

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Ciências Veterinárias

## **Aborto Enzoótico dos Ovinos**

Pesquisa de *Chlamydophila abortus* por PCR em ovinos  
Serra da Estrela após aborto

Luís Filipe Dinis Cristóvão

Orientadores: Professor Doutor Nuno Alegria

Dr. Fernando Esteves



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2012

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Ciências Veterinárias

## **Aborto Enzoótico dos Ovinos**

Pesquisa de *Chlamydophila abortus* por PCR em ovinos  
Serra da Estrela após aborto

Luís Filipe Dinis Cristóvão

Orientadores: Professor Doutor Nuno Alegria

Dr. Fernando Esteves



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2012

## Resumo

O aborto enzoótico dos ovinos é um importante problema nas explorações, provocando um elevado impacto económico na maioria dos países produtores. Tem como agente etiológico *Chlamydophila abortus*, uma bactéria Gram-negativa que induz infeção subclínica persistente em ovelhas não-gestantes, podendo ser posteriormente causa de aborto, sobretudo no último terço de gestação.

Foram colhidas vinte zaragatoas vaginais de ovinos após aborto, em explorações na região da Serra da Estrela. As amostras foram analisadas por PCR para deteção de *C. abortus*.

A deteção do genoma de *C. abortus* em 40% das amostras (8/20) sugere que esta poderá ser uma infeção frequente na região, sendo que a elaboração de futuros estudos de prevalência poderá conduzir a uma melhoria no rendimento das explorações, e a uma diminuição do risco de transmissão zoonótica do agente.

## **Abstract**

Ovine enzootic abortion is a major problem in farms, causing high economic burden in most sheep farming countries. Its etiological agent is *Chlamydophila abortus*, a Gram-negative bacterium that induces persistent subclinical infection in non-pregnant ewes, being later a cause of abortions, particularly in the last third of gestation.

Twenty vaginal swab samples were collected after abortion in sheep, in farms from Serra da Estrela, and then analyzed by PCR for the detection of *C. abortus*.

The detection of *C. abortus* genome in 40% of the samples (8/20) suggests that this may be a frequent infection in the region. Further prevalence studies may lead in the future to an improvement in farm income, and a decreased risk of zoonotic transmission of this infectious agent.

# Índice

1.	Revisão bibliográfica.....	1
1.1.	Enquadramento histórico.....	1
1.2.	Taxonomia.....	2
1.3.	Ciclo de desenvolvimento .....	5
1.4.	Epidemiologia e Transmissão .....	7
1.5.	Patogenia.....	9
1.5.1.	Mecanismos de persistência de <i>C. abortus</i> em ovinos.....	9
1.5.2.	Imunidade materna durante a gestação .....	10
1.5.3.	Estrutura da placenta .....	11
1.5.4.	Infeção placentária por <i>C. abortus</i> .....	12
1.5.5.	Mecanismo de aborto .....	13
1.5.6.	Imunidade adaptativa na infeção por <i>C. abortus</i> .....	14
	1.5.6.1. Imunidade humoral.....	14
	1.5.6.2. Imunidade celular .....	15
1.6.	Sinais clínicos.....	16
1.7.	Diagnóstico .....	17
1.7.1.	Deteção do antigénio.....	19
	1.7.1.1. Esfregaços .....	20
	1.7.1.2. Imunoensaios.....	21
	1.7.1.3. Isolamento .....	21
1.7.2.	Deteção de anticorpos .....	23
	1.7.2.1. Testes baseados nos LPS.....	24
	1.7.2.1.1. Teste de fixação do complemento .....	24
	1.7.2.1.2. ELISA recombinante.....	24
	1.7.2.2. Testes baseados na MOMP .....	25
	1.7.2.2.1. Péptidos sintéticos e MOMP recombinantes.....	25
	1.7.2.2.2. ELISA de competição .....	25
	1.7.2.3. Testes baseados nos POMP's .....	26
1.7.3.	Métodos de amplificação de DNA .....	26
	1.7.3.1. PCR convencional .....	26
	1.7.3.2. PCR em tempo real.....	28
1.7.4.	“Microarrays” de DNA .....	29
1.8.	Tratamento .....	29

1.9.	Controlo e Prevenção .....	30
1.10.	Potencial zoonótico de <i>C. abortus</i> .....	32
2.	Pesquisa de <i>Chlamydophila abortus</i> por PCR em ovinos Serra da Estrela após aborto .....	34
2.1.	Instituição de acolhimento e Área geográfica do estudo.....	34
2.2.	A Região.....	35
2.3.	Efetivos pecuários .....	35
2.4.	Estrutura agrária e sistemas de produção .....	36
2.5.	Raça.....	37
3.	Material e Métodos.....	38
3.1.	Animais .....	38
3.2.	Caracterização da amostra.....	38
3.3.	Colheita e armazenamento das amostras.....	40
3.4.	Protocolo experimental .....	40
3.5.	“Primers” .....	40
3.6.	PCR .....	41
3.7.	Eletroforese .....	41
4.	Resultados .....	42
5.	Discussão.....	45
6.	Considerações finais.....	48
7.	Referências bibliográficas .....	49
	ANEXOS.....	55

## Índice de figuras

Figura 1 - Relações evolutivas da Ordem <i>Chlamydiales</i> . ....	4
Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento de <i>Chlamydiales</i> . ....	5
Figura 3 - Inclusões intracelulares de clamídias numa célula infetada .....	6
Figura 4 - Representação esquemática de um placentoma ovino .....	12
Figura 5 - Cordeiro abortado à 18ª semana de gestação.....	17
Figura 6 - Potencial zoonótico de <i>Chlamydiae</i> . ....	33
Figura 7 - Distribuição dos principais efetivos da raça Bordaleira Serra da Estrela. ....	34
Figura 8 - Exemplar da raça Bordaleira Serra da Estrela - variedade branca.....	37
Figura 9 - Corrimento vaginal (amostra 8).....	44
Figura 10 - Corrimento vaginal (amostra 9).....	44
Figura 11 - Corrimento vaginal (amostra 10).....	44
Figura 12 - Corrimento vaginal (amostra 11).....	44

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Taxonomia de <i>Chlamydiales</i> .....	4
Tabela 2 - Caracterização das amostras positivas .....	43

## Índice de gráficos

Gráfico 1 - Número de amostras colhidas por concelho .....	38
Gráfico 2 - Número de amostras colhidas por exploração .....	39
Gráfico 3 - Distribuição etária da população em estudo .....	39
Gráfico 4 - Tempo estimado de gestação no momento do aborto.....	39

## Lista de abreviaturas, siglas, acrónimos

® - Marca registada	LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
AEO – Aborto Enzoótico dos Ovinos	MOMP – “major outer membrane proteins”
Ag-Ac – Antígeno-anticorpo	MZN – “Modified Ziehl-Neelsen”
ANCOSE – Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela	OMSA – Organização Mundial de Saúde Animal
B3 – Efectivo indemne de brucelose	OPP – Organização de Produtores Pecuários
B4 – Efectivo oficialmente indemne de brucelose	pb – Pares de bases
<i>C. abortus</i> – <i>Chlamydophila abortus</i>	PCR – “polimerase chain reaction”
CE – corpo elementar	PCRrt – PCR em tempo real
cELISA – “ELISA” de competição	POMP – “polimorphic outer membrane proteins”
CR – corpo reticulado	rELISA – “ELISA” recombinante
DNA – ácido desoxirribonucleico	RNA – ácido ribonucleico
ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”	TFC – Teste de fixação do complemento
IFN – Interferão	TNF – Factor de necrose tumoral
IL - Interleucina	UV – Ultravioleta
LPS – Lipopolissacarídeos	VD – “Variable domain”

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Nuno Alegria por ter aceitado ser Orientador da minha Tese de Mestrado; pelo seu conhecimento e espírito-crítico indispensáveis na realização deste trabalho, pela amizade, compreensão e boa disposição com que sempre me brindou.

Ao Dr. Fernando Esteves, pela coorientação deste trabalho, por me ter recebido nos estágios de verão desde o meu 3º ano, sendo este trabalho mais um fruto da sua experiência e conhecimento obtidos ao longo de anos de trabalho e investigação ligados ao sector.

À ANCOSE – Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Serra da Estrela, pelo excelente trabalho desenvolvido na região. Agradeço os bons momentos passados no campo, na companhia da Dra. Rita, Dr. Pedro Couceiro e Dr. Luís Barros, e por me terem despertado o gosto pela clínica de campo e sanidade na nossa região, nesse dia-a-dia de desafio constante. Um obrigado à Joana pela simpatia e disponibilidade.

