínicas e até assintomáticos (JACOBSON et al., 2014; BROWN; WENDLAND; ROTSTEIN, 2007; PENNER et al., 1997; SCHMIDT et al., 2013; MARSCHANG et al., 2016). Em serpentes, há ainda poucos relatos deste agente, portanto sua relação ainda permanece pouco elucidada.

Para evitar a disseminação de agentes infecciosos, virais e parasitários entre populações, instituições e países, é necessário que se façam estudos das epizootias e se sigam as práticas de criação, protocolos adequados de quarentena e medicina preventiva. Cada instituição deve possuir seu próprio protocolo de quarentena, que deve ser compatível com sua situação sanitária, doenças endêmicas e de acordo com o local de origem do indivíduo recebido (VILANI, 2006).

O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp. em aves e serpentes no Zoológico do Rio de Janeiro (Riozoo), cujas autorizações encontram-se em anexo (ANEXOS 1, 2 e 3). Houve a submissão e aprovação sob nº 889 e nº 1017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense (ANEXOS 4 e 5), pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO-ICMBio), nº 59538-1 (ANEXO 6) e cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), nº A4E34FC (ANEXO 7).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 AVES DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO

Atualmente o Zoológico do Rio de Janeiro mantém em seu plantel 635 espécimes de aves divididos em 20 ordens, com 30 famílias, 95 gêneros e 148 espécies, sendo que 12 delas são ameaçadas de extinção: o gavião-pombo-pequeno (*Amadonastur nacernulatus*), a harpia (*Harpia harpyja*), o mutum-do-sudeste (*Crax blumenbachii*), o aracuã (*Ortalis guttata*), o jacupiranga (*Penelope pileata*), a jacupemba (*Penelope superciliaris*), os psitacídeos papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*), papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*) e ararajuba (*Guaruba guarouba*), a murucututu (*Pulsatrix perspicilata*) e mocho-negro (*Strix huhula*) (ICMBio, 20016), já tendo sido registrados nascimento de exemplares das três últimas espécies citadas na instituição¹.

No zoológico ainda é possível observar uma população de oriunda do cruzamento de patos-crioulos com patos domésticos de mesma espécie (*Cairina moschata*), que gerou indivíduos mestiços com capacidade de voo e reprodução, distribuídos por toda área do zoológico, tendo assim, contato direto com outras aves do plantel, bem como com funcionários e visitantes do parque (informação verbal)¹.

A espécie *C. moschata* é originária do Brasil e está amplamente distribuída desde o México até o sul da América do Sul (DONKIN, 1989). Pertence à Ordem Anseriformes, Família Anatidae, Tribo Cairinini, vivem próximos à água, têm hábitos crepusculares, voam sozinhos ou em pequenos grupos, podendo chegar a 50 indivíduos na época do acasalamento e geralmente se abrigam em árvores durante a noite, o que é possível graças às suas garras afiadas e cauda longa (DONKIN, 1989; STHAL, 2008).

Provavelmente por ser a única espécie de pato domesticada que não teve como origem o pato-real (*Anas platyrhynchos*), ainda hoje há poucos relatos na literatura de doenças nessa espécie (TAKAHASHI et al., 1996; WOOLCOCK et al., 2000; CAMPAGNOLO et al., 2001; PALYA et al., 2003). Porém, a Ordem Anseriformes é constituída por aves consideradas mais rústicas e com maior

¹ Comunicação pessoal da gerência técnica da Fundação Jardim Zoológico da Cidade do Rio de Janeiro

resistência a doenças, podendo ser afetadas por diferentes microrganismos, de forma clínica, subclínicas ou assintomáticas e os agentes bacterianos mais comumente citados são *E. coli*, *Riemerella anatipestifer* (causador da septicemia dos patos), *Pasteurella multocida* e *Salmonella* spp. (ALMEIDA et al., 2016).

2.2 RÉPTEIS DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO

O plantel de répteis do Riozoo é composto por 423 indivíduos, dos quais 26 pertencem à Ordem Squamata, Subordem Serpentes. São eles: nove pítons-birmanesas (*Pithon molurus bivittatus*), quatro pítons-bola (*Python regius*), quatro jiboias (*Boa constrictor*), duas cascavéis (*Caudisoma terrificus*), uma cascavel (*Caudisoma collilineata*), uma sucuri (*Eunectes murinus*), uma cobra-rato (*Pantherophis obsoletus*), uma salamanta (*Epicrates cenchria crassus*), uma cobra-veadeira (*Corallus hortulanus*), uma jararaca-pintada (*Bothropoides neuwiedi*) e uma jararaca-do-norte (*Bothropoides atrox*) (informação verbal)¹.

As serpentes são animais ectotérmicos e por isso são encontrados em todas as partes do planeta, principalmente em regiões tropicais e temperadas, não ocorrendo nas calotas polares. Por serem animais temidos, por algumas espécies poderem causar acidentes ofídicos, são mortos com frequência o que ameaça sua existência, além da perda de habitat. Seus hábitos alimentares variam desde moluscos, artrópodes e minhocas a peixes, anfíbios, lagartos, outras serpentes, aves e mamíferos (GREGO, ALBUQUERQUE e KOLSNIKOVAS, 2014).

2.3 MANUTENÇÃO DE ANIMAIS *EX SITU* E PRINCIPAIS AFECÇÕES

O convívio e a domesticação de animais por seres humanos existem desde épocas remotas e, até a era atual, houve grandes avanços no que diz respeito ao bem-estar e saúde de animais selvagens cativos (TIDEMANN; GOSLER, 2010). Porém, pela grande diversidade de espécies nativas e exóticas, o conhecimento sobre as doenças que podem ser transmitidas entre animais domésticos, selvagens e seres humanos ainda é limitado (FOWLER, 1996; EMIKPE; MORENIKEJI; JARIKRE, 2016).

Embora um agente patogênico possa estar circulando através de uma população de animais silvestres de vida livre, a manifestação clínica da doença muitas vezes não é observada, pois o agente e o hospedeiro estabeleceram um equilíbrio. Em ambientes cativos (*ex situ*), existem vários fatores no manejo que podem afetar a condição de animais silvestres se não forem observadas ou executados de maneira correta, dentre eles podemos destacar a nutrição e alimentação adequadas, compreensão da anatomia e fisiologia para adequação dos recintos e das populações, alterações comportamentais, fatores climáticos e ambientais, higiene das instalações, sendo importante identificar os fatores de manejo que minimizam ou maximizam a ocorrência de doenças infecciosas ou parasitárias (FOWLER, 1996).

Portanto, práticas de manejo que alterem o estado de equilíbrio dos animais, como subnutrição, obesidade, higiene inadequada e superpopulação, podem levar ao aumento das afecções por agentes que podem estar presentes de forma subclínica ou assintomática em uma população estável devido à diminuição da resistência imunológica, ocasionada principalmente por estresse unido ao acúmulo de agentes ou a maior exposição a eles (FOWLER, 1996; VAN WAEYENBERGE et al., 2018, TOLBA et al., 2019).

Em aves, as principais doenças observadas são causadas por bactérias (clamidífilose, salmonelose, micoplasmose e tuberculose), vírus (influenza, febre do Nilo Ocidental e Doença de New Castle), parasitas (criptosporidíose, capilariíose) e doenças fúngicas (aspergilíose). Dentre elas, destacam-se a clamidíose e a micoplasmose, que fazem parte da lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE. A clamidíose, principalmente por ser uma zoonose que pode causar doença respiratória grave no ser humano, além de altas taxa de morbidade e mortalidade nas aves (SHI et al., 2003; ZHOU et al., 2010). A micoplasmose causa perdas reprodutivas significativas, com altos índices de mortalidade em embriões e aves jovens (GOMES et al, 2010), o que coloca em risco programas de conservação de espécies ameaçadas nas instituições.

Na subordem das serpentes os indivíduos cativos comumente apresentam afecções respiratórias causadas por bactérias, vírus e fungos, além de poderem estar associadas ao manejo inadequado que leva ao estresse e traumas (CZIRJÁK et al., 2015; PEREIRA et al., 2017; ULLMANN et al., 2016; LOVSTAD et al., 2019;

HOON-HANKS et al., 2018; STENGLEIN et al., 2014; UCCELLINI et al., 2014; STARCK et al., 2017; SCHMIDT et al., 2013).

Chlamydia pneumoniae é a principal clamídia a causar doenças em répteis (BODETTI et al., 2002; MITCHELL, 2011; FRUTOS et al., 2014) e essa espécie possui uma ampla gama de hospedeiros. Relatos da infecção em humanos e outros animais endotérmicos já foram feitos ao redor do mundo (KUTLIN et al., 2007; RATTEI et al., 2007). As lesões são variadas de acordo com a espécie e podem incluir granulomas histiocíticos, inflamação granulomatosa, enterite necrosante, miocardite necrosante e pneumonia proliferativa (FRUTOS et al., 2014). Existem poucos relatos a respeito da infecção por *Chlamydia psittaci* em répteis, sendo descritos os seguintes sinais clínicos: hepatite, conjuntivite, pneumonia e granulomas inflamatórios (EBANI, 2017).

Dentre os agentes bacterianos, os micoplasmas estão entre os principais causadores de doenças do trato respiratório superior (DTRS) em répteis, sendo suas principais manifestações clínicas: exsudato nasal e ocular, edema palpebral, rinite, traqueíte, pneumonia e estomatite, sendo também relatados casos de animais com manifestações subclínicas e até assintomáticos, porém em serpentes, na maioria das vezes, os principais agentes bacterianos são bacilos Gram-negativos secundários a infecções virais e parasitárias, causando estomatite, glossite, gastroenterite, pneumonia e abscessos subcutâneos e oftálmicos (GREGO, ALBUQUERQUE; KOLSNIKOVAS, 2014), havendo apenas três casos relatados de micoplasmas e todos observados em pítons, então seu papel em representantes dessa subordem ainda permanece não esclarecido (PENNER et al., 1997; BROWN; WENDLAND; ROTSTEIN, 2007; SCHMIDT et al., 2013; JACOBSON et al., 2014; MARSCHANG et al., 2016).

2.4 MICOPLASMOSE

2.4.1 Histórico e Etiologia

Os micoplasmas pertencem à classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae e sua característica principal é a ausência de parede

celular, o que explica sua resistência natural a antibióticos que afetam a síntese do envoltório bacteriano (FERGUSON-NOEL, 2013).

A micoplasmose em aves foi descrita pela primeira vez na Inglaterra, com a Pneumoenterite Epizootica dos Perus, que trata de uma infecção causada por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Pasteurella multocida* (DODD, 1905). Posteriormente, foi identificado um corpúsculo coco baciliforme encontrado em exsudato nasal de galinhas com coriza e a enfermidade recebeu o nome de Sinusite Infecciosa dos Perus e Doença Crônica Respiratória (DCR) das galinhas, apresentando evolução lenta e para estado crônico (METTIFOGO; BUIM, 2009). Porém, foi mais amplamente conhecida pela denominação de Sinusite Infecciosa dos Perus, sendo o agente da DCR e da Sinusite Infecciosa dos Perus isolado somente em 1943 por Delaphane e Stuart e sua relação com sintomas respiratórios estabelecida definitivamente apenas na década seguinte (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Após a inclusão dos micoplasmas na Classe dos Mollicutes o agente etiológico da DCR foi denominado *Mycoplasma gallisepticum* (MG) (METTIFOGO; BUIM, 2009; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Desde 1994, epidemias de *M. gallisepticum* foram relatadas em tentilhões (*Carpodacus mexicanus*) e passarinhos-de-casa (*Haemorhous mexicanus*) associadas a conjuntivites por todo o leste do EUA. Aves infectadas foram mais recentemente relatadas nas populações dessa espécie no oeste dos EUA (CFSPH, 2007).

M. gallisepticum pode ser encontrado em todo o mundo. Nos Estados Unidos, esses organismos foram erradicados da maioria das criações comerciais de frangos e perus, mas permanece presente em outras criações de aves. Na produção avícola industrial brasileira, frangos, perus e outras aves industriais já são criados em instalações à prova de pássaros, prevenindo a entrada de passeriformes de vida livre e mantendo distância adequada de outras aves (GOMES et al., 2010).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), ciente da importância das micoplasmoses para a sanidade avícola, aprovou por meio da Instrução Normativa nº 44, de 23 de agosto de 2001, as Normas Técnicas para Controle das micoplasmoses causadas por *M. gallisepticum*, *M. synovae* e *M. meleagridis* nos plantéis de aves de reprodução (BRASIL, 2001) e, pelas Instruções Normativas nº 56 de 4 de dezembro de 2007 e nº 59 de 02 de dezembro de 2009, que estabelecem os procedimentos para registro, fiscalização e controle, não só das

criações de reprodutoras, também de corte, postura comercial, e explorações de outras aves como passeriformes, ornamentais, consideradas exóticas ou não.

2.4.2 Hospedeiros

Os micoplasmas aviários geralmente são hospedeiro-específicos, infectando apenas uma única espécie de animais, porém, alguns deles podem ter a capacidade para infectar espécies diferentes, como se pode observar no Quadro 1 (FERGUSON-NOEL, 2013).

Quadro 1. Lista dos micoplasmas mais frequentes que afetam as aves e seus hospedeiros usuais.

MICOPLASMAS	HOSPEDEIRO USUAL
<i>M. gallisepticum</i>	Galinha, peru, codorna, passeriformes, falconiformes, entre outros
<i>M. synoviae</i>	Galinha, peru, codorna
<i>M. meleagridis</i>	Peru
<i>M. iowae</i>	Galinha, peru
<i>M. gallopavonis</i>	Peru
<i>M. cloacale</i>	Peru
<i>M. gallinarum</i>	Galinha
<i>M. gallinaceum</i>	Galinha
<i>M. columbinasale</i>	Pombo
<i>M. columbinum</i>	Pombo
<i>M. columborale</i>	Pombo
<i>M. anatis</i>	Pato
<i>M. anseris</i>	Ganso
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Várias

Fonte: Adaptado de FERGUSON-NOEL, 2013

2.4.2.1 Micoplasmas em Aves Silvestres

Duarte et al. (2006) constataram a presença de 29% de amostras positivas para *Mycoplasma* spp., obtidas por meio de suabe oral ou de traquéia de passeriformes selvagens mantidos em um criadouro conservacionista, localizado no município de Itanhaém – São Paulo, todos assintomáticos. O organismo também foi confirmado por cultura ou reação em cadeia de polimerase (PCR) em pintassilgo-americano (*Carduelis tristis*), passarinho-roxo (*Carpodacus purpureus*), chapim-de-crista (*Baeolopus bicolor*), grosbeak-de-pinheiro (*Pinicola enucleator*), grosbeaks-noturno (*Coccothraustes vespertinus*) e em um gaio-azul cativo (*Cyanocitta cristata*). Pardal-doméstico (*Passer domesticus*) e periquitos (*Melopsittacus undulatus*) foram infectados experimentalmente com algumas cepas (CFSPH, 2007).

Silva et al. (2006) ao analisarem amostras de 85 psitacídeos de diferentes espécies criados em cativeiro, relataram a presença de *Mycoplasma* spp. em 16,47% das aves, entretanto estes animais não foram positivos para MG e MS. Já Carvalho et al. (2017). ao avaliarem 300 amostras de psitacídeos, observaram positividade de MG em 21,62% (16/74) em indivíduos de um CETAS, 15,70% (19/121) em criadouro comercial, e, 6,66% (7/105) em criadouro conservacionista, enquanto para MS as taxas foram de 2,7% (2/74) no CETAS, 0,0% (0/121) no criadouro comercial e 1,9% (2/105) no conservacionista. MG ainda foi descrito por Gomes et al. (2010) em psitacídeos oriundos de tráfico com positividade de 85,4%.

Stipkovits e Szathmary (2012) em revisão de literatura, citam a infecção por diversas espécies de Mollicutes, dentre eles MG, MS, *M. anatis* e Acholeplasmas em patos e gansos de criação.

Haesendonck et al. (2014) demonstraram alta prevalência de MG e MS com 76,3% e 36,0%, respectivamente, em Galliformes criados para fins ornamentais na Bélgica, sugerindo que essas aves criadas em quintal possam servir de reservatório desses agentes. Também observaram baixa prevalência em outras aves silvestres testadas, sendo elas um pombo-torcaz (*Columba palumbus*), duas garças-reais-europeias (*Ardea cinerea*), um pato-real (*Anas platyrhynchos*) e um pega-rabuda (*Pica pica*) pra MG (1,7%) e uma gralha-preta (*Corvus corone*), três pombos-torcaz (*C. palumbus*) (3%) e 12 pardais (*Passer domesticus*) (4%) pra MS.

Lecis et al. (2016) analisaram amostras de 62 aves de rapina oriundas de dois Centros de Vida Selvagem e um Hospital Veterinário na Itália, obtendo positividade

em 42% (26/62) delas. E Catania et al. (2016) disseram o primeiro relato de *M. synovae* em um flamingo-pequeno (*Phoeniconaias minor*), que apresentava quadro de traqueíte catarral e aerossaculite fibrinosa após ser transferido da Holanda para um zoológico na Itália.

Michiels et al. (2016), consideram que aves selvagens não desempenham papel importante como reservatório de MG e MS, já que em seu estudo observaram baixa prevalência desses agentes, porém não excluem um possível impacto delas na transmissão para outras aves.

Esses estudos reforçam a necessidade de acompanhamento da ocorrência desse agente em animais selvagens, para um maior conhecimento de sua epidemiologia e delineamento de planos de prevenção de sua disseminação tanto entre as populações de vida livre quanto de cativeiro (sejam estas selvagens ou domésticas).

A micoplasmose pode representar uma doença desafiadora importante para a conservação e criação de aves selvagens e de cativeiro, incluindo aves de companhia. Isso prejudica a reabilitação, e deve ser controlado para reduzir a mortalidade de embriões bem como de aves jovens e maduras (GOMES et al., 2010). O cativeiro pode aumentar ainda mais a transmissão potencial de patógenos oportunistas, como os micoplasmas, que podem estar presentes em hospedeiros saudáveis; e isso pode resultar na emergência de novas doenças e novas patologias (LORIA et al., 2008).

2.4.2.2 Micoplasmas em Répteis

A Classe dos répteis (Reptilia) é composta pelas Ordens Testudines, que são os quelônios (cágados, jabutis e tartarugas), Crocodylia, composta por gaviais, jacarés e crocodilos, e Squamata, que se divide em três Subordens: Lacertilia (lagartos), Amphisbaenia (anfisbênias) e Serpentes (serpentes). Os micoplasmas estão entre os principais causadores de doenças do trato respiratório superior (DTRS) em répteis, sendo suas principais manifestações clínicas exsudato nasal e ocular, edema palpebral, rinite, traqueíte, pneumonia e estomatite, sendo também relatados casos de animais com manifestações subclínicas e até assintomáticos (PENNER et al., 1997; BROWN; WENDLAND; ROTSTEIN, 2007; SCHMIDT et al., 2013; JACOBSON et al., 2014; MARSCHANG et al., 2016). Existem duas espécies

de *Mycoplasma* sabidamente patogênicas e causadoras de DTRS em Testudines, *M. agassizii* e *M. testudineum* (BROWN et al., 1994; BROWN et al., 2004; JACOBSON; BERRY, 2012).

Relatos de micoplasmas na Ordem Squamata, Subordem Serpentes são raros e três casos foram observados em pítons. Em dois casos, foram identificados como *Mycoplasma* spp. (PENNER et al., 1997; MARSCHANG et al., 2016) e em um a *M. caviae* e *M. fermentans* (SCHMIDT et al., 2013). Na mesma Ordem, porém na Subordem Lacertilia, foi descrito *M. iguanae* em duas iguanas (*Iguana iguana*) considerado inicialmente como o causador de degeneração da medula espinhal nesses indivíduos (BROWN et al., 2006). Em estudo posterior, foi constatado que se tratava de uma espécie de ocorrência vertebral natural e que poderia se confundir ou exacerbar doenças ósseas nutricionais (BROWN; WENDLAND; ROTSTEIN, 2007). No mesmo estudo, foi encontrada uma nova espécie, *M. insons*, considerada como integrante da microbiota normal do trato respiratório do hospedeiro em questão.

2.4.3 Ciclo Biológico Vias de Eliminação e Transmissão

Para que haja colonização do hospedeiro, as proteínas secretadas pelos micoplasmas exercem papel fundamental (COUTO et al., 2012). Porém, os fatores responsáveis pelas diferenças de tropismo tissular, invasividade e patogenicidade entre o *M. gallisepticum* e o *M. synoviae* ainda não foram amplamente identificados (DUSANIC et al., 2009).

Dusanic et al. (2009) demonstraram pela primeira vez que o *M. synoviae* pode invadir eritrócitos, condrócitos e células embrionárias de frango *in vitro* e que a localização intracelular poderia ajudar a explicar em parte a persistência do *M. synoviae* apesar de anticorpos locais específicos, fagocitose e tratamento antimicrobiano.

Aves portadoras ou em estado subclínico são essenciais para a prevalência de micoplasmas nos ambientes avícolas. A transmissão dos micoplasmas se dá de forma horizontal e vertical. A transmissão horizontal consiste no contato direto ou indireto de indivíduos infectados com susceptíveis. O trato respiratório superior e a conjuntiva são portas de entrada do patógeno, que se difunde na forma de aerossol ou gotículas. A transmissão vertical se dá pelo ovo e representa um importante fator

na disseminação dos micoplasmas em aves jovens. (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009), pois nos casos de aves infectadas e em estado agudo a taxa de transmissão pode variar entre 10 a 40%.

O período de incubação depende da virulência das cepas, da concentração do agente e de fatores de estresse (KLEVEN, 2003), variando normalmente entre 11 a 21 dias depois da exposição por contato direto. Em casos de transmissão vertical, esse pode ser mais curto, já tendo sido descritos casos de sinusite em pintinhos com seis dias de idade. É interessante destacar que a transmissão pode ser interrompida por alguns períodos e reiniciar por alguma situação de estresse (CERDÁ, 2007).

2.4.4 Sinais Clínicos

As micoplasmoses podem se manifestar nas aves como doença respiratória causada por *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Mycoplasma meleagridis* (exclusivo de perus) ou doença articular, causada por MS (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Sinais clínicos respiratórios como traqueíte, aerossaculite, conjuntivite, edema periocular, rinite, descarga nasal e ocular frequentemente identificados em aves silvestres com micoplasmose (DHONDT et al. 2007; CATANIA et al., 2016). E em aves domésticas, ornamentais e de caça, além desses, também são comumente observados perda de peso, diminuição da produção de ovos e mortes. Infecções assintomáticas são as mais comuns em animais infectados por micoplasmas pois, estes agentes possuem a capacidade de escapar do sistema imune do hospedeiro e permanecer em estado de latência (RAZIN et al., 1998). Além disso, a presença de cepas com baixo grau de patogenicidade pode causar um quadro clínico brando ou inaparente (LECIS et al., 2010).