Ao Hospital Veterinário do Baixo Vouga, pelo profissionalismo, ambiente, conhecimento e pelas pessoas fantásticas que conheci. Foi um prazer aprender convosco, num ambiente que passado poucos dias se torna familiar. À Dra. Sónia e Dr. Artur, Dr. Olivério, Dr. Hugo, Dr. Pedro Moreira, Dr. João Neves, Dr. Zé Miguel, Dr. Miguel Malheiro...um grande grande abraço! A todos os auxiliares, enfermeiros e a nós “estagietes” obrigado por tudo.

Ao Hospital Veterinari Canis (Girona), pela experiência fantástica que foi integrar a vossa equipa. Às “manias de Cairo” e ao perfeccionismo do Josep, à equipa de auxiliares, estagiários, internos e veterinários, foi um prazer. Espero visitar-vos sempre que possível! Porque Girona...m'enamora...

Ao Professor Luís Cardoso por todos os ensinamentos, pela cedência de materiais indispensáveis ao protocolo experimental, e por conseguir reunir na mesma pessoa, um profissionalismo e qualidades pessoais dificilmente igualáveis. À Professora Rita Payan, pela disponibilidade e simpatia com que esclareceu dúvidas que surgiram no decorrer desta dissertação.

A Vila Real, pois só tu sabes como nos acolher, receber e guiar durante a melhor fase das nossas vidas, os tempos de Estudante, em que tudo é novo e nada será como d'antes...

Aos meus amigos Hélio, Rui Pedro e Gustavo, por todos os momentos desde o saudoso 5ºdto... tantas “estórias” que dava para escrever um livro! À Andreia e Vânia por todas as peripécias desde o primeiro dia, por serem as grandes amigas e confidentes, um beijinho do fundo do meu coração.

A todos nós, caloiros 2006/07 pelos excelentes momentos proporcionados ao longo desta maratona. Porque assim, até pareceu mais fácil. Obrigado a todos pelo convívio e amizade. Obrigado Miguel por todo o apoio na elaboração deste trabalho.

À minha afilhada Mafúúú !! Porque gosto muito de ti, e sabes que tens o meu apoio incondicional em todo o teu percurso, que espero acompanhar de bem perto. À Ana Cláudia por todo o apoio e a todos os meus caloiritos (estão a ficar crescidos!).

À amizade, à TransmonTuna e ao resto! Que os nossos princípios se perpetuem... e obrigado por serem uma verdadeira escola de vida. Pois só graças a esta segunda família pude viver o expoente máximo do espírito Académico. Obrigado Giga por mais do que um amigo, teres sido o meu “cérebro” direito na realização desta dissertação. Gaitas, obrigado por partilhares comigo a tua experiência e conhecimentos, pelo apoio em qualquer ocasião. Obrigado Poliban.

Ao pessoal do TWINS, aquele grupo do qual me orgulho fazer parte, e me permite sair de casa sem planos, na certeza de encontrar amigos e passar um bom bocado. À Ticha pela sua personalidade principesca, à Rita que apesar de longe estás sempre pertinho, o Rafa, aquele indivíduo que não acredita em Deus mas está sempre disponível para uma boa noite de diversão, o Samuel e as nossas conversas repletas de octanas, à Sandrita e o seu sorriso inigualável, ao Alex por saber que és aquele amigo.

Aos amigos do Basquetebol, por mesmo após alguns anos de interrupção, continuarem com o mesmo espírito e continuarmos a divertir-nos fazendo aquilo que mais gostamos.

Ao pessoal do BTT e ”MK Makinas”, por graças ao vosso trabalho, me fazerem descobrir as paisagens maravilhosas que a nossa terra tem para oferecer, e pela adrenalina e bom humor partilhados na vossa companhia.

A toda a minha família pelos bons momentos de convívio partilhados nos nossos “ajuntamentos”. Que a união continue a ser a base dos nossos relacionamentos, e continuemos a partilhar os momentos que a vida proporciona. Porque juntos, somos mesmo mais fortes.

Ao meu irmão Pedro pelo apoio incondicional, por teres sido uma referência ao longo do meu crescimento, pela proteção, por todas as aventuras vividas em equipa. À Carina por ser a grande mulher que o Pedro precisa e merece a seu lado.

Aos meus pais por sempre terem dado tudo para que nunca me faltasse nada, por todos os esforços para que os vossos filhos pudessem ter um futuro melhor. Ao meu pai pelos valores de honestidade que me soube transmitir, e pelos quais sempre nos conduziu. À minha mãe pelo teu enorme coração, compreensão, e porque Mãe... é Mãe. Obrigado por me terem dado as asas para voar.

## 1. Revisão bibliográfica

### 1.1. Enquadramento histórico

As clamídias são bactérias parasitas intracelulares obrigatórias, encontrando-se amplamente distribuídas pelo reino animal. Algumas espécies são responsáveis por doenças em humanos, tais como a psitacose, provocada por *Chlamydophila psittaci*, pneumonias causadas por *Chlamydophila pneumoniae* e infeções oculares, respiratórias ou do trato genital devido à presença de *Chlamydia trachomatis* (Longbottom e Coulter, 2003).

As clamídias foram descritas pela primeira vez por Halberstaedter e von Prowazek (1907), ao identificarem inclusões intracitoplasmáticas contendo um grande número de microrganismos em células provenientes de raspagens de conjuntiva de humanos com tracoma. Ao admitirem que os microrganismos eram protozoários, foram designados “chlamydozoa” (em grego “chlamys” significa manto (Longbottom e Coulter, 2003).

A psitacose foi identificada por Ritter, em 1879 na Suíça, que descreveu uma epidemia de sete casos de pneumonia atípica, associada à exposição a aves tropicais. Entre os anos de 1929 e 1930 ocorreu uma pandemia mundial de psitacose devido à importação de aves exóticas da Argentina para a Europa e América do Norte. O agente etiológico foi descrito por Bedson e colaboradores em esfregaços de amostras colhidas em humanos e aves infetadas. No mesmo ano, Hellerstrom e Wassen isolaram o agente responsável pelo linfogranuloma venéreo (LGV) em humanos. Ambos os organismos foram incluídos no grupo de vírus psittacosis-LGV. Num estudo posterior, Bedson e Gostling (1954) verificaram que a multiplicação dos microrganismos ocorria por fissão binária, o que os relacionava mais com as riquetsias do que com os vírus (Longbottom e Coulter, 2003).

Até aos anos 30 pensou-se que a psitacose aviária apenas ocorria em aves exóticas ou psitacídeos. Contudo, foram descritas infeções em pombos domésticos (Pinkerton e Swank, em 1940) e em patos por Wollins em 1948. A importância das aves domésticas como fonte de psitacose humana tornou-se evidente durante a década de 50, após a documentação de vários surtos em humanos resultantes do contacto com patos e perus (Longbottom e Coulter, 2003).

A primeira infeção em mamíferos domésticos foi descrita em 1936 por Greig na Escócia, após um surto de aborto em ovinos. Contudo, na época o autor sugeriu que fatores ambientais, como uma dieta inapropriada, estivessem na origem dos abortos. A doença foi designada por Aborto Enzoótico dos Ovinos (AEO), mas apenas em 1950 Stamp e colaboradores

demonstraram que se tratava de uma doença infecciosa provocada por um organismo do grupo psittacosis-LGV (Longbottom e Coulter, 2003).

Apenas em 1966 se concluiu definitivamente que as clamídias não eram vírus mas sim bactérias, pois possuíam DNA e RNA, tinham um ciclo de desenvolvimento diferente dos mecanismos de replicação víricos, possuíam parede celular semelhante à das bactérias Gram-negativas e ribossomas suscetíveis à ação dos antibióticos (Moulder, 1966).

## 1.2. Taxonomia

Antes da existência de dados genéticos apenas eram conhecidas duas espécies na Ordem *Chlamydiales*: *Chlamydia psittaci* e *C. trachomatis*. Durante muitos anos estas foram as únicas espécies dentro da família *Chlamydiaceae*, a única família desta Ordem (Everett, 2000). Em 1988 e 1989 foi pela primeira vez descrita a hibridação DNA-DNA de diferentes estirpes de *Chlamydia*, que revelou uma grande diversidade genômica na espécie até então designada por *C. psittaci* (Cox *et al.*, 1988; Grayston *et al.*, 1989). A maioria das estirpes de *C. psittaci* analisadas tinha uma percentagem de semelhança entre si inferior a 70%, um critério que Schleifer e Stackebrandt (1983) tinham estabelecido para a separação de espécies bacterianas. Com base neste mesmo critério, verificou-se que *C. psittaci* (que neste momento ainda continha *C. pecorum* e *C. pneumoniae*) englobava pelo menos seis espécies diferentes (Everett, 2000).

Os serogrupos de *C. trachomatis* tinham muitas semelhanças, como tropismos tissulares e quadros clínicos associados, bem como terem os humanos como principais hospedeiros. O mesmo se verificava com o novo táxon – *C. pneumoniae*. Contudo, estas alterações não melhoraram significativamente os problemas taxonómicos associados a *C. psittaci*. A distinção entre *C. psittaci* e *C. pecorum* não era totalmente conseguida, bem como entre as diferentes estirpes das restantes *C. psittaci*, uma vez que estas estirpes afetavam uma grande diversidade de hospedeiros animais, e com grande variedade de quadros clínicos. Algumas estirpes de *C. psittaci* causavam psitacose fatal em humanos. Estes fatores associados às dificuldades na identificação e cultivo de *C. psittaci* constituíram importantes entraves ao estudo do agente (Everett, 2000).

Devido à grande diversidade entre as populações de *C. psittaci* e à inexistência de métodos adequados para a sua identificação, Everett e Andersen, desenvolveram testes baseados em DNA. Para tal, colheram uma grande quantidade de dados de sequenciação dos genes ribossómicos e dos genes de expressão da “major outer membrane protein” (>100 000 bp)

(Everett e Andersen, 1997). As suas análises do rRNA 16S e 23S demonstraram que as *Chlamydiaceae* continham duas linhagens monofiléticas e nove grupos ao nível das espécies (Everett *et al.*, 1999). Esta constatação estava de acordo com dados não genéticos (Herring, 1993), com os estudos de rRNA 16S (Pudjiasmoko *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1997; Tanner *et al.*, 1999) e com os dados genéticos obtidos da “major outer membrane protein” (MOMP) (Kaltenboeck *et al.*, 1993). Mais importante, a caracterização de cada uma das nove espécies estava agora apoiada por um conjunto de análises fenotípicas, antigénicas, genéticas (polimorfismo derivado de clivagem com enzimas de restrição), doenças associadas e virulência das estirpes, locais de infeção e hospedeiros. (Everett, 2000).

A nova classificação das *Chlamydiaceae* dividiu o até então género *Chlamydia* em dois novos géneros, *Chlamydia* e *Chlamydophila*, nos quais se inserem nove espécies (Figura 1). As cinco novas espécies compreendem principalmente organismos patogénicos para os animais, três dos quais retirados de *C. psittaci*, e dois de *C. trachomatis*. A nova classificação proporciona um agrupamento das clamídias com diferentes relações genéticas subjacentes (Everett *et al.*, 1999). Adicionalmente, foram criadas três novas famílias na Ordem *Chlamydiales*, para acomodar bactérias próximas das clamídias recentemente descobertas: *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* e *Waddliaceae*. Estas possuem um ciclo de desenvolvimento semelhante às *Chlamydiaceae*, e têm rRNA 16S e 23S pelo menos 80% idêntico ao das *Chlamydiaceae* (Everett, 2000).

*Chlamydia trachomatis* e *C. pneumoniae* afetam principalmente os humanos, ao passo que as restantes sete espécies possuem como hospedeiro natural as aves e mamíferos não-humanos. Também foi reconhecido potencial zoonótico às espécies *C. psittaci* e *C. abortus*, uma vez que podem provocar infeção em humanos (Longbottom e Coulter, 2003; Rodolakis e Mohamad, 2010). Dos agentes patogénicos associados apenas aos animais não-humanos, três estão associados a infeções nas espécies pecuárias: *C. pecorum* infecta ruminantes e suínos, e está associada a conjuntivite, pneumonia, artrite e infeção entérica aparentemente inócua, principalmente em ovinos; *C. suis* está restrita aos suínos, causando doença reprodutiva, respiratória e entérica; e *C. abortus* causa aborto principalmente em ovinos e caprinos (Aitken e Longbottom, 2007).

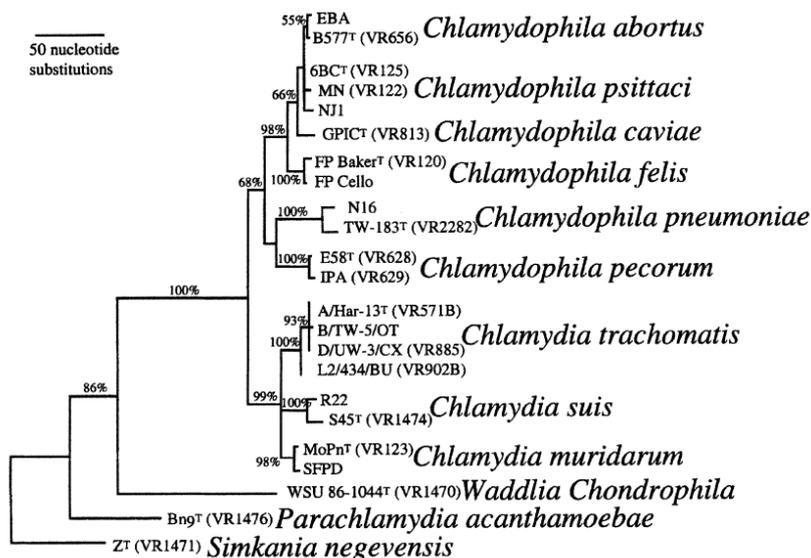


Figura 1 - Relações evolutivas da Ordem *Chlamydiales*. Análise pelo método de máxima parcimônia do gene rRNA 16S. Crédito: Robin M. Bush, Universidade da Califórnia, Irvine. Adaptado de Everett *et al.*, 1999.

Desde a sua publicação que esta revisão taxonómica tem sido adotada pela maioria dos investigadores, particularmente daqueles ligados à medicina veterinária, sendo contudo algo controversa na comunidade científica mais ligada à medicina humana. Do ponto de vista dos autores do estudo (Everett *et al.*, 1999), a principal vantagem desta nova classificação é a subdivisão do antigo heterogéneo conjunto de *Chlamydia psittaci* em quatro novas espécies (Tabela 1). Além disso, *C. abortus* e *C. psittaci*, os principais agentes com potencial zoonótico, são agora considerados espécies distintas. Contudo, à medida que são estudadas e analisadas novas estirpes, utilizando metodologias cada vez mais elaboradas, é provável que aumente o número de espécies individuais destes géneros (Sachse *et al.*, 2009).

Tabela 1 - Taxonomia de *Chlamydiales*. Adaptado de Everett *et al.*, 1999.

	Classificação anterior	Classificação revista	
<b>Ordem</b>	Chlamydiales	Chlamydiales	
<b>Família</b>	Chlamydiaceae	Chlamydiaceae (contém Simkaniaceae; Parachlamydiaceae; Waddliaceae)	
<b>Género</b>	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>Chlamydomphila</i>
<b>Espécie</b>	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i>	
		<i>C. muridarum</i>	
		<i>C. suis</i>	
	<i>C. pneumoniae</i>		<i>C. pneumoniae</i>
	<i>C. psittaci</i>		<i>C. psittaci</i>
			<i>C. abortus</i>
			<i>C. felis</i>
			<i>C. caviae</i>
	<i>C. pecorum</i>		<i>C. pecorum</i>

### 1.3. Ciclo de desenvolvimento

A família *Chlamydiaceae* é constituída por um diversificado grupo de bactérias Gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórios, responsáveis por doenças em mamíferos – incluindo humanos – e aves (Longbottom e Coulter, 2003; Aitken e Longbottom, 2007).

As *Chlamydiaceae* possuem um ciclo de desenvolvimento bifásico (Figura 2), caracterizado por duas formas morfológicas distintas: o corpo elementar (CE), e o corpo reticulado (CR). O corpo elementar é uma forma infecciosa extracelular, de pequenas dimensões (0,3µm de diâmetro), enquanto o corpo reticulado (0,5 – 1,6µm) é uma forma intracelular não-infecciosa e metabolicamente ativa. Existem também formas intermediárias entre os dois estádios. O ciclo de desenvolvimento começa com a endocitose do CE pela célula eucariota. O CE localizado dentro de uma pequena inclusão intracitoplasmática, transforma-se em CR e a replicação ocorre posteriormente por fissão binária (Moulder, 1991; Longbottom e Coulter, 2003). Através da multiplicação dos CRs, a inclusão rapidamente fica cheia e aumenta de dimensões. Após 24-48 horas, dependendo da espécie, os CRs voltam a converter-se em formas infecciosas metabolicamente inativas – CEs – que são então libertados após a rutura da célula hospedeira, e invadem as células vizinhas (Aitken e Longbottom, 2007).