De acordo com Stipkovits e Szathmary (2012), além de desordens respiratórias e reprodutivas, é comum a atuação de agentes da classe Mollicutes no sistema imunológico das aves, juntamente com outros agentes infecciosos e fatores ambientais.

Há estudos onde se observou alta frequência de infecção por micoplasma em aves de rapina e baixo grau de patogenicidade, causando quadro clínico brando ou inaparente (LIERZ et al., 2008; LECIS et al., 2010; ZIEGLER et al., 2019).

Em serpentes só existem três relatos de micoplasmose. Penner et al. (1997) relataram um caso de traqueíte proliferativa linfocítica e pneumonia em uma píton-birmanesa (*P. molurus bivittatus*), cujo sequenciamento do agente isolado apresentou 90% de similaridade com *Mycoplasma agassizii*, organismo causador de doenças respiratórias em quelônios e crocodilianos. Em um levantamento de agentes de agentes patogênicos em 80 serpentes de cativeiro com e sem sintomatologia respiratória na Alemanha, foi detectado *Mycoplasma* sp. por cultivo e PCR em duas pítons, um com e outro sem manifestações clínicas, porém, ambos apresentaram pneumonia à necropsia (SCHMIDT et al., 2013). Recentemente, Marschang et al. (2016), descreveram o terceiro caso de *Mycoplasma* spp. relacionado à doença respiratória em serpentes, apesar do papel desse organismo ainda não estar esclarecido na Ordem Squamata.

2.4.5 Diagnóstico

A principal via de eliminação do agente é a aerógena, pelo trato respiratório. Por essa razão, o material indicado para realização dos testes diagnósticos é o suabe de traquéia, também podendo ser utilizado suabe de orofaringe e coana (NASCIMENTO, 2000).

Infecções por micoplasmas podem ser diagnosticadas por cultura do organismo em meio próprio. As colônias são pequenas, lisas e translúcidas, e às vezes tem a aparência de “ovo frito” com uma massa densa central. Testes bioquímicos podem ser úteis na identificação preliminar, mas a identificação definitiva é por imunofluorescência indireta, coloração de imunoperoxidase, um teste de inibição do crescimento, inibição do metabolismo ou PCR (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

O uso de métodos de detecção específica de DNA também constitui uma alternativa à cultura e identificação convencionais de micoplasmas. Hoje em dia é comum o uso de PCR para amplificar porções específicas de DNA no material teste e há kits de PCR para detecção de *Mycoplasma* spp., ou espécies como MG e MS usados diretamente no material extraído de suabes (OIE, 2009).

Os produtos da PCR são detectados por eletroforese convencional em gel de agarose 2%, incorporando marcadores de tamanho apropriado, seguindo-se o exame sob luz UV.

Além do diagnóstico pelo isolamento e tipificação e/ou detecção de material genético do agente pela PCR, existem também os testes para detecção de anticorpos contra micoplasmas como Soroaglutinação Rápida (SAR), Soroaglutinação Lenta (SAL), Inibição da Hemaglutinação (HI) e ELISA (NASCIMENTO, 2000; BACK, 2004).

A SAR apresenta baixa sensibilidade, sendo assim, não deve ser empregada isoladamente (MENDONÇA et al., 2003). Já ELISA é um prova mais específica, sensível e de boa reprodutibilidade, atualmente tem sido utilizado através de kits comerciais disponíveis, desenvolvidos a partir de células íntegras, de células rompidas ou de subunidades de proteínas imunogênicas da membrana do MG, como a proteína p64 (METTIFOGO; BUIM, 2009). O HI é uma prova de alta especificidade que se emprega geralmente para confirmar os resultados de SAR e ELISA que têm sido considerados como testes de triagem.

2.5 CLAMIDIOSE

2.5.1 Histórico e Etiologia

A Ordem Chlamydiales, família Chlamydiaceae é formada por bactérias intracelulares obrigatórias, cocóides e Gram-negativas com uma ampla gama de hospedeiros (BRANLEY et al., 2008; CFSPH, 2009).

A clamidiose foi descrita pela primeira vez em 1879 em um quadro de pneumonia em humanos expostos a pássaros tropicais ornamentais (RITTER, 1880). O termo "psitacose" era usado por ser um agente infeccioso de papagaios (psitacídeos) transmitido para os humanos causando sintomas semelhantes aos de gripe (MORANGE, 1895). O agente inicialmente foi classificado como um vírus do grupo psitacose – LGV por Bedson et al. (1930), porém em 1965 com o advento da microscopia eletrônica, conclui-se que a enfermidade era causada por uma bactéria. Em 1966, Page sugeriu então reunir os organismos da psitacose – LGV em um único gênero conhecido como *Chlamydia*.

Em 1999, Everett et al. dividiram essa família em dois gêneros e nove espécies com base em suas sequências ribossomais: o gênero *Chlamydia* incluindo *C. trachomatis*, *C. suis* e *C. muridarum*, e o gênero *Chlamydophila* incluindo *C. psittaci*, *C. felis*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. pneumoniae* e *C. pecorum*. Porém, essa separação não foi amplamente aceita pela comunidade científica, mesmo após oito anos de sua introdução (SCHACHTER et al., 2001). Por comparações de genoma, essa divisão também não é consistente com a história natural do microrganismo, o que levou à reunificação dos gêneros em apenas um, *Chlamydia* (STEPHENS et al., 2009; SACHSE et al., 2015).

C. psittaci é uma espécie heterogênea em se tratando de fatores genéticos e fenotípicos e a sequência genética do gene A (*ompA*) da membrana externa ainda tem sido usada para avaliar a variação entre as cepas e preferências por hospedeiro e virulência (SACHSE, et al.2015).

Os genótipos A a F são conhecidos por infectar naturalmente aves e são diferentes daqueles isolados das clamidioses em mamíferos. Alguns genótipos aviários parecem ocorrer mais em algumas ordens específicas de aves. O genótipo A é endêmico entre psitacídeos e é considerado como altamente virulento, podendo causar doença grave em outras espécies. O genótipo B é endêmico em pombos e geralmente é menos virulento, mas também foi relatado em psitacídeos e perus (CFSPH, 2009; OIE, 2009; SACHSE, et al., 2015). O genótipo C foi isolado primariamente de patos e gansos, enquanto o genótipo D foi principalmente encontrado em perus e é considerado o tipo mais virulento para essas espécies. Este genótipo também foi encontrado em garças e gaivotas (BEECKMAN; VANROMPAY, 2009; CFSPH, 2009; OIE, 2009). Em contraste, o genótipo E, também conhecido como Cal-10, MP ou MN, foi primeiramente isolado durante um surto de pneumonia em humanos nos anos 1930. Posteriormente, o genótipo E foi isolado e obtido de uma diversidade de espécies de aves, incluindo patos, pombos, avestruzes e emas (SACHSE, et al.2015). A gama de hospedeiros do genótipo E é o mais diverso: 20% das cepas do genótipo E foram isoladas de pombos. Adicionalmente, o genótipo E foi isolado em vários casos fatais de clamidiose em ratitas, durante um surto respiratório em patos e perus, e ocasionalmente em humanos (BEECKMAN; VANROMPAY, 2009; CFSPH, 2009; OIE, 2009). O genótipo F foi isolado tanto de psitacídeos quanto de perus e é aparentemente raro entre as espécies domésticas (CFSPH, 2009; OIE, 2009).

A genotipagem também reconhece um sétimo tipo, E/B, descrito pela primeira vez em 2005, o qual é indistinguível dos tipos E ou B usando sorologia (CFSPH, 2009). Até então, o genótipo E/B foi isolado principalmente de patos, e também em perus e pombos, e hospedeiros adicionais podem ser descobertos. Os genótipos de mamíferos M56 e WC foram isolados em um surto em ratos almiscarados e lebres, e em um surto de enterite em gado Wolfsen, cães, gatos e cavalos. Todos os genótipos podem ser considerados como transmissíveis a humanos e podem potencialmente causar doença grave e até mesmo a morte (BEECKMAN; VANROMPAY, 2009; CFSPH, 2009; OIE, 2009; SACHSE, et al.2015).

A probabilidade de infecção é presumidamente relacionada à exposição a altas cargas de organismos, mas o sorotipo de *C. psittaci* pode também ser um fator determinante (BRANLEY et al., 2008).

Os genótipos conhecidos de *C. psittaci* aviária com proteína da membrana externa A (*ompA*) são transmissíveis aos humanos e há um relato de transmissão de três genótipos (D, F e E/B) para um veterinário que realizava um experimento com clamidiose em perus (VAN DROOGENBROECK et al., 2008).

2.5.2 Hospedeiros

As clamídias são bactérias intracelulares obrigatórias dependendo de uma célula hospedeira eucariótica para sua replicação. O gênero *Chlamydia* é composto por 11 espécies que são patógenos bem reconhecidos de humanos e animais. Algumas espécies são hospedeiras específicas, enquanto outras, como *C. psittaci* e *C. pneumoniae*, possuem caráter zoonótico (TAYLOR-BROWN, 2015).

Ao analisar 1150 animais no Japão, foram observados 74 (6.4%) positivos para *C. psittaci* a PCR convencional e em tempo real sendo sua prevalência de 3.9% (12/310) em mamíferos, 7.2% (48/668) em aves e 8.1% (14/172) em répteis, onde a prevalência em aves e répteis foi significativamente maior do que nos mamíferos ($P < 0.05$) (KABEYA et al., 2015).

2.5.2.1 Clamídia em Aves Silvestres

As aves são os hospedeiros naturais da *C. psittaci*, que também pode infectar répteis e mamíferos, inclusive o homem (HUCHZERMEYER et al., 1994; EGGEMANN et al., 2000; VANROMPAY et al., 2004; LAROUCAU et al., 2008).

Um estudo transversal realizado com exemplares de *Ara ararauna*, de um CETAS, no Rio de Janeiro, obteve 50% das aves positivas para o microrganismo (VASCONCELOS et al., 2016). Tolba et al. (2019) em seu trabalho no Egito, detectaram o DNA de *C. psittaci* em 63 (52,5%) das 120 amostras coletadas de psitacídeos cativos e relataram que a idade da ave, local de criação e condições de alojamento e época de amostragem são fatores de risco significativos para a infecção por *C. psittaci* em psitacídeos. Segundo os autores, aves com menos de um ano de idade e amostradas no inverno são mais propensas a infecção por *C. psittaci*.

Kabeya et al. (2015) em um estudo conduzido com amostras coletadas entre 2005 e 2010, em cinco Zoológicos do Japão, detectou um percentual de 7,2% de aves positivas para *C. psittaci*, onde a maior prevalência foi obtida durante os meses de primavera e principalmente no ano de 2008. Donati et al. (2015) ao analisar suabes de cloaca de aves de vida livre de uma região urbana da Itália, encontraram 43,42% de animais positivos para *C. psittaci*, enquanto Wang et al. (2018) obtiveram soropositividade de 20,4% em pombos no norte da China.

2.5.2.2 Clamídia em Répteis

Chlamydia pneumoniae é a principal clamídia a causar doenças em répteis (BODETTI et al., 2002; MITCHELL, 2011; FRUTOS et al., 2014) e essa espécie possui uma ampla gama de hospedeiros. Relatos da infecção em humanos e animais endotérmicos já foram feitos ao redor do mundo (KUTLIN et al., 2007; RATTEI et al., 2007). Espécies de répteis como camaleões (*Chameleo dilepis*), tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*), crocodilos-do-Nilo (*Crocodylus niloticus*), iguana-verde (*Iguana iguana*) e pítons-birmanesas (*Python molurus bivittatus*) já foram descritas albergando este microrganismo e em algumas situações, com sinais clínicos. Kabeya et al. (2015) em cinco zoológicos no Japão, relataram maior positividade para *C. pneumoniae* em répteis nos meses de verão e Rostami et al.

(2017) não detectaram a presença de DNA de *Chlamydia* spp. em répteis de zoológicos.

2.5.3 Ciclo Biológico, Vias de Eliminação e Transmissão

Chlamydia spp. possui um ciclo biológico diferenciado de outras bactérias intracelulares, possuindo duas formas: o corpo elementar (CE), que é a sua forma extracelular, inativa e infecciosa, e o corpo reticular (CR), que é sua forma intracelular ativa e que necessita de grande quantidade de energia para replicação e liberação de novos CEs (RASO et al., 2011; HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009; PIASECKIET al., 2012). O ciclo completo tem duração de 48h, iniciando pela endocitose do CE na célula hospedeira. A seguir, ele transforma-se em CR por processos bioquímicos e este parasita a mitocôndria da célula para obter a energia necessária para sua multiplicação. Com isso, se formam colônias albergando grandes quantidades de CR, que podem, durante o processo de divisão da célula mãe, passar para células filhas, disseminando a infecção pelo organismo. Após maturação, CRs se transformam em CEs novamente e são liberados por meio da lise da célula hospedeira. Porém, em caso de falta de nutrientes na célula hospedeira, os CRs podem entrar em estado de latência por longos períodos, em que o hospedeiro não elimina nem transmite o agente (ANDRE, 1994; GERLACH, 1994). Animais portadores, em casos de estresse, podem liberar CEs de forma intermitente servindo como fonte de infecção para outros animais (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009).

A habilidade da *Chlamydia* spp. em causar infecção sistêmica em diferentes organismos hospedeiros está certamente relacionada à capacidade de ingressar em quase qualquer tipo de célula, de células epiteliais, fibroblastos e macrófagos a células dendríticas, como é conhecido em vários estudos *in vitro*. Essa versatilidade também sugere que esse agente provavelmente possui uma variedade de diferentes mecanismos para entrar na célula hospedeira disponível, porém esses processos moleculares que fundamentem a entrada e captação da clamídia ainda são pouco entendidos (SACHSE, et al., 2015).

Chlamydia spp. são excretadas nos exsudatos respiratórios e fezes e podem ser introduzidas em aves de companhia e de produção pelo contato direto com aves

selvagens ou domésticas contaminadas, ocorrendo portanto sua transmissão horizontal direta principalmente pela inalação de material contaminado (HARKINEZHAD, GEENS; VANROMPAY, 2009) e, às vezes, ingestão. Também pode haver transmissão parental pela regurgitação feita na alimentação dos filhotes, que pode conter células do Inglúvio contendo o agente (ANDRE, 1994).

Outra forma de transmissão horizontal é a indireta, por meio de alimentos ou equipamentos contaminados, portanto, estes devem ser protegidos das aves selvagens. A limpeza cuidadosa do equipamento é muito importante, haja vista que o CE pode sobreviver nas fezes e cama por até trinta dias. Limpeza e desinfecção com a maioria dos detergentes e desinfetantes podem inativar o agente, pois se trata de uma bactéria com elevado teor de lipídeos (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009).

A transmissão vertical, embora baixa, foi descrita em perus, galinhas, patos, periquitos, gaivotas e gansos, podendo ser uma forma de introdução da clamidiose nas criações (WITTENBRINK et al., 1993). Além disso, *Chlamydia* spp. podem ser transmitidas através de ectoparasitos sugadores de sangue ou, menos comumente, por meio de bicadas ou feridas (LONGBOTTOM; COULTER, 2003).

2.5.4 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos causados por *C. psittaci* nas aves variam de acordo com a cepa infectante e com a condição do hospedeiro. Infecções generalizadas podem resultar em febre, anorexia, rinite, conjuntivite e desconforto respiratório como consequência de pericardite, aerossaculite, pneumonia e peritonite (SHI et al., 2003), além de outros sinais como perda de peso, depressão, diarreia, ascite, queda na produção e má formação de ovos, além de morbidade podendo chegar a 20-30% (ZHOU et al., 2010). Em criações de patos, a clamidiose foi inicialmente caracterizada pelo aumento da produção de lágrimas, penas molhadas em torno dos olhos e rubor conjuntival, seguido por diarreia caracterizado por intensa descarga de líquido, fezes verde claro e perda de peso acentuada. À necropsia, patos doentes apresentavam-se com hepatite e hepato e esplenomegalia (YANG et al., 2007). Elas podem se tornar cronicamente infectadas sem demonstrar sinais clínicos até uma situação de estresse (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009).

Existem poucos relatos a respeito da infecção por *C. psittaci* em répteis, sendo descritos os seguintes sinais clínicos: hepatite, conjuntivite, pneumonia e granulomas inflamatórios (EBANI, 2017).

As lesões causadas por *C. pneumoniae* nas aves são variadas de acordo com a espécie e podem incluir granulomas histiocíticos, inflamação granulomatosa, enterite necrosante, miocardite necrosante e pneumonia proliferativa (FRUTOS et al., 2014). Já em répteis, a infecção se caracteriza por uma inflamação granulomatosa nos órgãos internos, como baço, coração, pulmão e fígado, mas também podem ocorrer animais assintomáticos (TAYLOR-BROWN et al., 2015).

2.5.5 Diagnóstico

Os métodos para diagnóstico de *Chlamydia* spp., são baseados na detecção direta do antígeno, de DNA, por isolamento do agente em meios de cultivo, ou por métodos sorológicos (anticorpos) (SACHSE et al., 2009).

Para tais testes, pode-se utilizar amostras de tecidos, fezes e suabes de coana e cloaca (SAREYYUPOGLU et al., 2007). Em aves, ainda não há consenso se os suabes de coana ou de orofaringe são mais consistentes em relação aos de cloaca. Alguns autores afirmam ser os de coana (ANDERSEN, 1996), particularmente durante estágios iniciais da infecção, já que a transmissão direta através de aerossolização do exsudato respiratório deve ser considerado como método de transmissão primário (HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2009), porém outros observaram maior frequência de detecção a partir de suabes de cloaca, afirmando que a probabilidade de detecção é 2,83 vezes maior a partir de suabes de cloaca que de coana (VASCONCELOS et al., 2016).

O isolamento em cultura de células ou ovos embrionados é utilizado para verificar a viabilidade da linhagem de campo e facilita a caracterização da bactéria pela técnica molecular ou por métodos bioquímicos (SACHSE et al., 2009). O isolamento do agente causador durante a fase aguda da infecção e antes da administração de antimicrobianos é o método mais confiável para comprovar a presença de bactéria viável em casos de psitacose e é considerado como o padrão ouro para determinação das infecções ativas das aves. Porém, o diagnóstico por cultura pode ser processado apenas em um número limitado de laboratórios, pois

requer instalações com nível 3 de biossegurança (VANROMPAY, 2000). Esse método apresenta ainda algumas outras limitações, como pequena quantidade do agente na amostra, não sendo possível seu crescimento no meio de cultivo, contaminação por bactérias e fungos que inibem o seu crescimento, apesar da baixa chance taxa de ocorrência, ou presença de células inviáveis ou mortas por manipulação e armazenagem inadequadas da amostra (SACHSE et al., 2009), que podem gerar resultados falso-negativos.

Em alternativa ao uso de cultivo, o diagnóstico molecular tem sido amplamente utilizado (HEWINSON et al., 1997; SAREYYUPOGLU et al., 2007; SACHSE et al., 2009), tendo como vantagem de mesmo a partir de bactérias não viáveis obter resultados positivos, devido à estabilidade da molécula de DNA, que é detectado mesmo em pequenas quantidades (HEWINSON et al., 1997; SAREYYUPOGLU et al., 2007), além de não necessitar de altos níveis de segurança biológica, por trabalhar com o agente inativado.

Existem cerca de 13 diferentes “primers” para a detecção de Chlamydiae, sendo necessária a escolha adequada de acordo com cada caso (SACHSE et al., 2009). Protocolos convencionais para a identificação das espécies aviárias utilizam os genes *ompA* ou genes ribossomais como alvo para amplificação (LAROUCAU et al., 2007). No entanto, um par de primers (CpsiA/CpsiB) com alvo para a família de genes conservados *pmp* (proteína de membrana polimórfica) de *C. abortus*, única para Chlamydiaceae, vem se destacando em todos os genomas sequenciados até o momento (LAROUCAU et al., 2007).

Posteriormente, foi desenvolvido um sistema de análise VNTR multilocus (MLVA). A análise comparativa dos resultados do MLVA e aqueles obtidos a partir de métodos disponíveis até o momento, incluindo sorotipagem e/ou sequenciamento de *ompA*, indicam que o sistema MLVA fornece um nível adicional de discriminação, com vinte padrões distintos identificados até o momento, sendo considerado um teste altamente sensível e de alta resolução para a diferenciação de isolados de *C. psittaci* de diferentes origens que é adequado para estudos epidemiológicos moleculares (LAROUCAU et al., 2008).

Há uma grande variedade de protocolos utilizados para detecção deste agente, logo, mesmo sendo considerado um método sensível e específico, pode haver diferentes resultados por falta de padronização. Sua sensibilidade e especificidade também dependem das corretas técnicas de coleta e armazenagem,

de extração de DNA, “primers” utilizados, e método de detecção do produto amplificado (RASO, 2014). Resultados falso-positivos podem ocorrer devido à contaminação de amostras no momento da coleta ou processamento e os falso-negativos são comuns devido ao seu ciclo biológico, incluindo períodos de latência, e à possibilidade de não eliminação no momento da amostragem. Também é importante ressaltar que resultado positivo obtido pela PCR não garante que o animal esteja doente, sendo importante associar resultados laboratoriais ao estado clínico do animal (RASO, 2014).

Os testes de detecção direta de antígeno, apesar de serem técnicas baratas, rápidas e não necessitarem do organismo vivo, podendo inclusive ser obtidas a partir de esfregaços de tecidos de animais mortos, apresentam baixa sensibilidade e especificidade, sendo pouco utilizadas na rotina (RASO, 2014)

Os testes sorológicos mais comuns no diagnóstico da clamidiose incluem fixação do complemento (CF), que é o teste mais usado mundialmente para detecção de anticorpos de *C. psittaci*; ELISA; aglutinação em látex; aglutinação de corpos elementares (EBA); microimunofluorescência e testes de imunodifusão em agar gel. O EBA detecta apenas IgM e pode ser usado para o diagnóstico de infecções correntes. Um diagnóstico presuntivo pode ser feito se um único título elevado for encontrado em várias aves de uma população (CFSPH, 2009). Títulos de anticorpos são provas de uma infecção corrente ou passada, mas não provam uma infecção ativa a menos que haja um aumento de quatro vezes no título de anticorpo humoral demonstrado com o pareamento dos soros colhidos com duas semanas de intervalo, juntamente com sinais clínicos (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Verificar a ocorrência de *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp. em aves e serpentes no Zoológico do Rio de Janeiro.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar por técnicas moleculares as espécies de *Mycoplasma* e *Chlamydia* em aves e serpentes no plantel do zoológico;
- Relacionar as cepas de *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp. encontradas com outras que circulam mundialmente pela comparação entre os genótipos obtidos e outros publicados no GENBANK.