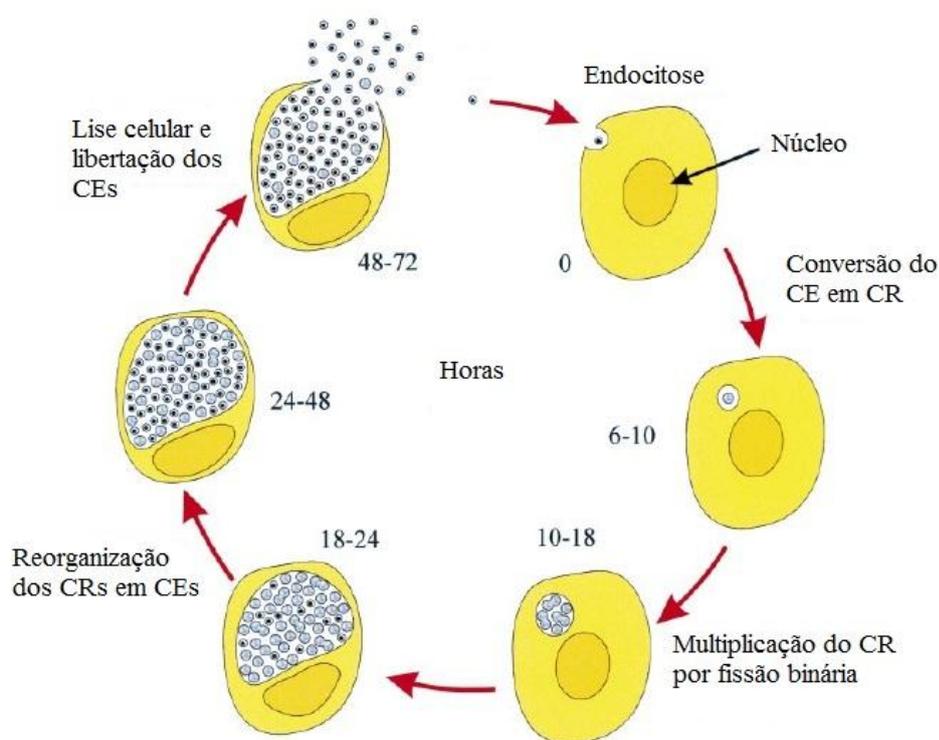


Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento de *Chlamydiales*. Adaptado de Longbottom e Coulter, 2003

A grande particularidade das *Chlamydiae* está no seu crescimento e multiplicação, que apenas ocorrem em ambiente intracelular. Os CEs caracterizam-se pela sua resistência física e química a fatores ambientais adversos no meio extracelular, bem como pela ausência de atividade metabólica. A sua resistência reside na rigidez do invólucro celular, osmoticamente estável e de reduzida permeabilidade, mas também na reduzida área de superfície dos CEs comparativamente aos CRs. Assim, o CE está adaptado a longos períodos de sobrevivência no meio extracelular (Longbottom e Coulter, 2003).

Em condições laboratoriais, as clamídias podem ser cultivadas no saco vitelino de ovo embrionado de galinha e em cultura celular. São inativadas pelo calor (10 min a 60°C) e pela exposição à formalina ou ao éter. Contudo, a forma infecciosa pode permanecer viável após várias semanas a temperaturas ambientais baixas, e durante anos a -70°C (Aitken e Longbottom, 2007).

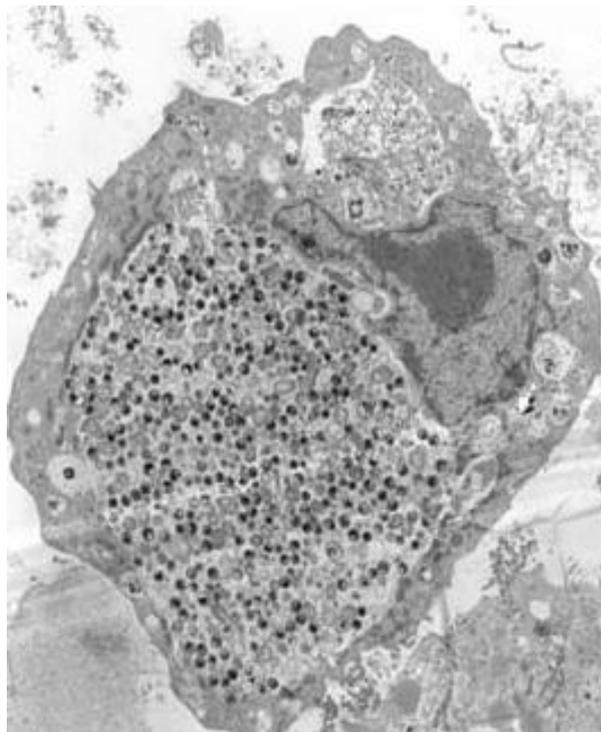


Figura 3 - Inclusões intracelulares de clamídias numa célula infectada; encontram-se visíveis CRs, e CEs – mais escuros e de menores dimensões. Adaptado de Aitken e Longbottom, 2007.

## 1.4. Epidemiologia e Transmissão

O aborto provocado pela infecção por clamídias provoca elevadas perdas económicas nas principais áreas de produção de ovinos no mundo, tais como o Reino Unido, América do Norte e África, e com a exceção da Austrália e Nova Zelândia. Apesar dos atuais conhecimentos sobre a doença e da disponibilidade de programas de controlo, continua a ser a principal causa infecciosa de aborto em ovinos no Reino Unido e outros países do Norte da Europa, enquanto no Sul, a infecção por *Brucella melitensis* aparentemente possui uma prevalência superior. O aborto por *Chlamydiae* também atinge caprinos e, em menor escala, bovinos, equinos, suínos e veados (Longbottom e Coulter, 2003; Aitken e Longbottom, 2007).

Num estudo efetuado na Suíça, *C. abortus* foi o agente mais frequentemente identificado em casos de aborto infeccioso, sendo encontrado em 39% dos abortos ovinos e em 23% dos caprinos (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002). No mesmo país, um estudo de seroprevalência efetuado em 775 explorações, representativo de cerca de 76% da população ovina da Suíça, demonstrou que aproximadamente 19% (144) das explorações testadas eram seropositivas para *Chlamydiae* (Borel *et al.*, 2004).

O aborto ocorre mais frequentemente em ovinos explorados em regime intensivo, sendo menos frequente nas explorações extensivas típicas das zonas de montanha do Reino Unido (Aitken e Longbottom, 2007). Nos sistemas intensivos, a utilização das mesmas salas (indoor) ou campos onde se efectuam os partos, pode levar a uma considerável contaminação ambiental por *C. abortus*. O contacto de fêmeas suscetíveis com um ambiente tão contaminado é um fator importante na transmissão da doença (Aitken e Longbottom, 2007). Normalmente a bactéria entra na exploração através da introdução de fêmeas infetadas, que vão disseminar o agente. Os animais sensíveis podem infetar-se independentemente da sua idade e, na época reprodutiva seguinte, pode ocorrer um surto com uma proporção de fêmeas que abortam superior a 30 por cento. Após este episódio, normalmente, apenas as fêmeas mais jovens serão afetadas, e serão esperadas proporções de aborto de 5-10 por cento, a não ser que se introduzam medidas de controlo. As fêmeas sensíveis introduzidas numa exploração afetada correm um grande risco de infecção, sendo provável que desenvolvam infecção placentária, abortando na época reprodutiva seguinte (Aitken e Longbottom, 2007).

As ovelhas que abortam ou originam cordeiros fracos ou natimortos devido à infecção placentária por *C. abortus*, libertam grandes quantidades deste agente nas placentas e descargas vaginais, sendo estes os principais produtos virulentos (Buxton *et al.*, 1990; Aitken e Longbottom, 2007; Livingstone *et al.*, 2009). Considerando como referência as condições

climatéricas médias da primavera no Reino Unido, o agente permanece viável no ambiente durante vários dias, permitindo assim a propagação da infecção (Aitken e Longbottom, 2007).

Os animais infetam-se provavelmente pelas vias oral e orofaríngea, podendo as amígdalas estar envolvidas como foco primário (Aitken e Longbottom, 2007).

Em rebanhos nos quais foram detetados abortos por clamídia, alguns animais poderão tornar-se portadores intestinais de *C. abortus* por um período indefinido e libertam intermitentemente clamídias nas fezes. Contudo, ainda se desconhece o papel desta via de transmissão na epidemiologia da doença (Storz, 1971; Aitken e Longbottom, 2007).

Nos machos, a infecção por *C. abortus* pode distribuir-se pelo aparelho genital, originando orquite e, na fase aguda da infecção, o microrganismo pode ser detetado no sémen. A infecção testicular crónica pode resultar em alterações estruturais palpáveis, contudo, a transmissão venérea é pouco comum, admitindo-se que tenha pouco relevo na epidemiologia do aborto (Aitken e Longbottom, 2007). A deposição intravaginal de *C. abortus* em ovelhas virgens durante o estro - 5 semanas antes da época natural de acasalamento - origina cordeiros de menor peso vivo ao nascimento e fraca viabilidade, mas sem ocorrência de abortos (Papp e Shewen, 1996). Observou-se algum grau de placentite, e foi comprovada a presença de *C. abortus* em esfregaços vaginais e nos cordeiros. Contudo, o papel de uma possível transmissão mecânica entre fêmeas, através da contaminação do macho requer investigações adicionais (Aitken e Longbottom, 2007).

Experimentalmente demonstrou-se que após o aborto induzido por inoculação subcutânea de *C. abortus*, as ovelhas desenvolveram infecção persistente mas não patológica do trato reprodutivo, sendo reativada nas estações reprodutivas seguintes, com excreção transitória de antigénios de clamídia durante o estro (Livingstone *et al.*, 2009). Segundo os autores, apesar da possibilidade da presença de infecção persistente em ovinos após o aborto, a reduzida quantidade de material genético do microrganismo detetado não apresenta um impacto significativo na epidemiologia do AEO. Os produtos resultantes do aborto são considerados a principal fonte de infecção (Livingstone *et al.*, 2009).

Os cordeiros vivos cujas mães possuam infecção placentária ativa, bem como os cordeiros amamentados por ovelhas que tenham abortado ou parido cordeiros mortos, são muito sensíveis à infecção, devido ao contacto próximo com a progenitora, apesar de poderem não apresentar sinais clínicos de doença. A bactéria não se transmite diretamente da mãe para o filho através do colostro nem do leite, contudo não pode descartar-se a contaminação do úbere e dos tetos pelas excreções vaginais. Dados experimentais e de campo sugerem que, se forem cobertas no

primeiro ano de vida, até um terço das cordeiras infetadas no período neonatal poderão desenvolver infecção placentária, sendo que algumas abortam durante a primeira gestação (Aitken e Longbottom, 2007).

## **1.5. Patogenia**

Os microrganismos dos géneros *Chlamydia* e *Chlamydophila* têm uma grande capacidade para estabelecer infecções persistentes numa ampla variedade de hospedeiros naturais, frequentemente sem sinais clínicos de doença. Normalmente, os ovinos não gestantes infetados com *C. abortus* não demonstram sinais clínicos de infecção, exceto quando atingem o terço final da gestação, em que pode ocorrer aborto, mais frequentemente nas últimas 2 ou 3 semanas (Longbottom e Coulter, 2003). Podem observar-se descargas vaginais em torno do momento do aborto mas, apesar disso, os animais encontram-se aparentemente saudáveis. Por estas razões, a infecção por *C. abortus* permanece indetetável na exploração até à época de partos, momento em que, muitas vezes, já é demasiado tarde para implementar medidas preventivas (Aitken e Longbottom, 2007).

### **1.5.1. Mecanismos de persistência de *C. abortus* em ovinos**

No estudo das doenças infecciosas, a fase de latência pode ser considerada como uma fase estática do microrganismo, assintomática para o hospedeiro. Já o conceito de persistência pode englobar tanto uma fase estática como uma produtiva, que poderá ou não ser sintomática. Deste modo, o termo persistência parece estar mais indicado no que se refere à infecção por *C. abortus* (Rocchi *et al.*, 2009).

A produção de citocinas é um fator importante na resposta imunitária do hospedeiro, influenciando os mecanismos de estabelecimento e persistência da infecção, ao induzir vias bioquímicas intracelulares que limitam a multiplicação das clamídias. A infecção experimental de células de ovinos por corpos elementares de *C. abortus* resulta na multiplicação do microrganismo e conseqüente morte celular. Contudo, se as células forem “tratadas” com interferão-gama recombinante ovino (IFN- $\gamma$ ) no momento da infecção, o crescimento do organismo é restringido de um modo dose-dependente (Entrican *et al.*, 1998).

Vários estudos comprovaram que os efeitos anti-clamídia do interferão-gama (IFN- $\gamma$ ) estão diretamente associados com a indução da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) e a privação de triptofano nas células (Brown *et al.*, 2001; Entrican *et al.*, 2002). A sequenciação do genoma de *C. abortus* permitiu confirmar a sua dependência no triptofano do hospedeiro, pois o organismo é auxotrófico para o triptofano, uma vez que não possui o operão triptofano sintetase (Thomson *et al.*, 2005).

Globalmente, estes dados indicam que o IFN- $\gamma$  controla o crescimento de *C. abortus* de uma forma reversível e dose-dependente, permitindo que o organismo infete de forma persistente células animais. Qualquer alteração no equilíbrio entre a produção de IFN- $\gamma$ , a expressão da IDO e a disponibilidade de triptofano poderá portanto alterar a dinâmica desta infeção (Rocchi *et al.*, 2009).

### **1.5.2. Imunidade materna durante a gestação**

A gestação nos mamíferos eutérios representa um desafio para o modelo de ativação imunitária e distinção entre “self” e “nonself”. Com base neste modelo, seria previsível que o sistema imunitário materno rejeitasse um feto que herdou metade dos genes paternos, algo que contudo não se verifica (Medawar, 1953). Uma explicação para este facto seria uma possível depressão ou supressão do sistema imunitário materno, mas tal teria como consequência um aumento da sensibilidade materna a infeções e tumores durante a gravidez, fenómeno que geralmente não se observa (Rocchi *et al.*, 2009).

A solução para esta questão aparentemente reside na observação de que existe uma modulação - e não supressão - do sistema imunitário materno (Raghupathy, 1997). As hormonas produzidas pela mãe e pelo feto, tais como progesterona, estrogénios e prostaglandinas, são fundamentais na manutenção da gravidez, desde a implantação até ao parto, tendo também efeitos imunomoduladores (Rocchi *et al.*, 2009). A progesterona é a mais importante no que diz respeito ao perfil das citocinas, pois sabe-se que em humanos induz a produção de IL-4 pelos linfócitos T e inibe a atividade citotóxica dos linfócitos T e células NK (Piccinni *et al.*, 1995; Arck *et al.*, 2007). Nos ovinos, a concentração de progesterona aumenta marcadamente a partir do 90º dia de gestação (Wooding e Flint, 1994). Apesar de este aumento causar uma redução na produção de IFN- $\gamma$  materno, e que poderia teoricamente resultar numa perda de controlo do crescimento de *C. abortus* no seu local de persistência, levando à invasão placentária, esta redução não é, aparentemente, suficiente para suportar esta hipótese. Como será discutido

posteriormente, os linfócitos T de ovinos gestantes têm capacidade de produzir IFN- $\gamma$  na sequência da infecção por *C. abortus*, sendo o nível de produção de IFN- $\gamma$  correlacionado com a proteção contra o aborto. Uma explicação alternativa poderá basear-se na acessibilidade da bactéria ao trofoblasto placentário (Rocchi *et al.*, 2009), mas para explorar esta teoria, é necessário ter em consideração a estrutura da placenta dos ovinos.

### 1.5.3. Estrutura da placenta

As ovelhas possuem uma placenta sinepiteliocorial, que se caracteriza pela adesão sem fusão das membranas coriônicas fetais e o epitélio uterino materno (Wooding e Burton, 2008). De acordo com a distribuição das vilosidades coriônicas, a placenta pode também ser classificada como cotiledonar, já que estas vilosidades se encontram aglomeradas em tufos, e não dispersas por todo o córion, estando estes separados por áreas sem vilosidades – que tomam a designação de para-placenta ou placenta avilosa. Nos ovinos, as carúnculas são concavas (Wooding e Burton, 2008). Histologicamente, ao nível dos cotilédones, observa-se uma infiltração e invasão muito limitada das estruturas epiteliais maternas pelo trofoblasto, embora não dos vasos ou capilares endometriais. Na área de contacto com as estruturas maternas, o córion fetal fomenta a formação de células sinciciais binucleadas (Wooding e Burton, 2008), cuja migração e posterior fusão com células epiteliais maternas dá origem a placas sinciciais que recobrem a superfície dos placentomas (Wooding e Burton, 2008). Esta migração do córion em profundidade nas estruturas maternas é localizada sobretudo nas áreas em que se formam os cotilédones e, além disso é limitada no tempo, sendo revertida em duas ou três semanas.

Por volta deste momento, forma-se uma rede capilar na área cotiledonária materna que reflete, com alguns dias de diferença, o processo que já tinha arrancado na componente fetal, originando o suprimento vascular indispensável à gestação (Wooding e Burton, 2008). Esta rede vascular assume um padrão característico compatível com a realização de trocas materno-fetais segundo um sistema de contracorrente. À semelhança do observado em bovinos, este padrão vai crescendo e ramificando-se ao longo da gestação, para aumentar a superfície de troca, tornando-se gradualmente mais complexo (Leiser *et al.*, 1997).