4 CAPÍTULO I: Investigation of *Mycoplasma* spp. in birds of the Rio de Janeiro Zoo by isolation and PCR.

O capítulo I refere-se ao artigo intitulado “*Investigation of Mycoplasma spp. in birds of the Rio de Janeiro Zoo by isolation and PCR*”, aceito para publicação no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira (Qualis – 2019: A4; Fator de Impacto JCR 2019: 0,44).

Investigation of *Mycoplasma* spp. in birds of the Rio de Janeiro Zoo by isolation and PCR¹

Bárbara S.N. Magalhães^{2*}, Virginia Léo A. Pereira³, Thomas S. Dias³, Leandro S. Machado³,
 Mariane M. Silva³, Elmiro R. Nascimento³, Flavya Mendes-de-Almeida² and Nádia Regina P. Almosny²

REGISTRO ORCID:

Bárbara Neil Magalhães - <https://orcid.org/0000-0001-7814-853X>

Leandro S. Machado - <https://orcid.org/0000-0002-1267-2766>

Thomas S. Dias - <https://orcid.org/0000-0001-8815-3316>

ABSTRACT.- Magalhães B.S.N., Pereira V.L.A., Dias T.S., Machado L.S., Silva M.M., Nascimento E.R., Mendes-de-Almeida, F. & Almosny N.R.P. 2020. **Investigation of *Mycoplasma* spp. in birds of the Rio de Janeiro Zoo by isolation and PCR.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 40(2):00-00. Graduate Program in Veterinary Medicine, Clinics and Animal Reproduction, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil. E-mail: barbaraneil@hotmail.com

Brazil is one of the countries with the most abundant avifauna in the world. The confinement of birds associated with close contact with other animals and humans favor the spread of agents of respiratory diseases. Among them, mycoplasmas can cause asymptomatic or apparent disease that manifests in birds by coughing, sneezing, rales, conjunctivitis, ocular and nasal discharge. Several described mycoplasmas cause disease in birds, especially *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS). The diagnosis of *Mycoplasma* spp. can be done by clinical observation and laboratory analysis. Molecular diagnosis by PCR was boosted by its speed, sensitivity, and low cost of agent isolation techniques that take up to 21 days to complete. This study aimed to verify the occurrence of *Mycoplasma* spp. in birds of the Rio de Janeiro Zoo (Rio Zoo), by isolation and PCR. Of the total 635 birds from the Rio Zoo, 81 were studied for detection of *Mycoplasma* spp., when taken for routine health assessment exams. These birds belonged to the following orders: Psittaciformes (45), Accipitriformes (18), Galliformes (7), Piciformes (5), Strigiformes (4), Falconiformes (1) and Cariamiformes (1), all individuals already identified by microchip or leg-ring. There was no isolation of mycoplasmas in any of the samples tested, whereas, in the PCR, 62.96% (51/81) were positive, with 1.96% (1/51) identified as MG and 19.61% (10/51) as MS, representing 1.23% (1/81) and 12.34% (10/81) of the total population studied. PCR was shown to be a more effective technique than isolation in the detection of *Mycoplasma* spp. in birds. It was possible to detect mycoplasmas in birds from Rio Zoo with no clinical respiratory signs, with higher MS prevalence than MG. The positivities for *Mycoplasma* spp., MS, and MG were different among the orders studied, being the highest occurrence in birds of prey, followed by Galliformes and Piciformes. The presence of MG and MS in birds of Rio de Janeiro Zoo confirms the circulation of these agents and the need for further studies on the dissemination of mycoplasmas in zoos for the epidemiological analysis of these bacteria in these places.

INDEX TERMS: Investigation, *Mycoplasma* spp., birds, Rio de Janeiro, Brazil, zoo, captive.

¹ Received on August 13, 2019.

Accepted for publication on September 10, 2019.

² Graduate Program in Veterinary Medicine (Clinics and Animal Reproduction), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340, Brazil.

³ Department of Veterinary Public Health, UFF, Rua Vital Brazil Filho 64, Niterói, RJ 24230-340.

*Corresponding author: barbaraneil@hotmail.com

RESUMO.- [Investigação de *Mycoplasma* spp. em aves do Zoológico do Rio de Janeiro por isolamento e PCR.] O Brasil é um dos países com maior avifauna do mundo. O confinamento de aves associado ao contato próximo a outros animais e seres humanos favorece a disseminação de agentes etiológicos causadores de doenças respiratórias. Dentre eles, os micoplasmas podem causar doença assintomática ou aparente que se manifesta em aves por espirros, estertores, conjuntivite, corrimentos oculares e nasais. São diversos os micoplasmas descritos causadores de doença em aves, com destaque para *Mycoplasma gallisepticum* (MG) e *Mycoplasma synoviae* (MS). O diagnóstico de *Mycoplasma* spp. pode ser feito pela observação clínica e análises laboratoriais. O diagnóstico molecular pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ganhou impulso por sua rapidez, sensibilidade e baixo custo em relação às técnicas de isolamento do agente que levam até 21 dias para conclusão do gênero *Mycoplasma*. Objetivou-se verificar a ocorrência da infecção por *Mycoplasma* spp. em aves no Zoológico do Rio de Janeiro (Rio Zoo), por isolamento e PCR. Do plantel de 635 aves do Rio Zoo, foram estudadas 81 para detecção de *Mycoplasma* spp., quando contidas para exames rotineiros de avaliação da condição de saúde. Essas aves eram pertencentes às ordens Psittaciformes (45), Accipitriformes (18), Galliformes (7), Piciformes (5), Strigiformes (4), Falconiformes (1) e Cariamiformes (1), todas já identificadas por microchip ou por anilha. Não houve isolamento de micoplasmas em nenhuma das amostras testadas, enquanto na PCR, 62,96% (51/81) foram positivas, sendo 1,96% (1/51) identificadas como MG e 19,61% (10/51) como MS, representando 1,23% (1/81) e 12,34% (10/81) da população total estudada. A PCR demonstrou ser uma técnica mais efetiva que o isolamento na detecção de *Mycoplasma* spp. em aves. Foi possível detectar micoplasmas nas aves do Riozoo sem sinal clínico respiratório, tendo MS maior prevalência do que MG. As positivities para *Mycoplasma* spp., MG e MS foram diferentes entre as ordens de aves estudadas, sendo a maior ocorrência nas aves de rapina, seguida dos Galliformes e dos Piciformes. A presença de MG e MS nas aves do Rio de Janeiro Zoo confirma a circulação destes agentes e a necessidade de mais estudos sobre a disseminação de micoplasmas em zoológicos para análise epidemiológica dessas bactérias nesse local.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Investigação, *Mycoplasma* spp., aves, zoológico, Rio de Janeiro, Brasil, PCR, cativo.

INTRODUCTION

The birds, which belong to a group of animals, are the most studied and valued in the world; it is composed of more than 11,000 different species and an extraordinary variety. Some occur in abundance, and others represented by a few remaining individuals. It is estimated that in Brazil, there are from 1600 to 1900 bird species, more than 10% of them endemic, which makes it to be considered one of the most avifauna countries in the world (Lewinsohn & Prado 2005). To present these different bird species to the public, zoos around the world have facilities for the maintenance of these captive animals. However, the confinement of animals, associated with their contact with visitors and breeders, make the transmission and dissemination of pathogens a specific risk in these places (Cubas 2008, Loria et al. 2008). Among these agents are those that cause respiratory diseases, with emphasis on mycoplasmas that can cause apparent or subclinical disease in birds (Nascimento & Pereira 2009). Its spread occurs directly or indirectly horizontally through people, other animals, feed, water, and fomites. In addition to this pathway, vertical transmission via egg or venereal may occur through mating or artificial insemination (Stipkovits & Kempft 1996, Nascimento & Pereira 2009).

Clinical signs commonly seen in wild and captive birds are sneezing, rales, eye and nasal discharge, unilateral conjunctivitis, or bilateral or not accompanied by enlargement of the infraorbital sinus and may be associated with chronic infections (Phalen et al. 2006). Among the main species of the genus *Mycoplasma*, stand out *M. gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS) which, cause an apparent or asymptomatic respiratory condition. But other species such as *M. gypis*, *M. vulturii*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum*, *M. iners* and *M. corogypsi* have been described as causing disease in birds (Poveda et al. 1990, Panangala et al. 1993, Fischer et al. 1997, Oaks et al. 2004).

To reduce the risk of these infections in bird populations and to assess the sanitary control of poultry, it is crucial to know and monitor these mycoplasmas in the environment by epidemiological surveys and laboratory tests associated with the development and implementation of strict standards and procedures in livestock (Vilani 2006). The mycoplasmic diagnosis can be presumptive with clinical and epidemiological, anatomopathological, serological, and etiological evaluations by agent isolation or PCR (Nascimento et al. 2005, Umar et al. 2017). Because these microorganisms are tedious, requiring enriched culture media, and they are slow to grow exponentially, bacteriological isolation has been used in conjunction with molecular techniques. PCR is fast, sensitive, requires a low laboratory cost, and does not

allow the need for isolation from clinical specimens (Islam et al. 2011). Therefore, the objective was to verify the occurrence of *Mycoplasma spp.* in birds of different orders at the “Zoológico do Rio de Janeiro” (Rio Zoo) by isolation and PCR.

MATERIALS AND METHODS

The project was submitted and approved under no. 1017 by “Comissão de Ética no Uso de Animais” (CEUA) of “Universidade Federal Fluminense” and by “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (SISBIO-ICMBio) under number 59538-1. In addition, the project was registered in “Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado” (SISGEN), no. A4E34FC.

Material collection. From the 635 birds of Rio Zoo, 81 were studied, belonging to the order Psittaciformes (45), Accipitriformes (18), Galliformes (7), Piciformes (5), Strigiformes (4), Falconiformes (1) and Cariamiformes (1) (Table 1), all already identified by microchip or washer. The animals were manually restrained for routine health assessment and samples collected of swab tracheal, which were conditioned in microtubes containing modified Frey's liquid medium (Nascimento 2000). The microtubes containing the swabs were kept refrigerated until the time of laboratory processing.

Isolation of *Mycoplasma spp.* An aliquot of 0.2mL of the collected sample was inoculated into 1.8mL of the modified Frey liquid medium. Serial dilutions were made until 10^{-5} , and the dilutions 10^{-3} and 10^{-5} were seeded on plates containing modified Frey solid medium (Nascimento 2000). All samples were incubated at 37°C under microaerophilic and observed for 21 days under a 100x magnification stereoscopic microscope (Razin et al. 1998).

DNA extraction. A 500µl aliquot of the collected sample was submitted to DNA extraction by the phenol-chloroform adapted method (Sambrook & Russell 2006). Each sample was then homogenized and centrifuged at 13,500rpm at 10°C for 20 minutes. After centrifugation, the supernatant was discarded, and 400µL of Tris Ethylenediaminetetraacetic acid (TE) dextrose, 30µl 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 30µl proteinase K 240µg/µl were added to the pellet. The sample was taken to the thermal block at 50°C for 30 minutes with a subsequent ice bath for 5 minutes. Subsequently, 500µL of phenol was added to the samples, homogenized by inversion for 15 minutes, and then centrifuged at 13,500rpm at 10°C for 30 minutes. The supernatant was removed and added to a new microtube with the same volume of chloroform, followed by gentle homogenization for 3 minutes and centrifugation under the conditions already described. The supernatant was removed, added to a 1ml microtube of ethyl alcohol, and precipitated “overnight.” The precipitated DNA was centrifuged at 13500rpm at 10°C for 20 minutes and the pellet after drying; it was resuspended in 100µL of TE buffer, quantified in Biodrop Touch® (Biochrom) and stored at -20°C until PCR.

PCR. The extracted DNA was submitted to PCR for the detection of *Mycoplasma spp.*, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), and *Mycoplasma synoviae* (MS) respectively, according to Van Kuppeveld et al. (1992, 1993), Nascimento et al. (2005) and Lauerman et al. (1993). The PCR for detection of *Mycoplasma spp.* was performed in 25µl final volume containing 2µl isolated DNA, 1 × PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0 and 50mM of KCl), 2mM MgCl₂, 0.2mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 0.2mM forward and reverse primers and 1U Taq polymerase. For MG detection the reaction contained: 1X PCR buffer; 2mM MgCl₂; 0.2mM dNTP; 0.2nmol of each specific primer (Table 2); 1U Taq Polymerase (Ludwig, Brazil) and extracted DNA totaling 25µl. The MG PCR was performed under the following conditions: 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 1 minute, 55°C for 2 minutes, and 72°C for 1 minute, with a final phase of 72°C for 5 minutes. The MS ATCC 25204 and MG ATCC 129 S6 strains were used as positive controls and as ultrapure water negative control. For MS the reaction contained 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0 and 50mM KCl); 1.5mM MgCl₂; 0.2mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP); 0.2nmol of each specific primer (Table 2); 1U Taq Polymerase, and extracted DNA, totaling 25µl. MS PCR was performed under the following conditions: 94°C for 1 minute, followed by 40 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute, with a final phase of 72°C for 5 minutes.

Electrophoresis. The amplicons obtained in PCR were applied in 1.5% agarose gel, submerged in Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE), and then submitted to electrophoretic run at 94V for 40 minutes. After the electrophoretic run, the gel was stained with ethidium bromide, and visualization of the amplicons was performed under ultraviolet light in a transilluminator.

Statistical analysis. Descriptive statistics were performed to obtain the percentages for *Mycoplasma spp.*, MG, and MS for order taxonomic of birds. The Mann-Whitney non-parametric test was used to differentiate between the percentages obtained, which uses the median for comparative effects, with a significance level of 5% using the Bioestat 5.3® software (Ayres et al. 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

Of the 81 birds studied, none showed clinical respiratory signs at the time of collection. All birds were negative for isolation for *Mycoplasma* spp., while PCR for *Mycoplasma* spp. detected 62.96% (51/81) of birds 1.96% (1/51) for MG and 19.61% (10/51) for MS, respectively representing 1.23% (1/81) and 12.34% (10/81) of the total population studied (Table 3). In the statistical analysis by the Mann-Whitney test, the differences in percentages obtained between the orders about *Mycoplasma* spp. and MS, were significant ($p < 0.05$), excluding the occurrence of MG because there was a single record during the study. Asymptomatic infections are the most common in mycoplasma-infected animals because these agents can escape of host immune system and remain dormant (Razin et al. 1998). Besides, the presence of low pathogenicity strains may cause a mild or inapparent clinical picture (Lecis et al. 2010).

The Falconiform and Cariamiform orders had only one individual tested in each of them, both being PCR positive for *Mycoplasma* spp., and the falconiform identified as MS positive. Without considering these specimens, the highest percentage of positive results for *Mycoplasma* spp. was observed in the Accipitriformes order, with 88.89% (16/18), 22.22% (4/18) identified as positive for MS. Then, in Galliformes, 71.43% (5/7) of positive birds were found, with 14.29% (1/7) characterized with MS; Piciform, 60.00% (3/5) for *Mycoplasma* spp. and 20.00% (1/5) for MS; Psittaciformes, 53.33% (24/45) for *Mycoplasma* spp., 2.22% (1/45) for *M. gallisepticum* (MG) and 6.67% (3/45) for MS. The order of lowest occurrence was Strigiformes with 25.00% (1/4) for *Mycoplasma* spp., but the species was not identified.

The results found for Psittaciformes contrast the studies of Silva et al. (2016) and Carvalho et al. (2017) when assessing the presence of *Mycoplasma* spp. in asymptomatic parrots under human care. Silva et al. (2016), when analyzing 85 parrots of different species from a zoo in Pernambuco, reported the presence of *Mycoplasma* spp. in 16.47% of the birds, however these mycoplasmas were not identified as MG or MS. Carvalho et al. (2017), when evaluating 300 samples of CETAS parrots, commercial and conservation breeding, observed positivity for *M. gallisepticum* (MG) in 21.6% (16/74) in CETAS, 15.7% (19/121) in commercial breeding, and 6.7% (7/105) in conservationist, while for MS the occurrences were 2.7 % (2/74) in CETAS, 0.0% (0/121) in commercial breeding and 1.9% (2/105) in conservationist. MG was still described with a high occurrence by Gomes et al. (2010) in parrots from the seizure of trafficking with the positivity of 85.4%.

Lecis et al. (2016) analyzed samples of 62 birds of prey from two Wildlife Centers and a Veterinary Hospital in Italy, obtaining positivity for *Mycoplasma* spp. in 41.9% (26/62) of them. In our study, we analyzed samples of three orders of birds considered of prey, Falconiformes, Accipitriformes, and Strigiformes in which we found positivities ranging from 25.00% to 88.89%, that is, with a mean positivity of 56.95%, with the prevalence obtained being higher than that presented by other authors. This difference may be due to the proximity between the nurseries, which may have favored or predisposed to mycoplasma infections (Kleven & Fletcher 1983). Lecis et al. (2016) observed clinical symptoms compatible with mycoplasmosis in a positive individual; in the present study, such occurrence was not observed, despite the high frequency of mycoplasma positive birds. The high frequency found in asymptomatic prey corroborates other studies where a high frequency of mycoplasma was observed in birds of prey with mild or inapparent clinical presentation (Lierz et al. 2008, Lecis et al. 2010, Ziegler et al. 2019).

For Kleven (1998), there may be a preference for MG and MS for Galliformes. However, in our study, the positivity for *Mycoplasma* spp. in this order was 71.43% (5/7), none positive for MG, and 14.29% (1/7) identified as MS in the wild Galliformes tested. Michiels et al. (2016) tested 15 wildlife Galliformes in Belgium, but none were positive; however, Haesendonck et al. (2014) demonstrated a high prevalence of 76.3% for MG and 36.0% for MS in Galliformes reared for ornamental purposes in the same country, suggesting that these birds may serve as a reservoir for these agents.

The high prevalence of *Mycoplasma* spp. in birds of the zoo, observed in this study, is important because birds with or in the subclinical state contribute to the maintenance of mycoplasmas in environments. Besides, its transmission occurs by diffusion in the form of aerosol or droplets, being the upper respiratory tract and conjunctiva the main entry doors of the pathogen (Nascimento & Pereira 2009, Stipkovits & Szathmary 2012). These agents are capable of causing respiratory signs, as well as severe reproductive disease in birds (Carnaccini et al. 2016), constituting a significant challenge for the conservation and rearing of wild and captive birds, because in addition to impairing rehabilitation, causes high mortality of embryos as well as young and adult birds (Gomes et al. 2010).

CONCLUSIONS

PCR was more effective than the isolation technique in detecting *Mycoplasma* spp. It was possible to detect mycoplasmas in birds of different orders without a clinical respiratory sign, obtaining *Mycoplasma synoviae* (MS) more prevalent than *Mycoplasma gallisepticum* (MG). The positivities for

Mycoplasma spp., MG, and MS were different among the studied orders, being the highest occurrence in birds of prey, followed by Galliformes and Piciformes.

The presence of MG and MS in the birds of Rio Zoo confirms the circulation of these agents and the need for further studies on the dissemination of mycoplasmas in zoos for epidemiological analysis of these bacteria in this location.

Acknowledgements.- We thank the technical staff of the “Zoológico do Rio de Janeiro” (Rio de Janeiro Zoo) for the partnership to collect the biological material for the study. This study was supported by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), Brazil.

Conflict of interest statement. - The authors have no competing interests.

REFERENCES

- Ayres M., Ayres Jr. M., Ayres D.L. & Santos A.A.S. 2007. Bioestat 5.0 Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. 5th ed. Sociedade Civil Mamirauá, Belém. 364p.
- Carnaccini S.N., Ferguson-Noel M.R., Chin P.T., Santoro P., Black M., Bland A., Bickford A. & Senties-Cué C.G. 2016. A novel *Mycoplasma* sp. associated with phallus disease in goose breeders: pathological and bacteriological findings. *Avian Dis.* 60(2):437-443.
- Carvalho A.M., Andrade M.A., Linhares G.F. & Jaime V.S. 2017. Pesquisa de *Mycoplasma* em aves da família Psittacidae mantidas em diferentes cativeiros no Brasil Central. *Pesq. Vet. Bras.* 37(10):1159-1164.
- Cubas Z.S. 2008. Biossegurança na manipulação de animais silvestres - biossegurança em zoológicos. *Ciênc. Vet. Tróp.* 11(1):174-177.
- Fischer J.R., Stallknecht D.E., Luttrell P., Dhondt A.A. & Converse K.A. 1997. Mycoplasmal conjunctivitis in wild songbirds: the spread of a new contagious disease in a mobile host population. *Emerg. Infect. Dis.* 3:69-72.
- Gomes A.M., Costa L.L., Vilela D.A.R., Marques M.V.R., Carvalhaes A.G., Marin S.Y., Costa M.P., Horta R.S., Resende J.S. & Martins N.R.S. 2010. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive Psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Revta Bras. Ciênc. Avic.* 12(2):75-78.
- Haesendonck R., Verlinden M., Devos G., Michiels T., Butaye P., Haesebrouck F., Pasmans F. & Martel A. 2014. High seroprevalence of respiratory pathogens in hobby poultry. *Avian Dis.* 58:623-627.
- Islam A., Aslam A., Chaudhry Z.I., Mansoor-Ud-Din A., Habib-Ur- Rehman L., Saeed K. & Ahmed I. 2011. Pathology of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected broilers and its diagnosis through PCR. *Int. J. Agricult. Biol.* 13(5):835-837.
- Kleven S.H. 1998. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poult. Sci.* 77:1146-1149.
- Kleven S.H. & Fletcher D.J. 1983. Laboratory infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 27:308-311.
- Lauerman L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M. & Van Santen V.L. 1993. Development and Application of a Polymerase Chain Reaction Assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 37(3):829-834
- Lecis R., Chessa B., Cacciotto C., Addis M.F., Coradduzza E., Berlinguer F., Muzzeddu M., Lierz M., Carcangiu L., Pittau M. & Alberti A. 2010. Identification and characterization of novel *Mycoplasmas* spp. belonging to the hominis group from griffon vultures. *Res. Vet. Sci.* 89:58-64.
- Lecis R., Secci F., Mandas L., Muzzeddu M., Pittau M. & Alberti A. 2016. Molecular Identification and Sequence Characterization of Mycoplasmas in Free-Living Birds of Prey. *J. Zoo Wild Med.* 47(3):917-922.
- Lewinsohn T.M. & Prado P.I. 2005. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade* 1(1):36-42.
- Lierz M., Hagen N., Hernadez-Divers S.J. & Hafez H.M. 2008. Occurrence of Mycoplasmas In free-ranging birds of prey in Germany. *J. Wildl. Dis.* 44(4):845-850.
- Loria G.R., Ferrantelli E., Giardina G., Vecchi L.L., Sparacino L., Oliveri F., Mcauliffe L. & Nicholas R.A.J. 2008. Isolation and characterization of unusual *Mycoplasma* spp. from captive Eurasian griffon (*Gys fulvus*) in Sicily. *J. Wildlife Dis.* 44:159-163.
- Michiels T., Welby S., Vanrobaeys M., Quinet C., Rouffaer L., Lens L., Martel A. & Butaye P. 2016. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathol.* 45(2):244-252.
- Nascimento E.R. 2000. Micoplasmoses, p.217-240. In: Macari M. & Berchieri Jr A. (Eds.), *Doenças das Aves*. FACTA, Campinas, SP.
- Nascimento E.R. & Pereira V.L.A. 2009. Micoplasmoses, p.485-495. In: Berchieri Jr A., Silva E.N., Di Fábio J., Sesti L. & Zuanaze M.A.F. (Eds), *Doenças das Aves*. 2ª ed. Ed. Facta, Fundação de APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, SP.

- Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Nascimento M.G.F. & Barreto M.L. 2005. Avian mycoplasmosis update. *Revta Bras. Ciênc. Avíc.* 7(1):1-9.
- Oaks J.L., Donahoe S.L., Rurangirwa F.R., Rideout B.A., Gilbert M. & Virani M.Z. 2004. Identification of a novel *Mycoplasma* species from an oriental white backed vulture (*Gyps bengalensis*). *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5909-5912.
- Panangala V.S., Stringfellow J.S., Dybvig K., Woodard A., Sun F., Rose L. & Gresham M.M. 1993. *Mycoplasma corogypsi* sp. nov., a new species from the footpad abscess of a black vulture, *Coragyps atratus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:585-590.
- Phalen D.N., Logan K.S. & Snowden K.F. 2006. *Encephalitozoon bellem* infection as the cause of a unilateral chronic keratoconjunctivitis in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *Vet. Ophthalmol.* 9(1):59-63.
- Poveda J.B., Carranza J., Miranda A., Garrido A., Hermoso M., Fernandez A. & Domenech J. 1990. An epizootiological study of avian mycoplasmas in Southern Spain. *Avian Pathol.* 19:627-633.
- Razin S., Yogev D., Naot Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1094-156.
- Sambrook J. & Russell D.W. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol-chloroform. [CSH Protoc.](#) 2006(1).
- Silva L.T.R., Santos S.B., Rameh-de-Albuquerque L.C., Siqueir D.B., Amorim M.M.R., Almeida J. & Mota R.A. 2016. Detecção molecular e isolamento de *Mycoplasma* spp. em psitacídeos no estado de Pernambuco, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68(1):113-118.
- Stipkovits L. & Kempft I. 1996. Mycoplasmosis in poultry. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Épiz.* 15(4):1495-1525.
- Stipkovits L. & Szathmary S. 2012. *Mycoplasma* infection of ducks and geese. *Poult Sci.* 91(11): 2812-2819.
- Umar S., Munir M.T., Ur-Rehman Z., Subhan S., Azam T. & Shah M.A.A. 2017. Mycoplasmosis in poultry: update on diagnosis and preventive measures. *Worlds Poult. Sci. J.* 73(1):17-28.
- Van Kuppeveld F.J., Van der Logt J.T., Angulo A.F., Van Zoest M.J., Quin W.G., Niesters H.G. & Melchers W.J. 1992. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8): 2606-2615.
- Van Kuppeveld F.J., Van der Logt J.T., Angulo A.F., Van Zoest M.J., Quint W.G., Niesters H.G. & Melchers W.J. 1993. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(2):655.
- Vilani R.G.D.C. 2006. Estrutura Hospitalar, Quarentenário e Centros de Triagem, p.33-42. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo, SP.
- Ziegler L., Palau-Ribes F.M., Enderlein D., Herbst W., Schmidt L. & Lierz M. 2019. *Mycoplasma hafezii* sp. nov., isolated from the trachea of a peregrine falcon (*Falco peregrinus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:773-777.

Table 1. Order, species, common name and number of birds of the Rio de Janeiro Zoo evaluated for the detection of *Mycoplasma* spp.

Order	Species	Common name	Number	Total
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	Real parrot	09	45
	<i>Amazona ocrecephala</i>	Puffin Parrot	01	
	<i>Ara ararauna</i>	Canary Macaw	11	
	<i>Ara macao</i>	Scarlet Macaw	03	
	<i>Ara chloropterus</i>	Red Macaw	03	
	<i>Anodorhynchus leari</i>	Lear's Macaw	04	
	<i>Guaruba guarouba</i>	Ararajuba	10	
	<i>Pyrrhura frontalis</i>	Red-fronted Tiriba	01	
	<i>Pionus maximilliani</i>	Green parrot	03	
Accipitriformes	<i>Amadonastur lacernulatus</i>	Pigeon Hawk	03	18
	<i>Geranoaetus albicaudatus</i>	White-tailed Hawk	06	
	<i>Leptodon cayanensis</i>	Gray-headed Hawk	01	
	<i>Heterospizias meridionalis</i>	Leather-tailed Hawk	04	
	<i>Rupornis magnirostris</i>	Carijó Hawk	04	
Falconiformes	<i>Milvago chimachima</i>	Yellow-tailed Hawk	01	01
Galliformes	<i>Pavo muticus</i>	Peacock	02	07

	<i>Crax alector</i>	Black Porcupine	02	
	<i>Crax fasciolata</i>	Pinum Curassow	01	
	<i>Chrylophus pictus</i>	Canary Pheasant	01	
	<i>Pavo cristatus</i>	Blue Peacock	01	
Piciformes	<i>Ramphastos toco</i>	Toucan Toco	05	05
Strigiformes	<i>Strix huhula</i>	Black owl	01	
	<i>Pseudoscops clamator</i>	Eared owl	03	04
Cariamiformes	<i>Cariama cristata</i>	Seriema	01	01
TOTAL				81

Table 2. Primer oligonucleotides for PCR for detection of avian *Mycoplasma* with their sequences, amplified product size and reference

"Primers"*	Sequence	Product	Reference
Mspg GPO3	5'GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT3'	270pb	Van Kuppeveld et al.
Mspg MGSO	5'TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC3'		(1992, 1993)
MG-f	5'CGTGGATATCTTTAGTTCCAGCTGC3'	481 pb	Nascimento et al.
MG-r	5'GTAGCAAGTTATAATTTCCAGGCAT3'		(2005)
MS-f	5'GAGAAGCAAATAGTGATATCA3'	207 pb	Lauerman et al.
MS-r	5'CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA3'		(1993)

Mspg f and Mspg r = *Mycoplasma* spp., MG-f and MG-r = *Mycoplasma gallisepticum*, MS-f and MS-r = *Mycoplasma synoviae*.

Table 3. Isolation and PCR detection of *Mycoplasma* spp., *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by the order of the birds of Rio de Janeiro Zoo

Order	Isolation		PCR	
	Mspg.*	Mspg.*	MG**	MS***
Psittaciformes	0/45 (0%)	24/45 (53.33%)	1/45 (2.22%)	3/45 (6.67%)
Accipitriformes	0/18 (0%)	16/18 (88.89%)	0/18 (0.00%)	4/18 (22.22%)
Falconiformes	0/1 (0%)	1/1 (100.00%)	0/1 (0.00%)	1/1 (100.00%)
Galliformes	0/7 (0%)	5/7 (71.43%)	0/7 (0.00%)	1/7 (14.29%)
Piciformes	0/5 (0%)	3/5 (60.00%)	0/5 (0.00%)	1/5 (20.00%)
Strigiformes	0/4 (0%)	1/4 (25.00%)	0/4 (0.00%)	0/4 (0.00%)
Cariamiformes	0/1 (0%)	1/1 (100.00%)	0/1 (0.00%)	0/1 (0.00%)
TOTAL	0/81 (0%)	51/81(62.96%)	1/81 (1.23%)	10/81(12.3%)

* Mspg.= *Mycoplasma* spp., ** MG = *Mycoplasma gallisepticum*, *** MS = *Mycoplasma synoviae*.

5 CAPÍTULO II: Occurrence of Avian Mycoplasmas in Free-Living Muscovy-Ducks (*Cairina moschata*).

O capítulo II refere-se ao artigo intitulado “*Occurrence of Avian Mycoplasmas in Free-Living Muscovy-Ducks (Cairina moschata)*”, aceito para publicação no periódico Revista Brasileira de Ciência Avícola (Qualis – 2019: B1; Fator de Impacto JCR 2019: 0,759).

Occurrence of avian Mycoplasmas in free-living Muscovy-ducks (*Cairina moschata*)

Bárbara S. N. Magalhães¹, Virginia Léo de A. Pereira², Leandro dos S. Machado², Thomas S. Dias^{2*}, Daniel A. Balthazar³, Maria Lucia Barreto⁴, Fernando Troccoli⁵, Nathalie C. da Cunha^{1,2}, Elmiro R. do Nascimento², Flavya Mendes-de-Almeida¹, Nádia Regina P. Almosny¹

1Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF);

2Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF)

3 Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

4 Departamento de Imunobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF)

5 Fundação Zoológico do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate, by culture and PCR, the occurrence of Mollicutes, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in free-living Muscovy-ducks (*Cairina moschata*) from the Rio Zoo, RJ, Brazil. Tracheal swabs were obtained from 82 asymptomatic ducks and the samples were submitted to culture of mycoplasmas and PCR for identification of Mollicutes Class, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS). Samples were also analyzed directly by PCR, without prior culture, for Mollicutes, MG and MS. Eighteen (18/82) Muscovy-ducks were positive for Mollicutes by culture, all isolates were confirmed as Mollicutes being seven identified as MG. Of the samples analyzed directly by PCR, without prior culture, 17,1% (14/82) was positive for Mollicutes, being 35,7% (5/14) identified as MG and 21,4% (3/14) as MS. The occurrence of Mollicutes class bacteria was detected in Muscovy-ducks. MG and MS were identified in these animals suggesting the circulation of these agents in the Rio de Janeiro Zoo and may present a risk for the health status of the other birds.

Keywords: Anseriformes, free-living, Mollicute Class, Muscovy-ducks, mycoplasmosis

INTRODUCTION

Mycoplasmas are the smallest known prokaryotes, that can cause acute or chronic diseases, lacking cell wall, colonies usually have a characteristic “fried-egg” appearance and transmission may occur horizontally or vertically (Razin *et al.*, 1998). The clinical signs commonly observed in wild birds are cough, sneezing, rales, eye discharges and nasal, conjunctivitis (Nascimento *et al.*, 2005b). *M. gallisepticum* (MG) and *M. synoviae* (MS) are the main species of mycoplasmas, causing an economic impact due decrease of egg production and egg quality, poor hatchability, high rate of embryonic mortality and culling of day-old birds, increase in mortality and medication costs (Nascimento *et al.*, 2005b) therefore mycoplasmosis can represent an important disease in the rearing and breeding of wild birds (Gomes *et al.*, 2010).

Mycoplasmas have been isolated from domestic (Ivanics *et al.*, 1988) and wild ducks (Goldberg *et al.*, 1995) although *M. gallisepticum* and *M. synoviae* causes no clinical signs in infected ducks (Bencina *et al.*, 1988) so these ducks are able to spread mycoplasma silently and may play an important role as a reservoir of pathogenic mycoplasmas. To our knowledge there is no report of MG or MS in free-living Muscovy-ducks. At the Riozoo it was possible to observe a population of free-living Muscovy-ducks (*Cairina moschata moschata*) crossbreed with domestic ducks (*Cairina moschata domestica*). This crossing generated multiples birds with high flight and reproduction capacity that are distributed throughout the zoo area, with possibility to fly inside and outside the zoo premises, thus having direct contact with other free birds, such doves, sparrows and, pigeons and also birds from the zoo collection, as well as with employees and visitors of the park. The Muscovy-ducks (*Cairina moschata*) belongs to the Order Anseriformes, Family Anatidae, and is widely distributed from Mexico to southern South America. Muscovy-ducks have a high reproductive potential and escaped or intentionally introduced populations can establish themselves in urban and suburban environments (Downs *et al.*, 2017). The presence of these birds in urban/suburban areas may be a risk for transmission of diseases to other birds (Solomon *et al.*, 2012). The present study aimed to investigate, by culture and PCR, the occurrence of Mollicutes, *Mycoplasma gallisepticum*, and *Mycoplasma synoviae* in free-living muscov-ducks from the Rio Zoo, RJ, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved under no. 1017 by “Comissão de Ética no Uso de Animais” (CEUA) of “Universidade Federal Fluminense” and by “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (SISBIO-ICMBio) under number 59538-1. In addition, the project was registered in “Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado” (SISGEN), no. A4E34FC.

In this study the whole population of free-living Muscovy-ducks (n=82) (*C. moschata*), from the Rio de Janeiro Zoo, Brazil (S22°54' W 43°13'), regardless of gender or age were analyzed. They lived in fairly small groups spread across the Rio Zoo, with possibility to fly inside and outside the zoo area. The animals were captured and manually restrained, identified with foot rings at the time of collection and tracheal swabs were collected, conditioned in microtubes containing modified Frey's liquid medium (Nascimento & Pereira, 2009) and kept refrigerated until the processing. All the ducks were clinically examined and showed no clinical signs of disease.

An aliquot of 0.2mL of the collected sample was inoculated into 1.8mL of the modified Frey liquid medium (Himedia, India). Serial dilutions were made until 10^{-5} , and the dilutions 10^{-3} and 10^{-5} were spread on plates containing modified Frey solid medium (Himedia, India) (Nascimento & Pereira, 2009). All samples were incubated at 37°C under microaerophilic and observed for 21 days under a 100x magnification stereoscopic microscope (Razin *et al.*, 1998). For molecular detection, a 0.5mL aliquot of the collected sample was submitted to DNA extraction by the phenol-chloroform adapted method (Sambrook & Russell, 2006). DNA amount and quality determination was performed in BiodropTouch® (Biochrom, Harvard Bioscience, EUA) with subsequent PCR for the detection of Mollicutes class, MG, and MS according to Uphoff & Drexler (2002), Nascimento *et al.* (2005a) and Lauerman *et al.* (1993) respectively. The PCR for detection of Mollicutes was performed containing 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0 and 50mM of KCl), 2.0 mM of MgCl₂, 0.8 mM of dNTP, 1U of Taq Polymerase (Ludwig, Brazil), 0.6 μM of each primer (Invitrogen, Brazil) and 5μL of DNA. For MG detection the reaction contained: 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0 and 50mM of KCl), 2mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1U Taq Polymerase (Ludwig, Brazil), 0.2nmol of each specific primer (Invitrogen, Brazil), and 2μL of DNA. MS reaction contained 1X PCR buffer

(10mM Tris-HCl, pH 8.0 and 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂; 0.2mM of dNTP, 0.2nmol of each specific primer (Invitrogen, Brazil) and 2 μ L of DNA. All reactions were performed in PTC-100[®] thermocycler (Bio-Rad Laboratories, England) with a final volume of 25 μ L. The MS ATCC 25204 and MG ATCC 129 S6 strains were used as positive controls and as ultrapure water negative control. The amplicons obtained in PCR were separated in 1.5% agarose gel, submerged in Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE), and then submitted to electrophoretic run at 94V for 40 minutes. Following the electrophoretic run, the gel was stained with ethidium bromide, and visualization of the amplicons was done under ultraviolet light in a transilluminator and the image captured for photodocumentation.

Cohen's kappa (κ) test was performed to estimate the degree of concordance between PCR and culture.

RESULTS AND DISCUSSION

Among the 82 Muscovy-ducks evaluated in this study 21.9% (18/82) were positive for Mollicutes by culture method. Of these isolates all were confirmed as Mollicutes by PCR and 38,9% (7/18) as *M. gallisepticum* and *M. synoviae* was not detected. The culture of MS is more difficult when compare to other mycoplasmas (Elhamnia *et al.*, 2010), and the other mycoplasmas can inhibit MS growth producing false-negative results in the culture. In samples analyzed directly by PCR, without prior isolation, 17,1% (14/82) was positive for Mollicutes, being 35,7% (5/14) identified as MG and 21,4% (3/14) as MS. Avian mycoplasmosis can be diagnosed by isolation and PCR, and tracheal and choanal fissure swabs are excellent samples for these techniques, being widely used to diagnose or monitor MG and MS in birds (Umar *et al.*, 2017). In our study it was possible to identify more positive samples for Mollicutes by isolation than by PCR, although this technique is considered to be more rapid, sensitive, and specific. The agreement between culture and PCR was almost perfect ($\kappa=0.8453$) and combination of these techniques are recommended to increase the probability of mycoplasmas detection. Our study differs from Timenetsky *et al.* (2006) which detected more infected samples by PCR than the culture, but five positive cultures were not confirmed by PCR for Mollicutes, and their identification was only possible by specific PCR. Difference in culture and PCR results can be explained by the number of mycoplasmas in the sample, occurrence of inhibitors or failure in the diagnostic method (Timenetsky *et al.*, 2006).

The presence of mycoplasmas in asymptomatic wild captive birds has already been reported in the study by Silva *et al.* (2016) who observed a prevalence of 16.5% *Mycoplasma* spp. in 85 parrots and Carvalho *et al.* (2017) who found percentages of 21.6%, 15.7% and 6.7% positivity in birds from, respectively, a Wild Animal Sorting Center, a commercial breeding site and a conservation breeding site and these results agree with what was found in our study. The presence of these free-living ducks close to captive birds in the zoo can pose a risk to health of susceptible birds and to species recovery programs, since there is a possibility that Muscovy ducks acting as reservoir of pathogenic mycoplasmas.

Several ducks in our study were positive for MG and MS and, lived spread across the Rio Zoo, and according to Nascimento & Pereira (2009), the presence of mycoplasmas in wild birds can favor the maintenance of this agent in the environments by the presence of birds with clinical disease or inapparent infection. MG and MS circulation in asymptomatic birds was also found in a study by Carvalho *et al.* (2017) which detected positivity of 34.15% for MG and 7.32% for MS in 14 species of parrots positive for *Mycoplasma* spp. Michiels *et al.* (2016) conducted a study of the prevalence of MG and MS in commercial birds, homing pigeons and wild birds in Belgium and concluded that wild birds probably play a limited role as a reservoir, but cannot be excluded with a possible impact on the transmission of mycoplasmas. Therefore, studies like ours are important to understand the epidemiological dynamics of avian mycoplasmas and how they are distributed among bird species.

Mollicutes, *M. gallisepticum*, *M. synoviae* were detected in Muscovy-ducks (*Cairina moschata*), suggesting the circulation of these agents in the Rio de Janeiro Zoo. Due the possibility of fly and walk across the zoo these Muscovy-ducks can play a role as reservoirs and disseminators of pathogenic mycoplasmas and can represent a risk for other birds. Further studies should be carried out on the dissemination of mycoplasmas in these birds for the epidemiological analysis of these bacteria, assessment of the possible interference in the health of birds inside and out of RioZoo.

DECLARATION OF COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing financial interests or conflicts.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially financed by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and “Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro” (FAPERJ).

REFERENCES

- Bencina D, Tadina T, Dorrer D. Natural infection of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and Mycoplasma egg transmission. *Avian Pathology* 1988; 17:441–9.
- Carvalho AM, Andrade MA, Linhares GFC, Jaime VS. Pesquisa de Mycoplasma em aves da família Psittacidae mantidas em diferentes cativeiros no Brasil Central. *Pesq Vet Bras* 2017; 37:1159–64.
- Downs J, Loraamm R, Anderson J, Perry J, Bullock J. Habitat use and behaviours of introduced muscovy ducks (*Cairina moschata*) in urban and suburban environments. *Suburban Sustainability* 2017; 5.
- Elhamnia F, Banani M, Shokri GR, Pourbakhsh SA, Ashtari A. Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. *Archives of Razi Institute* 2010; 65.
- Goldberg DR, Samuel MD, Thomas CB, Sharp P, Krapu GL, Robb JR, Kenow KP, Korschgen CE, Chipley WH, Conroy MJ, Kleven SH. The occurrence of mycoplasmas in selected wild north american waterfowl. *Journal of Wildlife Diseases* 1995; 31:364–71.
- Gomes AM, Costa LL, Vilela D a. R, Marques MVR, Carvalhaes AG, Marin SY, Costa M P, Horta RS, Resende JS, Martins NRS. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2010; 12:75–8.
- Ivanics E, Glávitits R, Takács G, Molnár E, Bitay Z, Meder M. An outbreak of *Mycoplasma anatis* infection associated with nervous symptoms in large-scale duck flocks. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* 1988; 35:368–78.
- Lauerma LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, van Santen VL. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases* 1993; 37:829–34.
- Michiels T, Welby S, Vanrobaeys M, Quinet C, Rouffaer L, Lens L, Martel A, Butaye PP. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathology* 2016; 45:244–52.

Nascimento ER do, Nascimento M da GF do, Vasconcelos MP de, Barreto ML, Almeida JF de, Campos CA de M, Pereira VLP. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do “amplicon” e ajustes no processamento da amostra. *Acta Scientiae Veterinarie* 2005a; 33:297.

Nascimento ER, Pereira VL de A. Micoplasmoses. In: Fabio J, Rossini L, editors. *Doenças das Aves*. 2nd ed., Campinas: FACTA; 2009.

Nascimento ER, Pereira VLA, Nascimento MGF, Barreto ML. Avian mycoplasmosis update. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2005b; 7:1–9.

Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62:1094–156.

Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protocol* 2006; 2006.

Silva LTR, Santos SB, Rameh-de-Albuquerque LC, Siqueira DB, Amorim MMR, Almeida JC, Oliveira AAF, Mota RA. Detecção molecular e isolamento de *Mycoplasma* spp. em psitacídeos no estado de Pernambuco, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2016; 68:113–8.

Solomon P, Bisschop S, Joannis TM, Shittu I, Meseko C, Sulaiman L, Gado D, Oladokun AT, Olawuyi, Abolnick C. Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses isolated from asymptomatic guinea fowls (*Numida meleagris*) and Muscovy ducks (*Cairina moscata*) in Nigeria. *Tropical Animal Health and Production* 2013;45:53–7.

Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 2006; 39:907–14.

Umar S, Munir MT, Ur-Rehman Z, Subhan S, Azam T, Shah MAA. Mycoplasmosis in poultry: update on diagnosis and preventive measures. *World’s Poultry Science Journal* 2017; 73:17–28.

Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 2002; 38:79–85.

6 CAPÍTULO III: *Mycoplasma* spp. in captive snakes (*Boa constrictor* and *Bothrops atrox*) from Brazil.

O capítulo III refere-se ao artigo intitulado “*Mycoplasma* spp. in captive snakes (*Boa constrictor* and *Bothrops atrox*) from Brazil”, aceito para publicação no periódico *Ciência Rural* (Qualis – 2019: A4; Fator de Impacto JCR 2019: 0,556).

***Mycoplasma* spp. in captive snakes (*Boa constrictor* and *Bothrops atrox*) from Brazil**
***Mycoplasma* spp. em cobras de cativeiro (*Boa constrictor* and *Bothrops atrox*) do Brasil**

Barbara Souza Neil Magalhães¹, Leandro dos Santos Machado¹, Arthur de Almeida Figueira¹, Thomas Salles Dias^{1*}, Thiago de Almeida Feijó³, Maria Lucia Barreto², Giulia de Almeida Tuffanelli¹, Nathalie Costa da Cunha¹, Elmiro Rosendo do Nascimento¹, Virginia Léo de Almeida Pereira¹, Nádia Regina Pereira Almosny¹

1 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24230-340, Niterói, RJ, Brasil. E-mail: thomassalles@id.uff.br. *Corresponding author.

2 Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil.

3 Fundação Jardim Zoológico da Cidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ABSTRACT

Although rare, mycoplasmas are included among the causes of respiratory diseases in reptiles and, in the order Squamata, three reports of these microorganisms causing diseases in pythons have already been reported. This study aimed to evaluate the occurrence of *Mycoplasma* species in captive snakes. A total of 26 snakes of the families Pythonidae (13), Boidae (7), Viperidae (5) and Colubridae (1) from RioZoo, Brazil, were evaluated. Animals were examined to determine clinical signs consistent with any infectious disease. Tracheal swab samples from snakes were collected in Frey medium and analyzed for the presence of *Mycoplasma* spp. by isolation and a genus-specific PCR. DNA sequencing analyses of six positive samples by PCR were carried out to identify the species. Using isolation 19.23% (5/26) was positive, while 65.38% (17/26) of the animals were positive by PCR. Based on the analyses of the six sequences obtained, there was similarity with a *Mycoplasma* spp. previously described in a python and, *M. agassizii* and *M. testudineum* reported in chelonians. This is the first report of *Mycoplasma* spp. in animals of the families Boidae and Viperidae. *Mycoplasma* spp. were detected in snakes with and without clinical signs. The mycoplasmas reported resented identity (range, 95% to 100%) to others already described in reptiles. There was no relationship between the presence of *Mycoplasma* spp. and clinical signs.

Key words: Mycoplasmosis, Mollicutes, Order Squamata, Boidae, Viperidae.

RESUMO

Embora raros, os micoplasmas estão incluídos entre as causas de doenças respiratórias em répteis e, na ordem Squamata, já foram realizados três relatos destes microrganismos causando doença em pítons. Este estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de espécies de *Mycoplasma* em serpentes em cativeiro. Foram avaliadas 26 serpentes das famílias Pythonidae (13), Boidae (7), Viperidae (5) e Colubridae (1) do RioZoo, Brasil. Os animais foram examinados para determinar sinais clínicos consistentes com qualquer doença infecciosa. Amostras de swab traqueal de cobras foram coletadas em meio Frey e analisadas por isolamento microbiológico e pela técnica da PCR para identificar *Mycoplasma* spp. As amostras positivas para o gênero *Mycoplasma* spp. foram submetidas ao sequenciamento genético para identificação das espécies. No isolamento, 19,23% (5/26) foram positivos, enquanto 65,38% (17/26) dos animais foram positivos por PCR. Com base nas análises das seis sequências obtidas, houve similaridade com o *Mycoplasma* spp. descrito anteriormente em um píton e *M. agassizii* e *M. testudineum* encontrados em quelônios. Este é o primeiro relato de *Mycoplasma* spp. em animais das famílias Boidae e Viperidae. *Mycoplasma* spp. foi detectado em serpentes com e sem sinais clínicos. Os micoplasmas encontrados apresentaram semelhança genética com outros já descritos em répteis. Não houve relação entre a presença de *Mycoplasma* spp. e sinais clínicos.

Palavras-chave: Micoplasmose, Mollicutes, Ordem Squamata, Boidae, Viperidae

INTRODUCTION

In reptiles, many infectious agents, including viruses, bacteria, fungi, and parasites, have been linked to morbidity and mortality in wild and captive populations. Respiratory tract are among the major affected system in these animals, and most of the agents isolated from sick reptiles are Gram-negative bacteria, including *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., and *Klebsiella* spp. (SCHUMACHER, 2006).

Although rare, mycoplasmas are included among the causes of respiratory diseases in reptiles; then tortoises present mycoplasmosis, with nasal and ocular exudate, palpebral edema, rhinitis, tracheitis, pneumonia and stomatitis as major clinical manifestations; although, cases of animals with subclinical manifestations or even asymptomatic are also reported. There are two species of *Mycoplasma* known as pathogenic and causative agents of upper respiratory tract infections in chelonians, *M. agassizii* and *M. testudineum* (BROWN et al., 1994; BROWN et al., 2004; JACOBSON et al., 2012; JACOBSON et al., 2014; OSSIBOFF et al., 2015; SEIMON et al., 2017). In crocodylians, mycoplasma has been reported as a cause of pneumonia, tracheitis and polyarthritis (KIRCHHOFF et al., 1997; DRIGGERS et al., 2000).

Reports of mycoplasmas in Serpentes (Ophidia) are rare and three cases were reported in pythons (PENNER et al., 1997; SCHMIDT et al., 2013; MARSHANG et al., 2016). In two cases the detected bacteria were classified as *Mycoplasma* spp. (PENNER et al., 1997; MARSHANG et al., 2016) and in one case, the detected sequence was closely related to corresponding sequences from *M. caviae* and *M. fermentans* (SCHMIDT et al., 2013). In other squamates, *M. iguanae* was described as possible causative agent of spinal cord degeneration in two green iguanas (*Iguana iguana*) (BROWN et al., 2006), but a subsequent study was not able to induce disease by inoculation of *M. iguanae* and also report *M. insons* sp. nova in both inoculated and uninoculated iguanas. Therefore, *M. iguanae* was considered unlikely to be an agent of acute disease in iguanas and *M. insons* was considered as normal flora in the respiratory tract of iguanas (BROWN et al., 2007).

Due to the few reports of *Mycoplasma* in snakes, its relationship with clinical signs is poorly studied and the absence of Koch's postulates raise the question about the mycoplasmas role as causing of disease in these animals. The aim of this study was to evaluate the occurrence of *Mycoplasma* species in captive snakes.

MATERIALS AND METHODS

This project was submitted and approved under number 1017 by the Ethics Committee on Use Animal Use (CEUA) from the Fluminense Federal University (UFF), by

the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO-ICMBio) under no. 59538-1 and was also registered at the National System for the Management of Genetic Resources and Associated Traditional Knowledge (SISGEN), no. A4E34FC.

The study included 26 snakes from Rio de Janeiro Zoo, located in the State of Rio de Janeiro, Brazil. The snakes belong to ten different species from the families Pythonidae (n=13), Boidae (n=7), Viperidae (n=5), and Colubridae (n=1). Viperidae and colubridae snakes were housed in individual cages, Pythons were kept in 2 groups according to species (group 1= 9 Burmese pythons and group 2 = 4 Ball pythons) and all boids were housed together in the same enclosure. The groups /animals housed individually had no contact with one another or with other animals. Animals were examined to determine clinical signs consistent with any infectious disease. Thereafter, tracheal swabs were collected and packaged in 1,8 mL of modified (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009) Frey medium, cooled and forwarded immediately to the Molecular Epidemiology Laboratory of Faculty of Veterinary for analysis by isolation and polymerase chain reaction (PCR) on the same day.

Isolation of Mycoplasma spp.

From each animal one aliquot of 0.2 mL of the collected sample was inoculated in 1.8 mL of liquid Frey medium. Afterwards, serial dilutions up to 10^{-5} were carried out and the dilutions 10^{-3} and 10^{-5} were inoculated onto plates containing modified solid Frey medium. All samples were incubated at 37 °C under microaerophilic conditions and observed on a daily basis for 21 days, at 100X magnification using stereoscopic microscope. The colonies presenting the characteristics of mycoplasmas in the solid medium were examined using Dienes' stain and a digitonin sensitivity test to confirm that they were *Mycoplasma* spp.

DNA extraction and PCR

Aliquots of 500 µL from tracheal swab samples soaked in modified Frey medium, and the positive cultures from each animal were submitted to DNA extraction using the phenol-chloroform method adapted (Sambrook & Russell, 2006). Subsequently, the samples were submitted to a genus-specific PCR for mycoplasma detection (UPHOFF & DREXLER,

2002). The amplification reaction contained: ultrapure water Milli-Q, 1X PCR buffer, 2.0 mM of MgCl₂, 0.8 mM of dNTP mix, 0.6 μM of each primer specific for *Mycoplasma* spp. (Table 1), 1U of Taq Polymerase (5U/μL) and 5μL of extracted DNA with a final volume of 25 μL. *Mycoplasma gallisepticum* (MGR-ATCC 19619) was used as positive control and ultrapure water Milli-Q as negative control of the reaction.

Reactions were performed in PTC-100[®] thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Ltda., Hertfordshire, England) using the following conditions: 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 1 minute and 30 seconds, and a final cycle of 72 °C for 7 minutes. The amplicons obtained in the PCR were separated in agarose gel at 1.5%, immersed in Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer, and submitted to an electrophoretic run of 94 Volts for 40 minutes. After the electrophoretic run, the gel was stained in ethidium bromide and the amplicons were visualized under ultraviolet light in a transilluminator. For samples with mycoplasma-positive result a 500 bp amplicon was expected.

Purification, sequencing and analysis

Samples positive for *Mycoplasma* spp. were submitted to DNA sequencing to identify the species. The 500 bp amplicons were purified by Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Purified products were sent to the Sequencing Platform subunit RPT01A of Oswaldo Cruz Institute, where they were sequenced using automatic sequencer ABI3730 (Applied Biosystems[®], Foster City, California, USA). Sequences generated were trimmed in Bioedit, deposited in the GenBank[®] database (Accession numbers MK918637 to MK918642). Phylogeny was inferred by using the Maximum Likelihood method and Kimura 2-parameter model (KIMURA, 1980). The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates was used to infer the phylogeny of the taxa analyzed, and branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates were

collapsed. Percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. This analysis involved 18 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option). There was a total of 347 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the program BioEstat 5.0. Difference between the presence of *Mycoplasma* spp. and presence or absence of clinical signs were examined for significance at a 0.05 level using Fisher's exact test.

RESULTS AND DISCUSSION

By isolation, 19.23% (5/26) were positive for *Mycoplasma* spp. and the identity of the isolates was confirmed by Dienes and digitonin tests and PCR. Of the 26 snakes tested, PCR products with a similar size to those expected for *Mycoplasma* spp. were obtained from 65.4% (17/26). Based on DNA sequencing, six sequences (6/17) had good quality and the other eleven sequences obtained had low quality and were discarded for further analysis (Table 2). After trimming in Bioedit software the length of the six sequences ranged from 358pb to 438pb. Only three animals (*Python regius*, *Boa constrictor constrictor* and *Bothrops atrox*) presented clinical signs, such as stomatitis, anorexia, and weight loss, and were positive for *Mycoplasma* spp. in PCR and isolation. When comparing animals regarding the presence of mycoplasma and clinical signs no statistical difference was observed by Fisher exact test (p=0.9981).

The sequences (GenBank access numbers MK918637 to MK918642), presented 100% identity with a *Mycoplasma* sp. sequence (GenBank access numbers KU862617)

described by MARSHANG et al., (2016) in a python with stomatitis. Also was detected a similarity with sequences from strains of *M. agassizii* (GenBank access numbers KY212528.1 to KY212536.1), and *M. testudineum* (GenBank access numbers FJ666138, NR_115220.1, NR_044767.1) reported in chelonians and *M. iguanae* (GenBank access number AY714305) in iguanas. Phylogenetic tree (Figure 1) demonstrated the relationship among mycoplasmas based on the sequenced portions of the 16S rRNA gene reported in this study and the sequences from the GenBank database.

This study is the first report of the isolation and characterization of *Mycoplasma* spp. from boids and viperidae snakes. In a study (SCHMIDT et al., 2013) with 80 snakes from Families Boidae and Pythonidae, *Mycoplasma* spp. was detected in two pythons, one with and the other without respiratory clinical signs; although, both presented pneumonia at necropsy. MARSCHANG et al., (2016) detected *Mycoplasma* spp. in one carpet python (*Morelia spilota*), which presented mild purulent to purulent–necrotic stomatitis on postmortem examination. This animal was in good body condition and was negative for adenoviruses, snake arenaviruses, python nidoviruses, ferlaviruses, reoviruses and herpesviruses in the laboratory tests. Only symptomatic animals were tested for *Mycoplasma* spp. in MARSHANG et al., (2016) study, preventing a direct comparison with our study, which was possible to detect the agent in 53.84% (14/26) of the snakes without clinical signs.

Among 26 snakes four presented anorexia, three presented retention of skin shedding, and two animals presented stomatitis. Anorexia, stomatitis, and retention of skin shedding may be related to diverse causes such microorganism infections, traumas, inadequate nutrition, inappropriate environmental temperature, or humidity (FUNK, 2006; MEHLER, 2006). Stomatitis was also reported in previous relates of *Mycoplasma* spp. infection (MARSHANG et al., 2016; SCHMIDT et al., 2013; PENNER et al., 1997), which may indicate this as a clinical sign of *Mycoplasma* infection.

However, the high positivity rate for *Mycoplasma* spp. by PCR in asymptomatic snakes leads us to question if *Mycoplasma* spp. reported was the causative agent of the disease or an opportunist that multiplies in cases of association with other agents and/or immunosuppression. Various possible causes for respiratory signs and stomatitis have already been described, as inappropriate management, which may lead to stress and trauma (CZIRJÁK et al., 2015), bacteria (SCHMIDT et al., 2013), virus including herpesviruses (LOVSTAD et al., 2019), nidoviruses (STENGLLEIN et al., 2014), and paramyxoviruses (STARCK et al., 2017). None of these agents were tested in this study; therefore, the possibility of co-infection or infections caused by other agents in the animals presenting

clinical signs cannot be ruled out. Nonetheless, the presence of *Mycoplasma* spp. confirmed by PCR in the animals analyzed in this study is an interesting finding, since there is little information about infection by this agent in snakes.

The six sequences obtained presented similarity with mycoplasma described in chelonians of the order Testudines (BROWN et al., 1995; LECIS et al., 2011). This supports studies by PENNER et al., (1998) and MARSCHANG et al., (2016) which described the presence of *Mycoplasma* spp. in snakes similar to that reported in chelonians. Different from what was found in this study, SCHMIDT et al., (2013) reported mycoplasma in two pythons with sequences with 95% similarity with corresponding sequences from *M. caviae* and *M. fermentans* (access number FR869692.1), which are associated with infections in rodents and humans, respectively.

CONCLUSION

In conclusion, it was possible to detect *Mycoplasma* spp. in snakes with and without clinical signs in captivity at Rio de Janeiro Zoo. There was no relationship between the presence of *Mycoplasma* spp. and clinical signs. The mycoplasmas reported were 100% homologous with a *Mycoplasma* sp. sequence described in a python with stomatitis and genetically similar to *M. agassizii* and *M. testudineum*, pathogenic species found in chelonians. Considering this, more studies on the prevalence and agent-host relation regarding mycoplasmas in order Squamata are necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Finance Code 001 and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj)

BIOETHICS AND BIOSSECURITY COMMITTEE APPROVAL

This project was submitted and approved under number 1017 by the Ethics Committee on Use Animal Use (CEUA) from the Fluminense Federal University, and by the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO-ICMBio) under no. 59538-1

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

REFERENCES

- BROWN, D. R. *et al.* Taxonomic analysis of the Tortoise Mycoplasmas *Mycoplasma agassizii* and *Mycoplasma testudinis* by 16S rRNA Gene Sequence Comparison. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [*S. l.*], v. 45, n. 2, p. 348–350, 1995. Available from: <<http://doi.org/10.1099/00207713-45-2-348>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1099/00207713-45-2-348.
- BROWN, D. R. *et al.* *Mycoplasma alligatoris* sp. nov., from American alligators. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [*S. l.*], v. 51, n. 2, p. 419–424, 2001. Available from: <<http://doi.org/10.1099/00207713-51-2-419>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1099/00207713-51-2-419.
- BROWN, D. R. *et al.* *Mycoplasma testudineum* sp. nov., from a desert tortoise (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [*S. l.*], v. 54, n. 5, p. 1527–1529, 2004. Available from: <<http://doi.org/10.1099/ijs.0.63072-0>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1099/ijs.0.63072-0.
- BROWN, D. R. *et al.* *Mycoplasma iguanae* sp. nov., from a green iguana (*Iguana iguana*) with vertebral disease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [*S. l.*], v. 56, n. 4, p. 761–764, 2006. Available from: <<http://doi.org/10.1099/ijs.0.63852-0>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1099/ijs.0.63852-0

BROWN, D. R. *et al.* Mycoplasmosis in green iguanas (*Iguana iguana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 348–351, 2007. Available from: <[http://doi.org/10.1638/1042-7260\(2007\)038\[0348:MIGIII\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1638/1042-7260(2007)038[0348:MIGIII]2.0.CO;2)>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1638/1042-7260(2007)038[0348:MIGIII]2.0.CO;2.

BROWN, M. B. *et al.* *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 62, n. 10, p. 4580–4586, 1994.

CZIRJÁK, G. Á. *et al.* Hemorrhagic stomatitis in a natural hybrid of *Vipera ammodytes* × *Vipera berus* due to inappropriate substrate in terrarium. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S. l.], v. 77, n. 6, p. 701–703, 2015. Available from: <<http://doi.org/10.1292/jvms.14-0305>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1292/jvms.14-0305.

DIENES, L. Morphology and nature of the pleuropneumonia group of organisms. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 441–458, 1945.

DRIGGERS, T. Respiratory Diseases, Diagnostics, and Therapy in Snakes. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 519–530, 2000. Available from: <[http://doi.org/10.1016/S1094-9194\(17\)30086-5](http://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30086-5)>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1016/S1094-9194(17)30086-5.

FUNK, R. S. Snakes. *In: Reptile Medicine and Surgery*. [S. l.]: Elsevier, 2006. p. 675–682. *E-book*. Available from: <<http://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50042-0>>. Acesso em: 3 jun. 2020. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1016/B0-72-169327-X/50042-0.

JACOBSON, E. R. *et al.* Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises: A review and update. **The Veterinary Journal**, [S. l.], v. 201, n. 3, p. 257–264, 2014. Available from: <<http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.039>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.05.039.

JACOBSON, E. R.; BERRY, K. H. *Mycoplasma testudineum* in free-ranging Desert

Tortoises, *Gopherus agassizii*. **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 1063–1068, 2012. Available from: <<http://doi.org/10.7589/2011-09-256>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.7589/2011-09-256.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980. Available from: <<http://doi.org/10.1007/BF01731581>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1007/BF01731581.

KIRCHHOFF, H. *et al.* *Mycoplasma crocodyli* sp. nov., a new species from crocodiles. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 742–746, 1997. Available from: <<http://doi.org/10.1099/00207713-47-3-742>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1099/00207713-47-3-74.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. Available from: <<http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1093/molbev/msy096.

LECIS, R. *et al.* Detection and characterization of *Mycoplasma* spp. and *Salmonella* spp. in free-living European Tortoises (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, and *Testudo marginata*). **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 717–724, 2011. Available from: <<http://doi.org/10.7589/0090-3558-47.3.717>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.7589/0090-3558-47.3.71.

LOVSTAD, J. N. *et al.* Novel herpesvirus associated with oropharyngeal squamous cell carcinoma in smooth green snakes (*Opheodrys vernalis*). **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 56, n. 4, p. 630–635, 2019. Available from: <<http://doi.org/10.1177/0300985819837722>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1177/0300985819837722.

MARSCHANG, R. E. *et al.* Detection of a *Mycoplasma* sp. in a Python (*Morelia spilota*) with

Stomatitis. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 26, n. 3–4, p. 90, 2016. Available from: <<http://doi.org/10.5818/1529-9651-26.3-4.90>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.5818/1529-9651-26.3-4.9.

MEHLER, S. J.; BENNETT, R. A. Upper alimentary Tract Disease. *In: Reptile Medicine and Surgery*. [S. l.]: Elsevier, 2006. p. 924–930. *E-book*. Available from: <<http://doi.org/10.1016/B0-72-169327-X/50076-6>>. Accessed: June 3, 2020. doi: 10.1016/B0-72-169327-X/50076-6.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. de A. Micoplasmoses. *In: FABIO, J.; ROSSINI, L. (org.). Doenças das Aves*. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009.

OSSIBOFF, R. J. *et al.* A *Mycoplasma* species of Emydidae Turtles in the Northeastern USA. **Journal of Wildlife Diseases**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 466–470, 2015. Available from: <<http://doi.org/10.7589/2014-04-086>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.7589/2014-04-086.

PENNER, J. D. *et al.* A novel *Mycoplasma* sp. associated with proliferative tracheitis and pneumonia in a burmese python (*Python molurus bivittatus*). **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 117, n. 3, p. 283–288, 1997. Available from: <[http://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80024-2](http://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80024-2)>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1016/S0021-9975(97)80024-2.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Purification of nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. **Cold Spring Harbor Protocols**, [S. l.], v. 2006, n. 1, p. pdb.prot4455, 2006. Available from: <<http://doi.org/10.1101/pdb.prot4455>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1101/pdb.prot4455.

SCHMIDT, V. *et al.* Detection of pathogens in Boidae and Pythonidae with and without respiratory disease. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 172, n. 9, p. 236–236, 2013. Available from: <<http://doi.org/10.1136/vr.100972>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1136/vr.100972.

SCHUMACHER, J. Selected Infectious Diseases of Wild Reptiles and Amphibians. **Journal**

of **Exotic Pet Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 18–24, 2006. Available from: <<http://doi.org/10.1053/j.jepm.2005.11.004>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1053/j.jepm.2005.11.00.

SEIMON, T. A. *et al.* Disease screening in southern river terrapins (*Batagur affinis edwardmollii*) IN CAMBODIA. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 1242–1246, 2017. Available from: <<http://doi.org/10.1638/1042-7260-48.4.1242>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1638/1042-7260-48.4.124.

STARCK, J. M. *et al.* Morphology and morphometry of the lung in corn snakes (*Pantherophis guttatus*) Infected with Three Different Strains of Ferlavirus. **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 156, n. 4, p. 419–435, 2017. Available from: <<http://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.02.001>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1016/j.jcpa.2017.02.001.

STENGLEIN, M. D. *et al.* Ball Python nidovirus: a candidate etiologic agent for severe respiratory disease in *Python regius*. **mBio**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. e01484-14, 2014. Available from: <<http://doi.org/10.1128/mBio.01484-14>>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1128/mBio.01484-14.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 79–85, 2002. Available from: <[http://doi.org/10.1290/1071-2690\(2002\)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2](http://doi.org/10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2)>. Accessed: June 15, 2020. doi: 10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2.