A partir do dia 60 de gestação observa-se ocasionalmente a formação de pequenos hematomas na interface materno-fetal, que têm a sua origem no extravasamento de sangue materno, entre os epitélios uterino e trofoblástico. Em bovinos, estes hematomas observam-se com mais frequência no terço final da gestação. Estas áreas podem ter a designação de áreas

hemófagas ou hematomas placentários. Foi sugerido que as áreas hemófagas participem na transferência de ferro da mãe para o feto, por eritrofagocitose realizada pelas células epiteliais do trofoblasto e pelas células binucleadas da placenta (Cazerta *et al.*, 2007).

Estas alterações fisiológicas podem ter um papel importante no decorrer do AEO. As alterações placentárias podem observar-se cerca do dia 90º de gestação, mas os antigénios de *C. abortus* podem ser detetados desde aproximadamente o dia 60º de gestação, data que coincide com a formação dos hematomas placentários (Aitken e Longbottom, 2007). É possível que a sua existência possa favorecer a invasão placentária de *C. abortus* a partir do sangue materno em ovelhas persistentemente infetadas. A patogenia do AEO tem sido relacionada com a capacidade da ovelha controlar os níveis de CEs infecciosos no sangue, sugerindo que tanto o período como a dose de infeção são fatores importantes (Sammin *et al.*, 2006). Assim, pode tratar-se simplesmente de um caso de infeção oportunista do trofoblasto por *C. abortus* quando as células fetais entram em contacto direto com o sangue materno. Isto pode também explicar o porquê da infeção por *C. abortus* em mulheres grávidas ter uma evolução tão rápida e severa (Hyde e Benirschke, 1997), dada a relativamente alta exposição do trofoblasto ao sangue materno em humanos (Rocchi *et al.*, 2009).

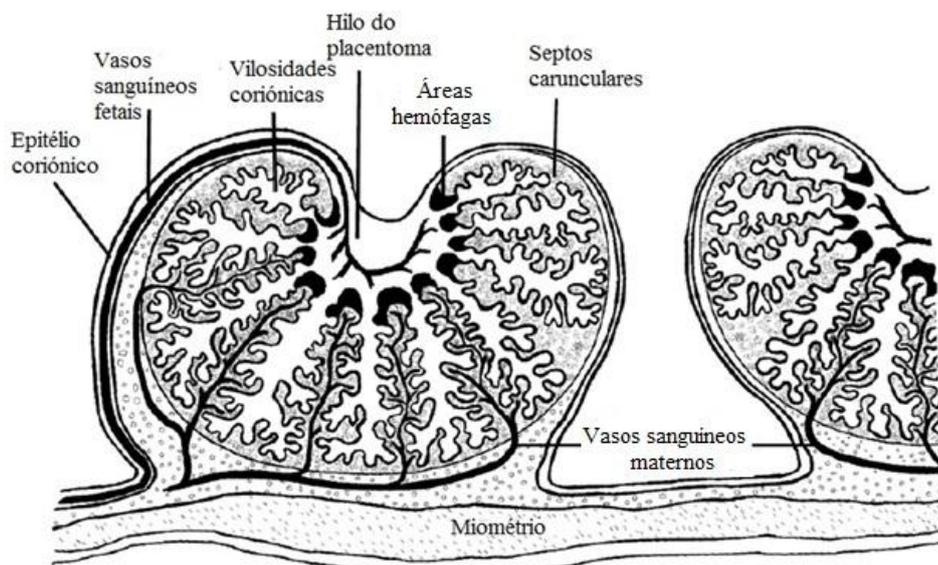


Figura 4 - Representação esquemática de um placentoma ovino. Adaptado de Rocchi *et al.*, 2009.

#### 1.5.4. Infeção placentária por *C. abortus*

Assim que atinge a placenta, *C. abortus* multiplica-se eficientemente. Apesar de não se saber a razão pela sua particular afinidade pelo trofoblasto, ou porque se multiplica tão livremente nestas estruturas, têm surgido algumas possíveis explicações. A primeira baseia-se

nas interações especializadas recetor-ligando no trofoblasto. Estas interações têm sido descritas para estirpes de *Plasmodium falciparum*, um protozoário que causa doença em mulheres grávidas, por ligação ao sulfato de condroitina A, que é expresso em altos níveis na placenta (Duffy, 2007). *Chlamydia trachomatis* serovar E utiliza um componente do recetor de estrogénio para se ligar às células endometriais humanas (Davis *et al.*, 2002), mas esta propriedade ainda não foi estudada para *C. abortus*. Outro fator que facilita o crescimento de *C. abortus* na placenta poderá ser a disponibilidade de nutrientes neste meio (Rocchi *et al.*, 2009). Por exemplo, relativamente a *Brucella abortus*, a sua virulência está ligada à capacidade de utilizar eritritol (Essenberg *et al.*, 2002). O terceiro fator poderá centrar-se na natureza altamente especializada das interações imunológicas na interface materno-fetal para prevenirem a rejeição do feto. Atualmente ainda não se conhecem em detalhe os mecanismos que atuam nos ovinos (Rocchi *et al.*, 2009). Na regulação imunitária do útero ovino foi descrita a serpina uterina – uma proteína produzida pelo endométrio que inibe a proliferação linfocitária através da redução da expressão do recetor IL-2, CD25 (Peltier *et al.*, 2000). A administração local de progesterona no útero da ovelha promove a sobrevivência de xenotransplantes uterinos a concentrações mais baixas do que as necessárias para suprimir a proliferação linfocitária, sugerindo um efeito imunomodulador local (Majewski e Hansen, 2002). Isto indica que existe pelo menos um mecanismo imunossupressor nos ovinos que evita a rejeição materna do feto (Rocchi *et al.*, 2009).

### 1.5.5. Mecanismo de aborto

A principal alteração patológica da infeção por *C. abortus* em ovelhas gestantes é a necrose do epitélio endometrial e do trofoblasto fetal. Em ovelhas gestantes infetadas com *C. abortus* por via subcutânea a meio da gestação (dia 75), as inclusões de *C. abortus* podem ser detetadas 14 dias pós-infeção nas células mononucleares do estroma materno, e em seguida no epitélio junto às zonas intercarunculares (Navarro *et al.*, 2004). Estas inclusões, muito provavelmente de origem hematogena estão acompanhadas por um infiltrado celular mononuclear e polimorfonuclear. Apesar das lesões maternas serem normalmente reduzidas, poder-se-á observar necrose focal e colonização das células epiteliais maternas por *C. abortus*, sem aparecimento de danos no trofoblasto. A porção fetal do placentoma em proximidade às lesões maternas apresenta lesões mais graves aos 28 dias pós-infeção, nomeadamente edema corioalantóico, arterite, trombose, e um infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares, acompanhado de uma multiplicação significativa de *C. abortus* nas células

do trofoblasto, e aumento da espessura das membranas intercotilodoneas (Buxton *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 2004). A caracterização fenotípica das placentas abortadas revelou que o infiltrado inflamatório é principalmente constituído por células que expressam o CD14 ou as proteínas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II, características típicas dos macrófagos. Também se observa reduzida quantidade de linfócitos T (CD4+, CD8+,  $\gamma/\delta$ , TCR) e linfócitos B (Buxton *et al.*, 2002). O infiltrado celular está acompanhado por uma grande produção de fatores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), mas não de fatores protetores, como o IFN- $\gamma$  (Buxton *et al.*, 2002). Portanto, o aborto resulta da combinação de diversos fatores, incluindo a trombose vascular induzida por citocinas, rotura do epitélio coriônico devido ao crescimento descontrolado de *C. abortus*, perda da capacidade endócrina da placenta e consequente desequilíbrio dos níveis hormonais responsáveis pela manutenção da gestação (Entrican, 2002).

### **1.5.6. Imunidade adaptativa na infeção por *C. abortus***

Segundo a literatura disponível, assim que *C. abortus* invade a placenta, é desencadeada uma cascata de eventos, ligada ao crescimento do microrganismo no epitélio coriônico, que parece acelerar a partir do dia 90 de gestação, causando graves danos celulares e inflamação, e terminando quase inevitavelmente em aborto (Buxton *et al.*, 1990; Maley *et al.*, 2009; Rocchi *et al.*, 2009).

Consequentemente, a proteção contra o AEO parece estar muito dependente da capacidade do sistema imunitário materno em prevenir a invasão placentária por *C. abortus*. As ovelhas que tenham abortado uma vez, não continuam a abortar repetidamente, pelo que o grande objetivo da vacinação consiste em mimetizar a proteção imunitária que ocorre após o aborto (Entrican *et al.*, 2001).