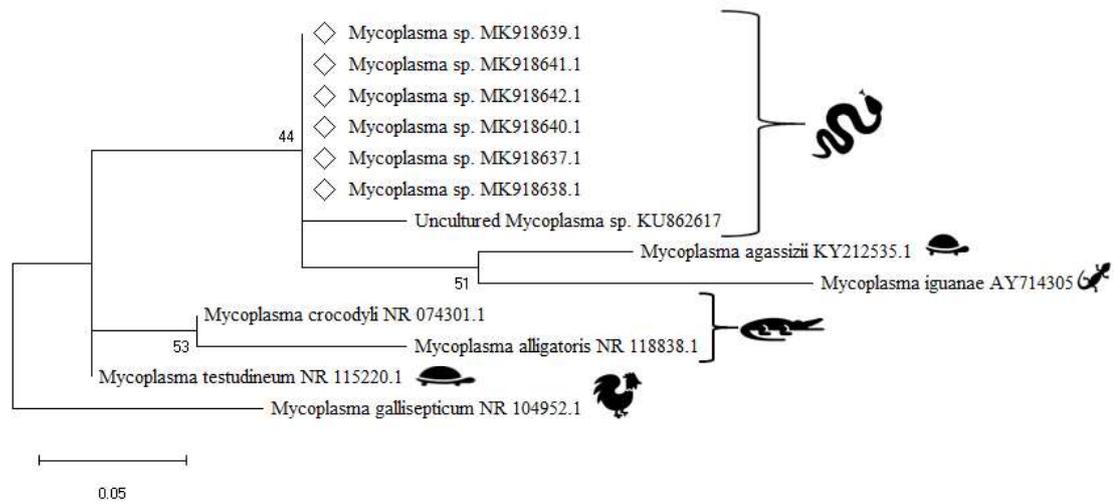


Figure 1 Phylogenetic tree inferred by using the Maximum Likelihood method in MEGA X of six 16S rRNA sequences of *Mycoplasma* sp. obtained from captive snakes from the Rio de Janeiro Zoo, RJ, Brazil (◇), compared to others *Mycoplasma* sequences from reptiles deposited in GenBank database.

Table 1 - Primers, expected amplicon size for detection of *Mycoplasma* spp.

Primer	Nucleotide sequence	Amplicon	Reference
MspF1	CGCCTGAGTAGTACGTTCGC		
MspF2	CGCCTGAGTAGTACGTACGC		
MspF3	TGCCTGAGTAGTACATTCGC		
MspF4	TGCCTGGGTAGTACATTCGC	500pb	Uphoff & Drexler, 2002
MspF5	CGCCTGGGTAGTACATTCGC		
MspF6	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC		
MspR1	GCGGTGTGTACAAGACCCGA		
MspR2	GCGGTGTGTACAAAACCCGA		

Table 2 - Snakes tested for *Mycoplasma* spp. grouped by family, species and identification number of each the animal, results for clinical signs and presence/absence of *Mycoplasma* by isolation and PCR, and accession number of the sequences deposited in GenBank database.

Family	Species	Identification of the animal	Results for <i>Mycoplasma</i>		Genbank ID	
			Isolation	PCR		
Pythonidae	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S1	-	+	MK918638	
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S2	-	+	MK918637	
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S3	-	+	MK918639	
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S4	-	+		
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S5	-	+		
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S6	-	+	MK918641	
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S7	-	+	MK918640	
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S8	-	+		
	Burmese python (<i>Python bivittatus</i>)	S9	+	+		
	Ball python (<i>Python regius</i>)	S13	+	+		
	Ball python (<i>Python regius</i>)	S15	-	-		
	Ball python (<i>Python regius</i>)	S17	-	+		
	Ball python (<i>Python regius</i>)	S16	-	+		
	Boidae	Boa constrictor snake (<i>Boa constrictor</i>)	S11	+	+	
		Boa constrictor snake (<i>Boa constrictor</i>)	S12	+	+	
Boa constrictor snake (<i>Boa constrictor</i>)		S18	-	+	MK918642	
Boa constrictor snake (<i>Boa constrictor</i>)		S10	-	+		
Amazon tree boa (<i>Corallus hortulanus</i>)		S24	-	-		
Rainbow boa (<i>Epicrates choenchria</i>)		S25	-	-		
Green Anaconda (<i>Eunectes murinus</i>)		S19	-	-		
Viperidae		Common lancehead (<i>Bothrops atrox</i>)	S14	+	+	
	Neuwied's lancehead (<i>Bothropoides neuwiedi</i>)	S22	-	-		

	South American rattlesnake (<i>Crotalus durissus</i>)	S20	-	-
	South American rattlesnake (<i>Crotalus durissus</i>)	S21	-	-
	South American rattlesnake (<i>Crotalus durissus</i>)	S23	-	-
Colubridae	Western rat snake (<i>Pantherophis obsoletus</i>)	S26	-	-
<hr/>				
	Total	26	5	17

7 CAPÍTULO IV: Estudo Epidemiológico Transversal sobre a Infecção por *Chlamydia* spp. em Aves e Serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

O capítulo I refere-se ao artigo intitulado “*Estudo Epidemiológico Transversal sobre a Infecção por Chlamydia spp. em Aves e Serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*”, a ser submetido ao periódico *European Journal of Wildlife Research* (Qualis – 2019: A3; Fator de Impacto JCR – 2019: 1.381).

Estudo Epidemiológico Transversal sobre a Infecção por *Chlamydia* spp. em Aves e Serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Bárbara Souza Neil Magalhães¹, Virginia Léo de Almeida Pereira², Thomas Salles Dias², Leandro dos Santos Machado², Bruna Emely Pereira Barbosa², Fernando Troccoli³, Rodrigo Cerqueira da Costa³, Nathalie Costa da Cunha^{1, 2}, Elmiro Rosendo Nascimento², Flavya Mendes de Almeida¹, Nádia Regina Pereira Almosny¹

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF)

² Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF)

³ Departamento de Veterinária, Zoológico do Rio de Janeiro (Riozoo)

RESUMO

As clamídias são bactérias intracelulares obrigatórias dependendo de uma célula hospedeira eucariótica para sua replicação. *Chlamydia psittaci* e *C. pneumoniae* podem causar doença em aves e répteis. Os sinais clínicos são variáveis de acordo com a cepa infectante e susceptibilidade do hospedeiro. Animais cronicamente infectados podem não demonstrar sinais clínicos até uma situação de estresse. As clamídias são excretadas de forma intermitente servindo como fonte de infecção para outros animais e dificultando o diagnóstico de animais infectados. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo epidemiológico transversal sobre a infecção por *Chlamydia* spp. em aves e serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro (Riozoo). Foram coletados suabes de traquéia de sete serpentes, pertencentes a família Pythonidae e de 68 aves pertencentes às Ordens Psittaciformes (n=48), Galliformes (n=6), Accipitriformes (n=5), Piciformes (n=3), Strigiformes (n=4), Falconiformes (n=1) e Cariamiformes (n=1), além de 48 indivíduos da espécie *Cairina moschata* (pato-crioulo) de vida livre do Riozoo, independente de sexo ou idade e testados por PCR para detecção de *Chlamydia* spp. Dos 123 animais testados nenhum foi positivo. Esta negatividade pode ter ocorrido em função da intermitência na excreção do agente, pela ausência de estresse nas aves, ou por ausência de infecção nos animais. Um estudo mais aprofundado sobre a presença de *Chlamydia* spp. nestes animais são necessários para confirmação da ausência de *Chlamydia* spp no plantel de aves e serpentes do Riozoo.

INTRODUÇÃO

As clamídias são bactérias intracelulares obrigatórias dependendo de uma célula hospedeira eucariótica para sua replicação. O gênero *Chlamydia* é composto por 11 espécies que são patógenos reconhecidos de humanos e animais. Algumas espécies são hospedeiras específicas, enquanto outras, como *C. psittaci* e *C. pneumoniae*, possuem caráter zoonótico (TAYLOR-BROWN, 2015).

As aves são hospedeiros naturais da *Chlamydia psittaci*, que também pode infectar répteis e mamíferos, inclusive o homem (HUCHZERMEYER et al., 1994; EGGEMANN et al., 2000; VANROMPAY et al., 2004; LAROUCAU et al., 2008). Os sinais clínicos nas aves variam de acordo com a cepa infectante e com a condição do hospedeiro. Infecções generalizadas podem resultar em febre, anorexia, letargia, diarreia e ocasionalmente choque e morte. Podem ocorrer alterações como pericardite, aerossaculite, pneumonia, peritonite e hepatite. As aves podem se tornar cronicamente infectadas sem apresentar sinais clínicos até uma situação de estresse. Neste caso, podem liberar clamídias de forma intermitente servindo como fonte de infecção para outros animais (HARKINEZHAD, GEENS & VANROMPAY, 2009).

Chlamydia pneumoniae é a principal clamídia a causar doenças em répteis (BODETTI et al., 2002; MITCHELL, 2011; FRUTOS et al., 2014) e essa espécie possui uma ampla gama de hospedeiros. Relatos da infecção em humanos e animais de sangue quente já foram feitos ao redor do mundo (KUTLIN et al., 2007; RATTEI et al., 2007). Espécies de répteis como camaleões (*Chameleo dilepis*), tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*), crocodilos-do-Nilo (*Crocodylus niloticus*), iguana-verde (*Iguana iguana*) e pítons-indianas (*Python molurus*) já foram descritas albergando este microrganismo e em algumas situações, com sinais clínicos. As lesões são variadas de acordo com a espécie e podem incluir granulomas histiocíticos, inflamação granulomatosa, enterite necrosante, miocardite necrosante e pneumonia proliferativa (FRUTOS et al., 2014). Existem poucos relatos a respeito da infecção por *C. psittaci* em répteis, sendo descritos os seguintes sinais clínicos: hepatite, conjuntivite, pneumonia e granulomas inflamatórios (EBANI, 2017).

Por se tratar de agentes zoonóticos, devem ser implementadas medidas de prevenção, controle e monitoramento em estabelecimentos como criatórios e zoológicos para diminuir prejuízos econômicos e o impacto deste agente na saúde coletiva (RASO, 2009). O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo epidemiológico transversal sobre a infecção por *Chlamydia* spp. em aves e serpentes do Zoológico do Rio de Janeiro (Riozoo).

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado sob nº 1017 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO-ICMBio) sob número 59538-1. Além disso, o projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), nº A4E34FC.

Foram coletados, independente de sexo ou idade, suabes de traquéia de sete serpentes, pertencentes a família Pythonidae e de 68 aves pertencentes às Ordens Psittaciformes (n=48), Galliformes (n=6), Accipitriformes (n=5), Piciformes (n=3), Strigiformes (n=4), Falconiformes (n=1) e Cariamiformes (n=1) do plantel do Riozoo, todas identificadas por microchip ou por anilha. Foram também coletados suabes de 48 patos-crioulos (*Cairina moschata*) de vida livre nas dependências do Riozoo identificados com anilhas numeradas no momento da coleta (Quadro 1). Todos os suabes foram acondicionados em meio PBS sob refrigeração até o momento do processamento.

A extração do DNA foi realizada com a utilização do kit Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizados os seguintes primers forward e reverse, respectivamente: CpsiA, 5'-ATGAAACATCCAGTCTACTGG-3' e CpsiB, 5'-TTGTGTAGTAATATTATCAAA-3', que amplificam produtos de aproximadamente 300pb, desenhados a partir da região conservada do gene pmp do sorotipo 1 da *C. abortus* (LAUROCAU et al., 2001). A reação adaptada de SAREYYUOGLU et al. (2007) conteve: água ultrapura (Milli-Q), 1X Tampão PCR, 3mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP mix, 2µM de cada "primer", 1U de Taq Polimerase e 10µL do respectivo DNA extraído. A realização da PCR foi feita em termociclador sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 30 ciclos sendo 50°C por 30 segundos, 65°C por 2 minutos e 65°C por 10 minutos. Os produtos gerados pela PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% submerso em TampãoTris-Borato-EDTA (TBE), e então submetidos à corrida eletroforética de 94 Volts durante 40 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em brometo de etídio para visualização sob luz ultravioleta em transiluminador.

As amostras positivas nessa primeira reação seriam submetidas a outra PCR com os primers CTU (5'-ATGAAAAA ACTCTTGAAATCGG-3') e CTL (5'-CAAGATTTTCTAGA (T/C)TTCAT(A/T)TTGTT-3'), que amplificam 1050pb, para diferenciação da *C. psittaci* em relação à *C. abortus*, segundo Denamur et al. (1991) com modificações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais analisados foram negativos para *Chlamydia spp.* à PCR. Este agente pode ser excretado de forma intermitente pelas fezes, logo a detecção do DNA bacteriano pode ter sido influenciada pelo tempo de pós-exposição e, portanto, indivíduos considerados negativos também podem albergar a bactéria, sem que tenha havido a excreção no momento da coleta (HARKINEZHAD et al., 2009; MINA et al., 2019). A não detecção de *Chlamydia spp.* neste trabalho também pode ser explicada pelas boas condições de higiene e ausência de fatores de estresse aos animais, pois altos níveis de excreção do microrganismo são relatados em casos de má higiene, aglomeração de aves, estresse e má nutrição (TOLBA et al., 2019).

Tolba et al. (2019) em seu trabalho no Egito, detectaram o DNA de *C. psittaci* em 63 (52,5%) das 120 amostras coletadas de psitacídeos cativos e relataram que a idade da ave, local de criação e condições de alojamento e estação do ano na época de amostragem são fatores de risco significativos para a infecção por *C. psittaci* em psitacídeos. Segundo estes autores, aves com menos de um ano de idade e amostradas no inverno são mais propensas a infecção por *C. psittaci*. Ressaltamos aqui, que os indivíduos do Riozoo são animais de idade mais avançada, mantidos na instituição muitas vezes por mais de 10 anos, o que justificaria os achados negativos, além de já estarem bem adaptados ao local, o que reduz o estresse. Apesar da presente pesquisa ter sido realizada nos meses de outono e inverno, todos os animais foram negativos, talvez porque as coletas foram feitas durante os exames de rotina, que como são periódicos, também não estressaram demais os animais. Diferente de Tolba et al. (2019), Kabeya et al. (2015) em um estudo conduzido com amostras coletadas entre 2005 e 2010, em cinco zoológicos do Japão, detectou um percentual de 7,2% de aves positivas para *C. psittaci* com maior prevalência obtida durante os meses de primavera. Já a maior positividade para *C. pneumoniae* se deu em répteis e nos meses de verão. Kabeya et al. (2015) ainda afirmaram que a maioria das amostras positivas para DNA de *Chlamydia* obtida em seu estudo foi em animais em quarentena, antes de serem incorporados ao plantel do zoológico, no verão e que muitos fatores, incluindo o estado de contaminação por *Chlamydia* e condições de higiene nas instalações de origem dos animais, podem ter contribuído para a alta prevalência. Em nosso estudo todas as aves e répteis eram criados em boas condições de higiene e manejo.

O presente estudo foi feito de forma transversal, o que também pode ter contribuído para resultados negativos, já que a excreção de *Chlamydia spp.* ocorre de forma intermitente pelas fezes (HARKINEZHAD et al., 2009). Um estudo transversal realizado com exemplares de *Ara ararauna*, em um Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS), no Rio de Janeiro,

obteve 50% das aves positivas para *Chlamydia* spp. (VASCONCELOS et al., 2016). Considerando que em CETAS as aves são oriundas de situações de tráfico ou resgate, que configuram situações de estresse e aglomeração, a positividade para *Chlamydia* spp. pode ser explicada pelo aumento na excreção, propiciando uma maior disseminação para outras aves. Já os animais do Riozoo, incluídos no presente estudo, ficavam alojados por muitos anos em recintos de quatro a seis indivíduos, sem que houvesse superpopulação. A limpeza e higienização eram feitas por setores, cujos utensílios e materiais não eram utilizados em outros setores visando reduzir a chance de disseminação de agentes de doença.

Os patos-crioulos de vida livre também foram negativos para *Chlamydia* spp. neste estudo, embora Donati et al. (2015) ao analisarem suabes de cloaca de aves de vida livre de uma região urbana da Itália, encontraram 43,42% de animais positivos para *C. psittaci* e Wang et al. (2018) obtiveram soropositividade de 20,4% em pombos no norte da China, ambos com uma alta de prevalência deste agente em animais de vida livre.

O presente trabalho concorda com os achados de Rostami et al. (2017), que não detectaram a presença de DNA de *Chlamydia* spp. em répteis de zoológicos por PCR em Tempo Real. Existem relatos da infecção em répteis em todo o mundo, mas ainda não são suficientes para a compreensão do papel desses animais como reservatórios do microrganismo ou apenas como hospedeiros acidentais (DI IANNI et al., 2015; KABEYA et al., 2015; ROSTAMI et al., 2017).

O estudo de *Chlamydia* spp. em animais de zoológicos é de extrema importância, pelo caráter zoonótico do agente e contato regular dos animais com humanos, tanto nos seus cuidados diários por tratadores como pelo público nas visitas.

CONCLUSÃO

Não foi observada por PCR a infecção por *Chlamydia* spp. na população de aves e serpentes do Riozoo. Esta negatividade pode ter ocorrido em função da intermitência na excreção do agente, pela ausência de estresse nas aves, ou por ausência de infecção nos animais. Um estudo mais aprofundado sobre a presença de *Chlamydia* spp. nestes animais são necessários para confirmação da ausência de *Chlamydia* spp no plantel de aves e serpentes do Riozoo.

REFERÊNCIAS

- BODETTI, T. J.; JACOBSON, E.; WAN, C.; HAFNER, L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, K.; TIMMS, P. Molecular Evidence to Support the Expansion of the Hostrange of *Chlamydophila pneumoniae* to Include Reptiles as Well as Humans, Horses, Koalas and Amphibians. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 146–152, 1 jan. 2002.
- DENAMUR, E.; SAYADA, C.; SOURIAU, A.; ORFILA, J.; RODOLAKIS, A.; ELION, J. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *Journal of General Microbiology*, v. 137, n. 11, p. 2525–2530, nov. 1991.
- DI IANNI, F.; DODI, P. L.; CABASSI, C. S.; PELIZZONE, I.; SALA, A.; CAVIRANI, S.; PARMIGIANI, E.; QUINTAVALLA, F.; TADDEI, S. Conjunctival flora of clinically normal and diseased turtles and tortoises. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 91, 10 abr. 2015.
- DONATI, M.; LAROUCAU, K.; DELOGU, M.; VORIMORE, F.; AAZIZ, R.; CREMONINI, E.; BIONDI, R.; COTTI, C.; BALDELLI, R.; DI FRANCESCO, A. *Chlamydia psittaci* in Eurasian Collared Doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 51, n. 1, p. 214–217, jan. 2015.
- EBANI, V. V. Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: A mini review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 10, n. 8, p. 723–728, 1 ago. 2017.
- EGGEMANN, G.; WENDT, M.; HOELZLE, L. E.; JÄGER, C.; WEISS, R.; FAILING, K. Prevalence of *Chlamydia* infections in breeding sows and their importance in reproductive failure. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, v. 107, n. 1, p. 3–10, jan. 2000.
- FRUTOS, M. C.; MONETTI, M. S.; RÉ, V. E.; CUFFINI, C. G. Molecular evidence of *Chlamydophila pneumoniae* infection in reptiles in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 46, n. 1, p. 45–48, 1 jan. 2014.
- HARKINEZHAD, Taher; GEENS, Tom; VANROMPAY, Daisy. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. *Veterinary Microbiology* v. 135, n. 1–2, p. 68–77, mar. 2009.
- HUCHZERMEYER, F. W.; GERDES, G. H.; FOGGIN, C. M.; HUCHZERMEYER, K. D.; LIMPER, L. C. Hepatitis in farmed hatchling Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) due to chlamydial infection. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 65, n. 1, p. 20–22, mar. 1994.
- KABEYA, H; SATO, S; MARUYAMA, S. Prevalence and characterization of *Chlamydia* DNA in zoo animals in Japan. *Microbiology and Immunology* v. 59, n. 9, p. 507–515, 2015.
- KUTLIN, A.; ROBLIN, P.M.; KUMAR, S.; KOHLHOFF, S.; BODETTI, T.; TIMMS, P. and HAMMERSCHLAG, M. R. Molecular characterization of *Chlamydophila pneumoniae* isolates from Western barred bandicoots. *Journal of Medical Microbiology* 56(3): pp. 407-417. 2007

- LAROUCAU, K.; SOURIAU, A.; RODOLAKIS, A. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydothyla* using *pmp* genes. *Veterinary Microbiology*, v. 82, n. 2, p. 155–164, 20 set. 2001.
- LAROUCAU, K.; THIERRY, S.; VORIMORE, F.; BLANCO, K.; KALETA, E.; HOOP, R.; MAGNINO, S.; VANROMPAY, D.; SACHSE, K.; MYERS, G.S.; BAVOIL, P.M.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. High resolution typing of *Chlamydothyla psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v.8, p.171–181, 2008
- MINA, A.; FATEMEH, A.; JAMSHID, R. Detection of *Chlamydia psittaci* Genotypes Among Birds in Northeast Iran. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 33, n. 1, p. 22–28, mar. 2019.
- MITCHELL, M. A. Zoonotic Diseases Associated with Reptiles and Amphibians: An Update. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, v. 14, n. 3, p. 439–456, 1 set. 2011.
- ROSTAMI, A.; SHAHABI, M.M.A.; MADANI, S. A. A Molecular Survey on Chlamydial Infection in Pet and Zoo Captive Reptiles in Tehran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, v. 11, n. 3, p. 227–233, 1 ago. 2017.
- RASO, T.F. Clamidiose in: Doença das aves. Campinas, FACTA, 2009. 1104 p.
- RATTEI, T.; OTT, S.; GUTACKER, M.; RUPP, J.; MAASS, M.; SCHREIBER, S.; SOLBACH, W.; WIRTH, T.; GIEFFERS, J. Genetic diversity of the obligate intracellular bacterium *Chlamydothyla pneumoniae* by genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms: evidence for highly clonal population structure. *BMC Genomics*, v. 8, n. 1, p. 355, 4 out. 2007.
- SAREYYUPOGLU, B.; CANTEKIN, Z.; BAS, B. *Chlamydothyla psittaci* DNA Detection in the Faeces of Cage Birds (2007). *Zoonoses Public Health*. 54: 237–242
- TAYLOR-BROWN, A.; VAUGHAN, L.; GREUB, G.; TIMMS, P.; POLKINGHORNE, A. Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. *Pathogens and Disease*, v. 73, n. 1, p. 1–15, 1 fev. 2015.
- TOLBA, H. M. N.; ELEZ, R. M. M. Abou; ELISOHABY, I. Risk factors associated with *Chlamydia psittaci* infections in psittacine birds and bird handlers. *Journal of Applied Microbiology* v. 126, n. 2, p. 402–410, 2019.
- VANROMPAY, D.; GEENS, T.; DESPLANQUES, A.; HOANG, T. Q. T.; VOS, L. D.; LOOCK, M. V.; HUYCK, E.; MIRR, C.; COX, E. Immunoblotting, ELISA and culture evidence for Chlamydiaceae in sows on 258 Belgian farms. *Veterinary Microbiology*, v. 99, n. 1, p. 59–66, 26 mar. 2004.
- VASCONCELOS, T. B.; NOGUEIRA, D. M.; PEREIRA, V. L. DE A.; NASCIMENTO, E. R. DO; BRUNO, S. F. *Chlamydia psittaci* em araras-canindé (*Ara ararauna*) cativas em um Centro de Triagem de Animais Silvestres no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 23, n. 1–2, 26 set. 2016.

WANG, X.; ZHANG, N.-Z.; MA, C.-F.; ZHANG, X.-X.; ZHAO, Q.; NI, H.-B. Epidemiological Investigation and Genotype of *Chlamydia* Exposure in Pigeons in Three Provinces in Northern China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 18, n. 3, p. 181–184, mar. 2018.

Quadro 1 – Ordem, espécie, nome popular e número de animais coletados.

Ordem	Espécies	Nome popular	Número	Total
Psittaciformes	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio verdadeiro	11	48
	<i>Amazona ocrocephala</i>	Papagaio-campeiro	01	
	<i>Amazona vinacea</i>	Papagaio-caboclo	03	
	<i>Ara ararauna</i>	Arara-canindé	11	
	<i>Ara macao</i>	Arara-canga	03	
	<i>Ara chloropterus</i>	Arara-vermelha	03	
	<i>Anodorhynchus leari</i>	Arara-azul-de-lear	04	
	<i>Guaruba guarouba</i>	Ararajuba	09	
	<i>Pionus maximilliani</i>	Maitaca-verde	03	
Accipitriformes	<i>Heterospizias meridionalis</i>	Gavião-de-casaca-de-couro	01	05
	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	04	
Falconiformes	<i>Milvago chimachima</i>	Gavião-carrapateiro	01	01
Galliformes	<i>Pavo muticus</i>	Pavão-verde	02	06
	<i>Crax alector</i>	Mutum-poranga	02	
	<i>Crax fasciolata</i>	Mutum-pinima	01	
	<i>Pavo cristatus</i>	Pavão-azul	01	
Piciformes	<i>Ramphastos toco</i>	Tucano-toco	03	03
Strigiformes	<i>Stryx huhula</i>	Coruja-preta	01	04
	<i>Pseudoscops clamator</i>	Coruja-orelhuda	03	
Cariamiformes	<i>Cariama cristata</i>	Seriema	01	01
Anseriformes	<i>Cairina moschata</i>	Pato-crioulo	48	48
Squamata	<i>Python molurus bivittatus</i>	Piton-birmanesa	07	07
TOTAL			123	123

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PCR foi mais efetiva que a técnica de isolamento na detecção de *Mycoplasma* spp. nas aves do plantel do Riozoo. Foi possível detectar micoplasmas em aves de diferentes Ordens sem sinal clínico respiratório, obtendo-se *M. synoviae* (MS) com maior prevalência do que *M. gallisepticum* (MG). As positivities para *Mycoplasma* spp., MG e MS foram diferentes entre as Ordens estudadas, sendo a maior ocorrência nas aves de rapina, seguida dos Galliformes e dos Piciformes.

Mollicutes, *M. gallisepticum*, *M. synoviae* foram detectados em patos-crioulos (*Cairina moschata*), sugerindo a circulação desses agentes no Zoológico do Rio de Janeiro. Devido à sua capacidade de voo e circulação pelo zoológico, esses animais podem desempenhar um papel importante como reservatórios e disseminadores de micoplasmas patogênicos, representando risco para outras aves. Mais estudos devem ser realizados sobre a disseminação de micoplasmas nestas aves para a análise epidemiológica dessas bactérias e a possível interferência na saúde das aves dentro e fora do Riozoo.

Foi possível detectar *Mycoplasma* spp. por PCR e isolamento em serpentes com e sem sinais clínicos criadas no Riozoo, não havendo relação entre a presença de *Mycoplasma* spp. e os sinais observados. Os micoplasmas encontrados eram homólogos a uma sequência de *Mycoplasma* spp. de espécie descrita em uma píton com estomatite e similares geneticamente com *M. agassizii* e *M. testudineum*, espécies patogênicas encontradas em Testudines. A presença de *Mycoplasma* spp. foi um achado muito importante, visto que existem poucos estudos sobre a presença desse agente em serpentes, sua epidemiologia e patologia.

Diante disso, mais estudos sobre a prevalência e relação agente-hospedeiro são necessários, sobre a disseminação de micoplasmas em animais selvagens em zoológicos para análise epidemiológica dessas bactérias nesses locais.

Não foi observada a ocorrência por *Chlamydia* spp. por PCR na população de aves e serpentes do Riozoo. Esta negatividade pode ter ocorrido em função da intermitência na excreção do agente, pela ausência de estresse nas aves, ou por ausência de infecção nos animais. Um estudo mais aprofundado sobre a presença de *Chlamydia* spp. nestes animais é necessário para confirmação da ausência dele no plantel de aves e serpentes do Riozoo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M.S.; LEONÍDIO, A. R. A.; ANDRADE, M. A. Principais doenças em Anseriformes. *Veterinária em Foco*, v.14, n.1, p. 10-33, 2016.

ANDERSEN, A.A. Comparison of pharyngeal, fecal, and cloacal samples for the isolation of *Chlamydia psittaci* from experimentally infected cockatiels and turkeys. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 8, p. 448-450, 1996.

ANDRE, J.P. la chlamyidiose aviaire à *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux de cage: revue bibliographique. *Ver. Méc. Vét.*, v. 145, p. 915-929, 1994.

AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. *Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: IDSM, 2007.364p.
BACK, A. *Manual de doenças de aves*. Cascavel. p. 47-130, 2004.

BARROS, Y.M. Zoos e aquários têm papel importante na conservação. *O ECO*, 2013. Disponível em: <http://www.oeco.org.br/colunas/colunistas-convidados/27224-zoos-e-aquarios-tem-papel-importante-na-conservacao/>. Acesso em 20 de janeiro de 2017.

BEDSON, S.P., WESTERN, G.T., SIMPSON, S.L. Observations on the aethiology of psittacosis. *Lancet*, v.1, p.235–236, 1930.

BEECKMAN, D.S.A., VANROMPAY, D.C.G. Review: Zoonotic *Chlamydophila psittaci* infections from a clinical perspective. *Clinical Microbiology and Infection*. n. 15, p. 11-17, 2009.

BÉRNILS, R. S. (org.) Sociedade Brasileira de Herpetologia. *Brazilian reptiles – List of species*. 2010. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acesso em 08 nov. 2018.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. State of the world's birds: taking the pulse of the planet. Cambridge, UK: *BirdLife International*, 2018. Disponível em <http://www.birdlife.ch/sites/default/files/documents/State-of-the-Worlds-Birds-2018.pdf> Acesso em 25 nov. 2018.

BODETTI, T.J.; JACOBSON, E.; WAN, C.; HAFNER, L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, K.; TIMMS, P. Molecular Evidence to Support the Expansion of the Hostrange of *Chlamydophila pneumoniae* to Include Reptiles as Well as Humans, Horses, Koalas and Amphibians. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 146–152., 2002.

BRANLEY, J. M.; ROY, B.; DWYER, D. E.; SORRELL, T. C. Real-time PCR detection and quantification of *Chlamydophila psittaci* in human and avian specimens from a veterinary clinic cluster. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*, n. 27, p. 269-273. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários. Aprova as normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *meleagridis*). Instrução normativa de n. 44, de 23 de agosto de 2001. *Diário Oficial da União*. Brasília, 24 ago. 2001, p.68.

BROWN, D.R.; CRENSHAW, B.C.; MCLAUGHLIN, G.S.; SCHUMACHER, I.M.; MCKENNA, C.E.; KLEIN, P.A.; JACOBSON, E.R.; BROWN, M.B. Taxonomic Analysis of the Tortoise Mycoplasmas *Mycoplasma agassizii* and *Mycoplasma testudinis* by 16S rRNA Gene Sequence Comparison. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 45, p. 348–350, 1995.

BROWN, D.R.; DEMCOVITZ, D.L.; PLOURDÉ, D.R.; POTTER, S.M.; HUNT, M.E.; JONES, R.D.; ROTSTEIN, D.S. *Mycoplasma iguanae* sp. nov., from a green iguana (*Iguana iguana*) with vertebral disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 56, p. 761–764, 2006.

BROWN, D.R.; MERRITT, J.L.; JACOBSON, E.R.; KLEIN, P.A.; TULLY, J.G., BROWN, M.B. *Mycoplasma testudineum* sp. nov., from a desert tortoise (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 54, 1527–1529, 2004.

BROWN, M.B.; SCHUMACHER, I.M.; KLEIN, P.A.; HARRIS, K.; CORRELL, T.; JACOBSON, E.R. *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. *Infect. Immun.* v. 62, p. 4580–4586, 1994.

BROWN, D.R.; WENDLAND, L.D.; ROTSTEIN, D.S. Mycoplasmosis in green iguanas (*Iguana iguana*). *J. Zoo Wildl. Med.* v. 38, p. 348–351, 2007.

BUIM, M.R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A.J.P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.7, p. 552-556, 2009.

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

CAMPAGNOLO, E.R.; BANERJEE, M.; PANIGRAHY, B.; JONES, R. L. An outbreak of duck viral enteritis (duck plague) in domestic muscovy ducks (*Cairina moschata domesticus*) in Illinois. *Avian Dis.* v. 45, n. 2, p. 522-528, 2001.

CARNACCINI, S.N.; FERGUSON-NOEL, M.R. CHIN, P.T.; SANTORO, P.; BLACK, M.; BLAND, A.; BICKFORD, A.; SENTÍES-CUÉ, C. G. A Novel *Mycoplasma* sp. Associated with Phallus Disease in Goose Breeders: Pathological and Bacteriological Findings. *Avian Diseases*, v. 60, n. 2, p. 437-443, 2016.

CARVALHO, A.M.; ANDRADE, M.A; LINHARES, G.F.C.; JAIME, V.S. Pesquisa de Mycoplasma em aves da família Psittacidae mantidas em diferentes cativeiros no Brasil Central. *Pesq. Vet. Bras*, v. 37, n. 10, p.1159-1164, 2017.

CATANIA S.; GOBBO F.; RAMIREZ, A.S.; GUADAGNINI, D.; BALDASSO, E.; MORONATO, M. L.; NICHOLAS, R. A. J. Laboratory investigations into the origin of Mycoplasma synoviae isolated from a lesser flamingo (Phoeniconaias minor). *BMC Vet Res.*, v. 12, n. 52, p. 1-7, 2016.

CERDÁ, R.O. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis en Latinoamérica. In: *Congreso Latinoamericano De Avicultura*, 20., 2007, Porto Alegre Anais...Porto Alegre: Centro de Eventos Fingers, 2007. p.111-124.

CFSPH - CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. Chlamydiosis (Avian), Psittacosis, Ornithosis. 2009. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/chlamydiosis_avian.pdf > Acesso em: nov 2018.

COUTO, M.S.R.; KLEIN, C.S.; VOSS-RECH, D.; TERENCEZI, H. Extracellular Proteins of Mycoplasma synoviae. International Scholarly Research Network, ISRN Veterinary Science. V. 2012.

CUBAS, Z.S. Biossegurança na Manipulação de Animais Silvestres - Biossegurança em Zoológicos. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, n. 0, suplemento 1, p.174-177, 2008.

CZIRJÁK, G.Á.; KÖBÖLKUTI, L.B.; TENK, M.; SZAKÁCS, A.; KELEMEN, A.; SPÎNU, M. Hemorrhagic stomatitis in a natural hybrid of Vipera ammodytes × Vipera berus due to inappropriate substrate in terrarium. *J. Vet. Med. Sci.* v. 77, p. 701–703, 2015.

DUARTE, V. V.; SINHORINI, J. A.; ALLEGRETTI, L.; FERREIRA, V. C. A.; IKUNO, A. A.; GUIMARÃES, M. B. Identificação de Mycoplasma spp. em passeriformes mantidos em cativeiro na cidade de Itanhaém – São Paulo. In: X Congresso E Xv Encontro Da Associação Brasileira De Veterinários De Animais Selvagens. 2006, São Pedro. *Anais...* São Pedro. p. 22, 2006.

DENAMUR, E.; SAYADA, C.; SOURIAU, A.; ORFILA, J.; RODOLAKIS, A.; ELION, J. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for a homogeneous invasive group among ruminant isolates of Chlamydia psittaci. *Journal of General Microbiology*, v. 137, n. 11, p. 2525–2530, 1991.

DHONDT, A.A.; DHONDT, K.V.; HAWLEY, D.M.; JENNELLE, C.S. Experimental evidence for transmission of Mycoplasma gallisepticum in house finches by fomites, *Avian Pathology*, v. 36, n. 3, p. 205-208, 2007.

DIENES, L. Morphology and nature of the pleuropneumonia group of organism. *Journal of Bacteriology*, v. 50, p. 441-458, 1945.

DI IANNI, F.; DODI, P. L.; CABASSI, C. S.; PELIZZONE, I.; SALA, A.; CAVIRANI, S.; PARMIGIANI, E.; QUINTAVALLA, F.; TADDEI, S. Conjunctival flora of clinically

normal and diseased turtles and tortoises. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 91, 2015.

DODD, S. Epizootic pneumo-enteritis of the turkey. *Journal Comparative Pathology*, v.18, p.239-245, 1905.

DONATI, M.; LAROUCAU, K.; DELOGU, M.; VORIMORE, F.; AAZIZ, R.; CREMONINI, E.; BIONDI, R.; COTTI, C.; BALDELLI, R.; DI FRANCESCO, A. Chlamydia psittaci in Eurasian Collared Doves (Streptopelia decaocto) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 51, n. 1, p. 214–217, 2015.

DONKIN, R.A. *The Muscovy Duck, Cairina moschata domestica*. Origins, Dispersal, and Associated Aspects of the Geography of Domestication. Rotterdam: A.A. Balkema, 1989.186 p.

DUSANIC, D.; BERCIC, R.L.; CIZELJ, I.; SALMIC, S.; NARAT, M.; BENCINA, D. Mycoplasma synoviae invades non-phagocytic chicken cells in vitro. *Veterinary Microbiology*, n. 138, p. 114-119. 2009.

EBANI, V. V. Domestic reptiles as source of zoonotic bacteria: A mini review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 10, n. 8, p. 723–728, 2017.

EGGEMANN, G.; WENDT, M.; HOELZLE, L. E.; JÄGER, C.; WEISS, R.; FAILING, K. Prevalence of Chlamydia infections in breeding sows and their importance in reproductive failure. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, v. 107, n. 1, p. 3–10, 2000.

EMIKPE, B.O.; MORENIKEJI, O.A.; JARIKRE, T.A. Zoo animals' disease pattern in a university zoological garden, Ibadan, Nigeria. *Asian Pac J Trop Dis*, v. 6, n. 2, p. 85-89, 2016.

EVERETT, K.D., BUSH, R.M., ANDERSEN, A.A. 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 Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* v. 49, n. 2, p. 415–440, 1999.

FOWLER, M. E. An overview of wildlife husbandry and diseases in captivity. *Rev. Scie. Tech (International Office of Epizootics)*, v. 15, n. 2, p. 15-42. 1996.

FISCHER, J.R.; STALLKNECHT, D.E.; LUTTRELL, P.; DHONDT, A.A.; CONVERSE, K.A. 1997. Mycoplasmal conjunctivitis in wild songbirds: the spread of a new contagious disease in a mobile host population. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 3, p.69-72.

FERGUSON-NOEL, N. Introduction: Mycoplasmosis. In: D.E. SWAYNE, J.R.; GLISSON, L.R.; MCDUGALD, L.K.; NOLAN, D.L.; SUAREZ AND V. NAIR, eds *Diseases of Poultry*, 13 ed.. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. 2013, pp. 875-876.
FRUTOS, M.C.; MONETTI, M.S.; RÉ, V.E.; CUFFINI, C.G. Molecular evidence of Chlamydophila pneumoniae infection in reptiles in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 46, n. 1, p. 45–48, 2014.

FRYE, F. L. *Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry*. 2.ed. Malabar: Krieger Publishing Co., 1991. v.1e2, 635p.

GERLACH, H. Chlamydia. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON L.R. *Avian medicine: principles and application*. Florida: Wingers, 1994. Cap. 34, p. 984-996.

GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A. R.; MARQUES, M.V.R.; CARVALHAES, A.G.; MARIN, S.Y.; COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; RESENDE, J.S.; MARTINS, N.R. S. Detection of Mycoplasma gallisepticum in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 12, n. 2, 2010.

GREGO, K.F.; ALBUQUERQUE, L.R.; KOLESNIKOVAS, C.K.M. Squamata (Serpentes) In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.(eds). *Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2014. 2v., 2470p. V. 1, pp.186-218.

HAESSENDONCK, R.; VERLINDEN, M.; DEVOS, G.; MICHIELS, T.; BUTAYE, P.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F.; MARTEL, A. High seroprevalence of respiratory pathogens in hobby poultry. *Avian Diseases*, v. 58, p. 623–627, 2014.

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

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

HOON-HANKS, L. L. et al. Respiratory disease in ball pythons (Python regius) experimentally infected with ball python nidovirus. *Virology*, v. 517, n. 1, p. 77–87, 2018.

HUCHZERMEYER, F.W.; GERDES, G.H.; FOGGIN, C.M.; HUCHZERMEYER, K.D.; LIMPER, L.C. Hepatitis in farmed hatchling Nile crocodiles (Crocodylus niloticus) due to chlamydial infection. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 65, n. 1, p. 20–22, 1994.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. 2016. 76p. Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_ed_2016.pdf Acesso em: 08 nov 2018.

ISLAM, A.; ASLAM, A.; CHAUDHRY, Z.I.; MANSOOR-UD-DIN, A.; HABIB-UR-REHMAN, L.; (PAKISTAN) D. OF P.; SAEED, K.; AHMED, I. Pathology of Mycoplasma gallisepticum in naturally infected broilers and its diagnosis through PCR. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2011.

JACOBSON, E. Diseases of the respiratory system in reptiles. *Vet. Med. Small Anim. Clinic.*, p.1169-75, 1978.

JACOBSON, E.R.; BERRY, K.H. Mycoplasma testudineum in free-ranging desert tortoises, Gopherus agassizii. *J. Wildl. Dis.*v. 48, p. 1063–1068, 2012.

JACOBSON, E.R.; BROWN, M.B.; WENDLAND, L.D.; BROWN, D.R.; KLEIN, P.A.; CHRISTOPHER, M.M.; BERRY, K.H. Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises: a review and update. *Vet. J.*, v. 201, p. 257–264, 2014.

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

KLEVEN, S.H.; FLETCHER, D.J. Laboratory infection of house sparrows (Passer domesticus) with Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae. *Avian Dis.*, v. 27, p. 308-311, 1983.

KLEVEN, S.H.. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Science*, v. 77, p. 1146–1149, 1998.

KLEVEN, S.H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J., FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press, 11 th, 2003. p. 719-721.

KUTLIN, A.; ROBLIN, P.M.; KUMAR, S.; KOHLHOFF, S.; BODETTI, T.; TIMMS, P.; HAMMERSCHLAG, M.R. Molecular characterization of Chlamydophila pneumoniae isolates from Western barred bandicoots. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 3, pp. 407-417, 2007.

LAROUCAU, K.; SOURIAU, A.; RODOLAKIS, A. Improved sensitivity of PCR for Chlamydophila using pmp genes. *Veterinary Microbiology*, v. 82, n. 2, p. 155–164, 001.

LAROUCAU, K. et al. A pmp genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis. *Vet. Microbiol.*, v. 121, p. 150-157, 2007.

LAROUCAU, K. et al. High resolution typing of Chlamydophila psittaci by multilocus VNTR analysis (MLVA). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 8, n. 2, p. 171–181, 2008.

LAUERMAN, L.H.; HOERR, F.J.; SHARPTON, A.R.; SHAH, S.M.; VAN SANTEN, V. L. Development and Application of a Polymerase Chain Reaction Assay for Mycoplasma synoviae. *Avian Diseases*, v. 37, n. 3, p. 829-8, 1993.

LAWSON-FERREIRA, R.; SANTOS, J.P.S.; PARMERA, D.; GUIMARÃES, R.C.; COELHO, J.B.C.; FROTA, S.C.; MATTOSO, J.M.V.; OLIVEIRA, C.C.P.; HOKAMA, D.A.; DE FILIPPIS, I.; NASCIMENTO, E.R.; CARIDE, E.C. Validation of PCR method for Mycoplasma detection in the Yellow Fever-vaccine quality control. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 75, p. 01-13, 2016.

LECIS, R.; CHESSA, B.; CACCIOTTO, C.; ADDIS, M.F.; CORADDUZZA, E.; BERLINGUER, F.; MUZZEDDU, M.; LIERZ, M.; CARCANGIU, L.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Identification and characterization of novel *Mycoplasmas* spp. belonging to the hominis group from griffon vultures. *Res. Vet. Sci.*, v. 89, p. 58-64, 2010.

LECIS, R.; PAGLIETTI, B.; RUBINO, S.; ARE, B.M.; MUZZEDDU, M.; BERLINGUER, F.; CHESSA, B.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Detection and characterization of *Mycoplasma* spp. and *Salmonella* spp. in free-living European tortoises (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, and *Testudo marginata*). *J. Wildl. Dis.* v. 47, p. 717–724, 2011.

LECIS, R.; SECCI, F.; MANDAS, L.; MUZZEDDU, M.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Molecular Identification And Sequence Characterization Of *Mycoplasmas* In Free-Living Birds Of Prey. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 47, n. 3, p. 917–922, 2016.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

LIERZ, M.; HAGEN, N.; LUESCHOW, D.; HAFEZ, H.M. Species-specific polymerase chain reactions for the detection of *Mycoplasma buteonis*, *Mycoplasma falconis*, *Mycoplasma gypis*, and *Mycoplasma corogypsi* in captive birds of prey. *Avian Dis.*, v. 52, p. 94–99, 2008.

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

LORIA, G. R.; FERRANTELLI, E.; GIARDINA, G.; VECCHI, L.L.; SPARACINO, L.; OLIVERI, F.; McAULIFFE, L.; NICHOLAS, R.A.J. Isolation and Characterization of Unusual *Mycoplasma* spp. from Captive Eurasian Griffon (*Gys fulvus*) in Sicily. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 44, n. 1, p. 159-163, 2008.

LOVSTAD, J. N. et al. Novel Herpesvirus Associated With Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Smooth Green Snakes (*Opheodrys vernalis*). *Veterinary Pathology*, p. 030098581983772, 2019.

MARSCHANG, R. E. et al. Detection of a *Mycoplasma* sp. in a Python (*Morelia spilota*) with Stomatitis. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, v. 26, n. 3–4, p. 90–93, 2016.

MICHIELS, T.; WELBY, S.; VANROBAEYS, M.; QUINET, C.; ROUFFAER, L.; LENS, L.; MARTEL, A.; BUTAYE, P. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathology*, v. 45, n. 2, p. 244-252, 2016.