#### **1.5.6.1. Imunidade humoral**

Durante a infeção por *C. abortus* são produzidos de anticorpos – seroconversão – que poderão ser úteis para o diagnóstico. Ao que tudo indica, estes desempenham um papel ativo na proteção contra a reinfeção, quer pela opsonização dos CEs quer pela prevenção da adesão dos CEs às células alvo, sendo contudo questionável se podem dar resposta a uma infeção já

estabelecida. Ovelhas experimentalmente infetadas, seroconvertidas a MOMP ou POMP (‘‘polimorphic outer membrane proteins’’) durante a gestação, continuam a desenvolver as lesões placentárias e abortam (Livingstone *et al.*, 2005).

### 1.5.6.2. Imunidade celular

Sendo *C. abortus* um parasita intracelular obrigatório, torna-se evidente a importância da resposta imunitária mediada por células, particularmente dos linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$ . A importância do IFN- $\gamma$  no controlo da infeção foi confirmada através de um estudo *in vivo* em ratos (McCafferty, 1994). A produção de IFN- $\gamma$  está ainda correlacionada com a proteção em ovinos, não só pela sua presença no sistema linfático após o contacto com os corpos elementares, como também pela sua capacidade de inibir o crescimento de *C. abortus* nas células do animal (Graham *et al.*, 1995).

A proveniência do IFN tem uma grande importância, uma vez que podem ser desenhadas vacinas baseando-se em diferentes componentes do agente, para estimularem diferentes populações de linfócitos T e deste modo atingir a proteção desejada (Rocchi *et al.*, 2009).

Estudos fenotípicos que recolheram linfa eferente de ovelhas após infeção por *C. abortus*, revelaram uma predominância das populações celulares de linfócitos T CD4+, CD8+ e  $\gamma/\delta$  no momento de resolução da infeção (Huang *et al.*, 1991). É portanto provável que vários tipos celulares e as suas interações, os perfis de citocinas e as suas funções efetoras sejam determinantes na proteção contra o AEO (Rocchi *et al.*, 2009).

Os novos avanços na medição das citocinas de ovinos, permitiram a Rocchi e colaboradores estudar os perfis de citocinas, através da colheita de células mononucleadas de sangue periférico de ovelhas experimentalmente infetadas com *C. abortus* no dia 70 de gestação, e reestimuladas *in vitro* com concanavalina A, um mitogénio de linfócitos T. Um dado interessante foi o facto de as ovelhas que não abortaram durante a experiência terem produzido um pico elevado e precoce de IFN- $\gamma$ , e que não se observou nos animais que abortaram. Outro padrão digno de registo é o pico de produção de IFN- $\gamma$  em torno no período de aborto ou parto. Os autores colocaram a hipótese de que este pico corresponderia à grande estimulação antigénica causada pela extensa infeção placentária por *C. abortus*, uma vez que várias ovelhas que não abortaram mantinham sinais de infeção placentária, apesar de estes não serem tão graves como nas placentas abortadas. Estes padrões corroboram a correlação do IFN- $\gamma$  com a proteção contra o AEO. Durante a gestação, os níveis de IL-4 permaneceram baixos e sem padrões de diferenciação significativos entre ovinos infetados e não infetados, independentemente de terem

ou não abortado. Quanto à produção de IL-10, também não foram observadas diferenças significativas entre grupos (Rocchi *et al.*, 2009).

Os autores não identificaram a fonte celular destas citocinas, mas acreditam que possam derivar de células fenotipicamente distintas, baseadas no paradigma dos perfis de citocinas dos subtipos celulares de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th1/ Th2/ Th3/ Treg/ Th17) descritos no rato (Bettelli *et al.*, 2007).

Apesar de tradicionalmente os linfócitos T  $\gamma/\delta$  não serem considerados um componente do sistema imunitário adaptativo, atuando mais como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, o estudo de Rocchi e colaboradores pareceu revelar uma resposta anamnésica seletiva dos linfócitos T  $\gamma/\delta$ . Esta possibilidade poderá ter alguma importância para o desenvolvimento de novas vacinas, pois estas células são um importante componente da resposta imunitária mediada por células em ruminantes, e têm capacidade de produzir IFN- $\gamma$  (Baldwin *et al.*, 2002).

## 1.6. Sinais clínicos

O aborto por clamídias ocorre aparentemente sem sinais premonitórios, apesar de alguns dias antes do aborto ser possível observar uma discreta descarga vaginal antes da expulsão dos cordeiros (Aitken e Longbottom, 2007).

Após o aborto, as lesões características da doença são a presença de membranas fetais espessadas, necróticas e com sinais de inflamação. Os fetos abortados encontram-se normalmente bem desenvolvidos e não apresentam alterações anatómicas significativas, sendo a placentite um elemento chave na patogenia do AEO (Buxton *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2005).

Alguns cordeiros abortados podem apresentar o abdómen dilatado devido à acumulação de fluídos nas cavidades serosas, e apresentar a lã parcialmente manchada, devido a exsudados de origem placentária. No entanto raramente se observam alterações degenerativas mais graves, tal como opacidade da córnea e lã facilmente destacáveis, indicativas de morte alguns dias ou semanas antes do aborto (Aitken e Longbottom, 2007).

De um modo geral, os cordeiros que nascem fracos raramente sobrevivem, ainda que com cuidados médicos (Papp e Shewen, 1996). Algumas ovelhas com infeção placentária podem no entanto originar cordeiros vivos, que são criados com sucesso. No caso de gestações múltiplas pode originar-se um cordeiro morto e os restantes fracos ou normais (Aitken e Longbottom, 2007).

Durante vários dias após o aborto, as ovelhas podem eliminar descargas uterinas, mas apesar disso, encontram-se clinicamente normais. As descargas acabam por terminar após um período de tempo variável, e o futuro reprodutivo dos animais não sofre alterações. As ovelhas tornam-se clinicamente imunes, apesar de algumas poderem continuar a excretar clamídias durante o estro e parto seguintes (Papp *et al.*, 1994; Livingstone *et al.*, 2009). Em casos esporádicos pode ocorrer retenção placentária e conseqüentemente metrite, conduzindo a um agravamento do quadro clínico, e morte como resultado de infecção bacteriana secundária (Aitken e Longbottom, 2007).

Apesar de ainda não ter sido confirmado em condições naturais, estudos experimentais sugerem que poderá ocorrer morte fetal e reabsorção sensivelmente a meio do período de gestação (Aitken e Longbottom, 2007).



Figura 5 - Cordeiro abortado à 18ª semana de gestação. Observa-se espessamento das membranas na zona intercotiledonar, e uma coloração vermelho-escura dos cotilédones. Crédito: D. Buxton, Moredun Research Institute (Adaptado de Longbottom e Coulter, 2003)

## 1.7. Diagnóstico

Em muitos casos é possível estabelecer um diagnóstico presuntivo baseado na anamnese, sinais clínicos e alterações patológicas. Contudo, antes de enviar qualquer amostra para análise, deve ter-se em conta a possibilidade de estarem envolvidos outros agentes infecciosos, e considerar também eventuais causas não-infecciosas de aborto (Sachse *et al.*, 2009).

O aborto de cordeiros com ausência de malformações, próximo do termo da gestação e com placentite necrótica associada são suspeitos de aborto por clamídias, apesar de em alguns

casos a toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) poder apresentar sinais clínicos semelhantes, e da possibilidade de mais do que uma espécie de microrganismos poderem estar envolvidos num surto de aborto. A placentite necrótica não é característica de outras causas infecciosas menos comuns de aborto, tais como *Listeria* e *Campylobacter*. Ainda que menos frequente, o aborto pode ocorrer como consequência da infeção das ovelhas gestantes por *Coxiella burnetii* – uma riquetsia também transmissível a humanos, causando uma doença semelhante a uma gripe, designada Febre Q (Aitken e Longbottom, 2007).

Sendo *Chlamydiae* parasitas intracelulares, o seu isolamento e cultura requerem técnicas mais elaboradas, como por exemplo a cultura celular. Para demonstrar a viabilidade de uma determinada estirpe é necessário proceder à sua cultura em linhas celulares permanentes, ou em ovo embrionado de galinha. Estes procedimentos, permitem uma detalhada caracterização através de posteriores análises moleculares e bioquímicas, e por esta razão, continuam a ser considerados o “gold standard” no diagnóstico das infeções por *Chlamydiae* (Thejls *et al.*, 1994). Contudo, estas técnicas apresentam algumas limitações, fator que tem estimulado o desenvolvimento de novas técnicas, nomeadamente de deteção direta de proteínas do LPS, de anticorpos ou de DNA (Sachse *et al.*, 2009).