MENDONÇA, G.A.; PÓLO, P.A.; NASCIMENTO, E.R.; LIGNON, G.B. A prova de SAR em galinhas poedeiras infectadas por micoplasmose e salmonelose. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2003. Santos. *Anais...* Santos: FACTA. p. 153-157, 2003.

METTIFOGO, E.; BUIM, M.R. Mycoplasma gallisepticum. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. E ORGANIZADORES. *Patologia Aviária*. Editora Manole LTDA., Barueri-SP, 2009. p.86-100.

MINA, A.; FATEMEH, A.; JAMSHID, R. Detection of Chlamydia psittaci Genotypes Among Birds in Northeast Iran. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, v. 33, n. 1, p. 22–28, 2019.

MITCHELL, M. A. Zoonotic Diseases Associated with Reptiles and Amphibians: An Update. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, v. 14, n. 3, p. 439–456, 2011.
MORANGE, A. De la psittacose, ou infection speciale determinee par des perruches. Thesis/Dissertation, 1895.

MURRAY, M. J. Pneumonia and Normal Respiratory Function. In: MADER, M. R. *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996. p.396-405.
NASCIMENTO, E. R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.217-224.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI Jr, A.; SILVA, E.N.; Di FÁBIO, J. ; SESTI, L.; ZUANAZE M. A.F. *Doenças das aves*. 2.ed. Campinas: FACTA, p. 485- 500, 2009.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; NASCIMENTO, M.G.F.; BARRETO, M.L. Avian Mycoplasmosis Update. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.7, n.1, p. 01 – 09, 2005.

OAKS, J.L.; DONAHOE, S.L.; RURANGIRWA, F.R.; RIDEOUT, B.A.; GILBERT, M.; VIRANI, M.Z. Identification of a novel Mycoplasma species from an oriental white backed vulture (Gyps bengalensis). *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 12, p. 5909- 5912, 2004.

OIE. Office International des Epizooties. Avian Chlamydiosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2009 Disponível em < http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_index.htm> Acesso em: novembro de 2017.

OSSIBOFF, R.J.; RAPHAEL, B.L.; AMMAZZALORSO, A.D.; SEIMON, T.A.; NIEDERRITER, H.; ZARATE, B.; NEWTON, A.L.; MCALOOSE, D.; A Mycoplasma species of Emydidae turtles in the northeastern USA. *J. Wildl. Dis.*, v. 51, p. 466–470, 2015.

PAGE, L.A. Revision of the family Chlamydiaceae Rake (Rickettsiales): unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus Chlamydia, Jones, Rake and Stearns, 1945. *Int. J. Systemat. Bacteriol.*, v. 16, p. 223–252, 1966.

PANANGALA, V.S.; STRINGFELLOW, J.S.; DYBVIG, K.; WOODARD, A.; SUN, F.; ROSE, L.; GRESHAM M.M. Mycoplasma corogypsi sp. nov., a new species from the footpad abscess of a black vulture, Coragyps atratus. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 43, p. 585-590, 1993.

PALYA, V.R.; GLAVITS, M.; DOBOS-KOVACS, E.; IVANICS, E.; NAGY, K.; BANYAI, G.; REUTER, G.; SZUCS, A.; DAN, M. BENKO: Reovirus identified as cause of disease in young geese. *Avian Pathology.*, v. 32, p. 129-138, 2003.

PENNER, J. D. et al. A novel Mycoplasma sp. associated with proliferative tracheitis and pneumonia in a Burmese python (Python molurus bivittatus). *Journal of Comparative Pathology*, v. 117, n. 3, p. 283–288, 1997.

PEREIRA, H. C. et al. Oral microbiota in healthy Bothrops atrox (Serpentes: Viperidae) and in snakes with stomatitis. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 11, n. 3, p. 180–183, 2017.

PHALEN, D.N.; LOGAN, K.S.; SNOWDEN, K.F. Encephalitozoon bellem infection as the cause of a unilateral chronic keratoconjunctivitis in an umbrella cockatoo (Cacatua alba). *Vet. Ophthalmol.*, v. 9, n. 1, p. 59-63, 2006.

POVEDA, J.B. Biochemical characteristics in Mycoplasma identification. In: MILES, R.; NICHOLAS, R. (Eds). Mycoplasma protocols: methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2010. v. 104, p. 69-78.

RASO, T.F. Clamidiose In: *Doença das aves*. Campinas, FACTA, 2009. 1104 p.

RASO, T. F. et al. Infecção por C. psittaci: uma revisão com ênfase em psitacídeos. *Ciênc. Rural*, v.41, n.5, p.841-847, 2011.

RASO, T. F. Clamidiose - Novas Abordagens Diagnósticas e Terapêuticas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. v. 2. cap. 67. p. 1369-1379.

RATTEI, T.; OTT, S.; GUTACKER, M.; RUPP, J.; MAASS, M.; SCHREIBER, S.; SOLBACH, W.; WIRTH, T.; GIEFFERS, J. Genetic diversity of the obligate intracellular bacterium Chlamydophila pneumoniae by genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms: evidence for highly clonal population structure. *BMC Genomics*, v. 8, n. 1, p. 355, 2007.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p.1094–1156, 1998.

RETTENMUND, C.L.; BOYER, D.M.; ORRICO, W.J.; PARKER, S.G.; WILKES, R.P.; SEIMON, T.A.; PARÉ, J.A. Long-term Oral Clarithromycin Administration in Chelonians with Subclinical Mycoplasma spp. Infection. *J. Herpetol. Med. Surg.*, v. 27, p. 58–61, 2017.

RITTER, J. Beitrag zur Frage des Pneumotyphus [Eine Hausepidemie in Uster (Schweiz) betreffend]. *Deutsches Archiv für Klinische Medizin*, v. 25, p. 53–96, 1880.

ROSTAMI, A.; SHAHABI, M.M.A.; MADANI, S. A. A Molecular Survey on Chlamydial Infection in Pet and Zoo Captive Reptiles in Tehran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, v. 11, n. 3, p. 227–233, 2017.

SACHSE, K.; BAVOIL, P. M.; KALTENBOECK, B.; STEPHENS, R. S.; KUO, C-C.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; HORN, M. Emendation of the family Chlamydiaceae: Proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species. *Syst Appl Microbiol*, 2015.

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

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.*, v. 1, 2006.

SAREYYUPOGLU, B.; CANTEKIN, Z.; BAS, B. Chlamydophila psittaci DNA Detection in the Faeces of Cage Birds. *Zoonoses Public Health.*, v. 54, p. 237–242, 2007.

SCHACHTER, J.; STEPHENS, R.S.; TIMMS, P. et al. Radical changes to chlamydial taxonomy are not necessary just yet. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 51, p. 251–243, 2001.

SCHMIDT, V. et al. Detection of pathogens in Boidae and Pythonidae with and without respiratory disease. *Veterinary Record*, v. 172, n. 9, p. 236, 2013.

SEIMON, T.A.; HORNE, B.D.; TOMASZEWICZ, A.; PRUVOT, M.; SOM, S.; IN, S.; SOKHA, C.; PLATT, S.; TOLEDO, P.; MCALOOSE, D.; CALLE, P.P. Disease screening in southern river terrapins (Batacur affinis edwardmollii) in Cambodia. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 48, p. 1242–1246, 2017.

SHI, Y.; HE, C.; ZHU, H.; DUAN, Q. Isolation and characterization of an Chlamydia psittaci in broiler. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, v. 13, p. 217-221, 2003.

SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 912 p.

SILVA, L.T.R.; SANTOS, S.B.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L.C.; SIQUEIRA, D.B.; AMORIM, M.M.R.; ALMEIDA, J.C.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA R.A. Detecção molecular e isolamento de Mycoplasma spp. em psitacídeos no estado de Pernambuco, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.1, p.113-118, 2016.

STARCK, J. M. et al. Morphology and Morphometry of the Lung in Corn Snakes (Pantherophis guttatus) Infected with Three Different Strains of Ferlavirus. *Journal of Comparative Pathology*, v. 156, n. 4, p. 419–435, 2017.

STENGLEIN, M.D.; JACOBSON, E.R.; WOZNIAK, E.J.; WELLEHAN, J.F.X.; KINCAID, A.; GORDON, M.; PORTER, B.F.; BAUMGARTNER, W.; STAHL, S.; KELLEY, K.; TOWNER, J.S.; DERISI, J.L.; Ball Python Nidovirus: a Candidate Etiologic Agent for Severe Respiratory Disease in Python regius. *mBio* 5, e01484-14, 2014.

STAHL, P. W. Animal Domestication in South America. In: SILVERMAN, H., ISBELL, W. H. *Handbook of South American Archeology*. Springer Science+Business, New York, p. 121-130, 2008.

STEPHENS, R. S. et al. Divergence without difference: Phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 55, n. 2, p. 115–119, 2009.

STIPKOVITS L., KEMPFT I. Mycoplasmosis in poultry. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Épiz.*, v. 15, n. 4, p.1495-1525, 1996.

STIPKOVITS, L.; SZATHMARY, S. Mycoplasma infection of ducks and geese. *Poultry Science*, v. 91, n. 11, p. 2812–2819, 2012.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI. A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.*, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TAKAHASHI, S.; SATO, H.; YAMADA, T.; TAKENOUCI, T.; SAWADA, T.; NAKANO, K.; SAITO H. Outbreaks of fowl cholera in Muscovy ducks (Cairina moschata) on a farm in Aomori prefecture. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 58, n. 3, p. 269-272, 1996.

TAYLOR-BROWN, A.; VAUGHAN, L.; GREUB, G.; TIMMS, P.; POLKINGHORNE, A. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum Chlamydiae. *Pathogens and Disease*, v. 73, n. 1, p. 1–15, 2015.

TIDEMANN, S. AND GOSLER, A. *Ethnoornithology: Birds, indigenous people, culture and society*. London, UK: Earthscan/ James & James, 2010.

TIONG S.K. Mycoplasmas and Acholeplasmas isolated from ducks and their possible association with pasteurellas. *Vet. Rec.*, v. 127, p. 64-66, 1990.

TOLBA, H.M.N.; ELEZ, R.M.M.A.; ELSOHABY, I. Risk factors associated with Chlamydia psittaci infections in psittacine birds and bird handlers. *Journal of Applied Microbiology* , v. 126, n. 2, p. 402–410, 2019.

TULLY, J. G. Test for digitonin sensitivity and esterol requirement. In: RAZIN, S., TULLY, J. G. (ed.) *Methods in Mycoplasmaology - Mycoplasma Characterization*. Academic Press, 1983. p. 355-362.

UCCELLINI, L.; OSSIBOFF, R.J.; DE MATOS, R.E.; MORRISEY, J.K.; PETROSOV, A.; NAVARRETE-MACIAS, I.; JAIN, K.; HICKS, A.L.; BUCKLES, E.L.; TOKARZ, R.; MCALOOSE, D.; LIPKIN, W.I. Identification of a novel nidovirus in an outbreak of fatal respiratory disease in ball pythons (Python regius). *Viol. J.*, v.11, p. 1-6, 2014.

ULLMANN, L. S. et al. Mycobacterium genavense infection in two species of captive snakes. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 22, n. 1, p. 1–4, 2016.

UMAR, S.; MUNIR, M.T.; UR-REHMAN, Z.; SUBHAN, S.; AZAM, T.; SHAH, M.A.A. Mycoplasmosis in poultry: update on diagnosis and preventive measures. *World's Poultry Science Journal*, v. 73, p. 1—12, 2017.

UPHOFF, C.C.; DREXLER, H.G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, v. 38, p. 79-85, 2002.

VAN DROOGENBROECK, C. M.; VAN RISSEGHEM, M.; BRAECKMAN, L.; VANROMPAY, D. Evaluation of bioaerosol sampling techniques for the detection of Chlamydomphila psittaci in contaminated air. *Vet Microbiol.*2008.

VAN KUPPEVELD, F.J.; VAN DER LOGT, J.T.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.; NIESTERS, H.G.; ... MELCHERS, W.J. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1992.

VAN KUPPEVELD, F.J.; VAN DER LOGT, J.T.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.; NIESTERS, H.G.; ... MELCHERS, W.J. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Applied and environmental microbiology*, v. 59, n. 2, p. 655, 1993.

VANROMPAY, D.; GEENS, T.; DESPLANQUES, A.; HOANG, T.Q.T.; VOS, L.D.; LOOCK, M.V.; HUYCK, E.; MIRR, C.; COX, E. Immunoblotting, ELISA and culture evidence for Chlamydiaceae in sows on 258 Belgian farms. *Veterinary Microbiology*, v. 99, n. 1, p. 59–66, 2004.

VAN WAEYENBERGE, J.; AERTS, J.; HELLEBUYCK, T.; PASMANS, F.; MARTEL, A. Stress in wild and captive snakes: quantification, effects and the importance of management. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v. 87, p. 59-65, 2018.

VASCONCELOS, T. B.; NOGUEIRA, D. M.; PEREIRA, V. L. DE A.; NASCIMENTO, E. R. DO; BRUNO, S. F. Chlamydia psittaci em araras-canindé (Ara ararauna) cativas em um Centro de Triagem de Animais Silvestres no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 23, n. 1–2, 2016.

VILANI, R. G. D. C. Estrutura Hospitalar, Quarentenário e Centros de Triagem. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 5, p. 33-42.

VOLOKHOV, D.V.; SIMONYAN, V.; DAVIDSON, M.K.; CHIZHIKOV, V.ERNA polymerase beta subunit (rpoB) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmataceae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v. 62, p. 515–528, 2012.

WANG, X.; ZHANG, N.-Z.; MA, C.-F.; ZHANG, X.-X.; ZHAO, Q.; NI, H.-B. Epidemiological Investigation and Genotype of Chlamydia Exposure in Pigeons in

Three Provinces in Northern China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 18, n. 3, p. 181–184, 2018.

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

WOOLCOCK, P. R., V. JESTIN, H. L. SHIVAPRASAD, F. ZWINGELSTEIN, C. ARNAULD, M. D. MCFARLAND, J. C. PEDERSEN, D. A. SENNE. Evidence of Muscovy duck parvovirus in Muscovy ducklings in California. *Veterinary Record.*, v. 146, n. 3, p. 68-72, 2000.

ZHOU, J., QIU, C., LIN, G., CAO, X., ZHENG, F., GONG, X. and WANG, G. Isolation of Chlamydophila patitaci from laying hens in China. *Veterinary Research (Medwell)*, v. 3, p. 43-45, 2010.

ZIEGLER, L.; PALAU-RIBES, F.M.; ENDERLEIN, D.; HERBST, W.; SCHMIDT, L.; LIERZ, M. Mycoplasma hafezii sp. nov., isolated from the trachea of a peregrine falcon (Falco peregrinus). *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 69, p. 773–777, 2019.

APÊNDICE

FICHA DE CAPTURA DE DADOS

1 – Dados Epidemiológicos

Instituição RIOZOO		Amostra N° _____		
Data da coleta ____/____/____	Anilha N° _____	EXAMES SOLICITADOS		
Numero do animal	Contato com outros animais (1) não (2) sim	Estilo de vida (1) confinado (2) semiconfinado (3) livre	Sexo (1) Fêmea (2) Macho	ectoparasitos (1) não (2) sim Qual _____
FENÓTIPO COLORAÇÃO _____				
IDADE _____				
PESO _____				
ESCORE CORPORAL _____				
Sinais Clínicos (1) não (2) sim		Compatíveis com:		
Qual(is) sinal(is)?				
Resultados dos exames:				
Veterinário responsável:				

ANEXOS



A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense

Declaro, para os devidos fins, que estou ciente e autorizo a execução do projeto intitulado **"DETECÇÃO E TIPIIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *Mycoplasma* spp. E *Chlamydia psittaci* POR PCR EM TEMPO REAL EM PATOS-CRIOULOS (*Cairina moschata*)** a ser realizado na Fundação Jardim Zoológico da Cidade do Rio de Janeiro, pela Médica Veterinária Bárbara Souza Neil Magalhães, no período de Março de 2016 a Dezembro de 2019, sob a orientação da Profª Drª Flavva Mendes de Almeida.

Daniel de Almeida Balthazar

Subgerente de clínica e cirurgia

Fundação RIOZOO

Mat. 60/1500548-3

DANIEL DE ALMEIDA BALTHAZAR
Subgerente de Clínica e Cirurgia
Mat. 60/1500548-3
CRM RJ 1250
Fundação RIOZOO



Rio de Janeiro, 28 de janeiro de 2017

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense

Declaro, para os devidos fins, que estou ciente e autorizo a execução do projeto intitulado **"DETECÇÃO E TIFIFICAÇÃO DE *Mycoplasma* spp. E *Chlamydia* spp. POR PCR E CULTIVO EM AVES E SERPENTES DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO"** a ser realizado no do Rio de Janeiro, pela Médica Veterinária Bárbara Souza Neil Magalhães, no período de Março de 2016 a Dezembro de 2019, sob a orientação da Pro^{fa} Dr^a Flavya Mendes de Almeida. Declaro ainda que as amostras para realização do projeto supracitado estão sendo obtidas durante contenção para avaliação clínica e demais exames realizados como rotina nesta instituição.

Luiz Paulo Luzes Fedullo

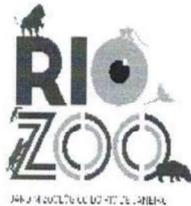
Médico Veterinário

CRMV RJ 2295

Fundação RIOZOO

Matricula 30/1500.275-3

Anexo 3



Rio de Janeiro, 09 de agosto de 2017

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense

Declaro, para os devidos fins, que estou ciente e autorizo a execução do projeto intitulado "DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO DE *Mycoplasma* spp. E *Chlamydia psittaci* POR PCR E CULTIVO EM AVES E SERPENTES SOB CUIDADOS HUMANOS" a ser realizado no RIOZOO Zoológico do Rio de Janeiro S/A, pela Médica Veterinária Bárbara Souza Neil Magalhães, no período de Março de 2016 a Dezembro de 2019, com coletas programadas nesta instituição até Agosto de 2017, conforme cronograma do projeto, sob a orientação da Profª Drª Flavya Mendes de Almeida,

Atenciosamente.


José Roberto Scheller

Diretor - Riozoo



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº 889, intitulado “DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *Mycoplasma* spp. E *Chlamydia psittaci* POR PCR EM TEMPO REAL NUMA POPULAÇÃO URBANA DE PATOS-CRIOULOS (*Cairina moschata* LINNAEUS, 1758)”, sob a orientação da Profª. Drª. Flavya Mendes de Almeida da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 20 de Dezembro de 2016. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de 100 (cem) patos-crioulos, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 20 de Dezembro de 2016.

Prof. Dr. Fabio Otero Ascoli
Coordenador da CEUA



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto nº 1017, intitulado “DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO DE Mycoplasma spp. E Chlamydia spp. POR PCR E CULTIVO EM AVES E SERPENTES DE CATIVEIRO”, sob a orientação da Prof^a Flavya Mendes de Almeida da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 8 de fevereiro de 2018. A quantidade total de animais aprovada pela CEUA para este projeto foi de 227 (duzentos e vinte e sete) aves e serpentes, e este certificado é válido por três anos após sua aprovação.

Niterói, 8 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Fabio Otero Ascoli
Coordenador da CEUA

Anexo 6



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59538-1	Data da Emissão: 18/07/2017 15:13	Data para Revalidação*: 17/08/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bárbara Neil Souza Magalhães	CPF: 111.532.737-21
Título do Projeto: DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Mycoplasma</i> spp. E <i>Chlamydia psittaci</i> POR ISOLAMENTO E PCR EM AVES E SERPENTES DE CATIVEIRO	
Nome da Instituição: UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	CNPJ: 28.523.215/0001-06

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material biológico para pesquisa de doutorado	07/2017	02/2022

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	A quantidade recomendada de sangue a ser coletado não deve ultrapassar 1% do peso do indivíduo, quantidade suficiente para os objetivos propostos, sendo o quantitativo autorizado para diversas pesquisas com Aves no Brasil.
---	--

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	RIO DE JANEIRO	RJ	Zoológico do Rio de Janeiro e Instituto Vital Brasil	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Squamata, Aves

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 14198443



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59538-1	Data da Emissão: 18/07/2017 15:13	Data para Revalidação*: 17/08/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bárbara Neil Souza Magalhães	CPF: 111.532.737-21
Título do Projeto: DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Mycoplasma</i> spp. E <i>Chlamydia psittaci</i> POR ISOLAMENTO E PCR EM AVES E SERPENTES DE CATIVEIRO	
Nome da Instituição: UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	CNPJ: 28.523.215/0001-06

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes, Outras amostras biológicas (Swab oral), Sangue
2	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue, Fezes, Secreção
3	Método de captura/coleta (Aves)	Puçã
4	Método de captura/coleta (Répteis)	Outros métodos de captura/coleta (Gancho)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	
2	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 14198443



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59538-1	Data da Emissão: 18/07/2017 15:13	Data para Revalidação*: 17/08/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bárbara Neil Souza Magalhães	CPF: 111.532.737-21
Título do Projeto: DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE Mycoplasma spp. E Chlamydia psittaci POR ISOLAMENTO E PCR EM AVES E SERPENTES DE CATIVEIRO	
Nome da Instituição: UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	CNPJ: 28.523.215/0001-06

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 14198443



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59538-1	Data da Emissão: 18/07/2017 15:13	Data para Revalidação*: 17/08/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Bárbara Neil Souza Magalhães	CPF: 111.532.737-21
Título do Projeto: DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Mycoplasma</i> spp. E <i>Chlamydia psittaci</i> POR ISOLAMENTO E PCR EM AVES E SERPENTES DE CATIVEIRO	
Nome da Instituição : UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE	CNPJ: 28.523.215/0001-06

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 14198443



Página 4/4

Anexo7



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A4E34FC

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A4E34FC**
Usuário: **UFF**
CPF/CNPJ: **28.523.215/0001-06**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Chlamydia spp

Mycoplasma spp

Título da Atividade: **DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO DE Mycoplasma spp. E Chlamydia spp. POR PCR E CULTIVO EM AVES E SERPENTES DE CATIVEIRO**

Equipe

Nadia Regina Pereira Almosny	UFF
Bárbara Souza Neil Magalhães	UFF
Daniel de Almeida Balthazar	UFRRJ
Virginia Léo de Almeida Pereira	UFF
Elmiro Rosendo do Nascimento	UFF
Leandro dos santos Machado	UFF
Flavya Mendes de Almeida	UFF
Bruna Emely Pereira Barbosa	UFF
César Leandro David	UFF
Nathalie Costa da Cunha	UFF
Thomas Salles Dias	UFF
Arthur de Almeida Figueira	UFF
Dayse Lima da Costa Abreu	UFF
Leonardo Soares de Barros	UCB

Data do Cadastro: **12/02/2019 12:04:30**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:27 de 01/07/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**