Existem fundamentalmente duas abordagens principais no diagnóstico das infeções por clamídias: a primeira baseia-se na deteção direta do agente nos tecidos ou em amostras colhidas por zaragatoa, e a segunda envolve a colheita de sangue do animal, para posterior rastreio sorológico para pesquisa de anticorpos anti-clamídia (Sachse *et al.*, 2009).

De uma forma geral, os autores sugerem os seguintes passos a ter em conta quando se pretende chegar ao diagnóstico de aborto por *Chlamydiae* ou outro agente infeccioso:

- (i) Caracterização do tipo de aborto (ex. precoce, no final de gestação, fetos mumificados).
- (ii) Conhecer o historial de doenças da exploração/ rebanho (se é o primeiro ou tem havido casos repetidos de aborto, número de animais afetados).
- (iii) Colheita de amostras sanguíneas dos animais afetados para análise sorológica (para exclusão de outros agentes como *Brucella melitensis*, entre outros).
- (iv) Inspeção macroscópica da placenta (se disponível).
- (v) Colheita de amostras da placenta e de órgãos fetais para análises adicionais (microbiologia, histopatologia, biologia molecular).

- (vi) Realização de procedimentos bacteriológicos de rotina (ex. preparação de esfregaços, cultura).
- (vii) Análise histopatológica da placenta e/ou órgãos fetais.
- (viii) Detecção de antígenos no interior das lesões (por imunohistoquímica).
- (ix) Detecção/ confirmação/ diferenciação de antígenos por reação Ag-Ac e/ou outras técnicas moleculares.
- (x) De acordo com os regulamentos específicos individuais do país, relatar a doença (em caso de notificação obrigatória).

No passo vii, é importante assegurar que o agente infeccioso diagnosticado está de acordo com as lesões apresentadas, não se tratando de uma contaminação, uma vez que as placentas são normalmente colhidas de ambientes contaminados. Em muitos casos não será possível ou mesmo necessário seguir todos estes procedimentos. Por exemplo, se apenas forem colhidas zangaratoas vaginais ou da superfície dos fetos abortados, os passos iii a v, vii e viii não serão necessários (Sachse *et al.*, 2009).

### 1.7.1. Detecção do antígeno

A presença do antígeno em amostras de tecidos ou zangaratoas pode ser demonstrada através da preparação e coloração citoquímica de esfregaços. Nos laboratórios de patologia veterinária, a detecção de antígenos em amostras clínicas (ex. placentas de casos de aborto) é geralmente realizada em amostras fixadas em formol ou fixadas em formol e incorporadas em parafina, utilizando diversas técnicas de coloração histoquímica e imunohistoquímica. Outra abordagem baseia-se na utilização de outras técnicas, tais como ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assays”) e testes de anticorpos fluorescentes. Contudo, apesar de estes testes comprovarem com sucesso a presença dos microrganismos, geralmente não permitem a distinção entre espécies, serotipos ou subtipos envolvidos. Isto deve-se ao facto da maioria dos testes envolver o uso de corantes citoquímicos não específicos, ou de anticorpos monoclonais baseados em antígenos específicos de *Chlamydiaceae*, como os LPS (Sachse *et al.*, 2009).

A maior desvantagem desta abordagem é estar dependente de um adequado armazenamento e transporte das amostras para garantir a viabilidade dos microrganismos (Sachse *et al.*, 2009). Como existe sempre um período de tempo entre a colheita das amostras e a sua receção no laboratório, estas deverão ser mantidas a 4°C num meio de transporte adequado,

tal como o sacarose/ fosfato/ glutamato (SPG) suplementado com soro fetal bovino, antibióticos e um inibidor fúngico (Spencer e Johnson, 1983). Dependendo do tipo de amostra submetida a análise e do método de detecção utilizados, poderá ocorrer contaminação causada por outras espécies bacterianas, nomeadamente bactérias Gram-negativas, o que poderá originar resultados falso-positivos. Além disso, o isolamento é um processo demorado, que requer pessoal e instalações qualificadas. Devem também ser ponderados os problemas de segurança que envolvem o manuseamento destes microrganismos, nomeadamente de *C. abortus* e *C. psittaci* (Sachse *et al.*, 2009), espécies zoonóticas que poderão causar infeções graves em humanos (Longbottom e Coulter, 2003). Contudo, apesar das limitações e precauções inerentes ao isolamento do microrganismo, esta técnica mantém uma grande importância do ponto de vista epidemiológico, pois permite caracterizar as estirpes e identificar de forma inequívoca as espécies, serotipos e subtipos envolvidos na infeção (Sachse *et al.*, 2009).

#### 1.7.1.1. Esfregaços

Na suspeita de aborto por clamídias, deverá proceder-se à colheita de amostras para a preparação de esfregaços, que poderão ser efetuados a partir das membranas placentárias – nomeadamente dos cotilédones – ou através de zaragatoas vaginais ou da superfície dos fetos (Longbottom e Coulter, 2003).

Os esfregaços podem ser corados através de várias técnicas e procedimentos, como por exemplo, Machiavello-modificado, Gimenez-modificado ou Ziehl-Neelsen modificado (MZN). Através do MZN, os esfregaços obtidos de amostras positivas quando examinados por microscopia, demonstram a presença de pequenas formas cocóides – os corpos elementares – com uma coloração vermelho-rosada, contrastados com um fundo celular azul ou verde. Apesar de este método funcionar bem para tecidos com elevada quantidade de clamídias, em amostras com baixos níveis de infeção e em que os corpos elementares aparecem sozinhos, estes dificilmente serão detetados. Além disso, no caso de suspeita de infeção por *C. abortus*, mas com ausência de sinais clínicos na placenta, devem tomar-se precauções acrescidas na observação dos esfregaços, devido à possível confusão com *Coxiella burnetti*, uma rickettsia com formato de bastão, que também pode causar aborto, e possui características de coloração semelhantes (Sachse *et al.*, 2009). A aplicação de um método de estreptavidina-biotina para coloração de esfregaços de *C. abortus* obteve maior sensibilidade e especificidade que a técnica de MZN (Szeredi e Bacsadi, 2002).

A sensibilidade da detecção de corpos elementares de *C. abortus* em esfregaços pode ser aumentada através da utilização de testes de anticorpos fluorescentes, utilizando anticorpos anti-LPS específicos de *Chlamydiaceae* ou anticorpos monoclonais específicos anti-MOMP. No entanto, quando o número de microrganismos é demasiado baixo, a probabilidade de sucesso aumenta com a utilização de ensaios imunomediados ou métodos de amplificação de DNA (Sachse *et al.*, 2009).

### **1.7.1.2. Imunoensaios**

Os testes de detecção de antígenos disponíveis no mercado são principalmente utilizados para a detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras clínicas humanas, embora teoricamente também sejam adequados para a detecção de infeções por clamídia em animais, pois baseiam-se nos antígenos de LPS específicos da família *Chlamydiaceae*. Estes imunoensaios incluem testes de imunofluorescência direta e ELISA.

Além do menor tempo despendido, uma das principais vantagens da utilização de imunoensaios face à cultura de células é que estes conseguem detetar tanto corpos elementares viáveis como não viáveis, bem como antígenos de LPS solúveis nas secreções. Contudo, a sensibilidade e especificidade dos imunoensaios é variável, estando as menores sensibilidades geralmente associadas a baixos graus de infeção, e, portanto, reduzido número de microrganismos presentes na amostra (Sachse *et al.*, 2009). Por este motivo, muitos laboratórios preferem usar métodos sorológicos ou métodos moleculares de detecção, com maior especificidade e sensibilidade (Sachse *et al.*, 2009).

### **1.7.1.3. Isolamento**

Além das precauções necessárias para manter a viabilidade das amostras durante o armazenamento e transporte até ao laboratório, devem tomar-se cuidados acrescidos no ato de colheita das amostras, para evitar possíveis contaminações com outras bactérias que podem interferir com o isolamento de clamídia. A adição de antibióticos ajuda a reduzir os efeitos da contaminação, contudo, devem seleccionar-se antibióticos adequados, tais como a estreptomicina (200µg/ml), gentamicina (50µg/ml), vancomicina (75µg/ml) ou nistatina (25unidades/ml). As

penicilinas, tetraciclina e o cloranfenicol não podem ser utilizados pois inibem o crescimento de *Chlamydiae* (Sachse *et al.*, 2009).

No caso de isolamento em ovos embrionados de galinha, o saco vitelino de embriões com 6-8 dias é inoculado com uma suspensão da amostra, e os embriões morrem entre 4 a 14 dias após a infecção. Os esfregaços preparados a partir das membranas do saco vitelino, são depois corados por MZN modificado, Machiavello ou Giemsa, para permitir a observação dos CEs. Apesar da cultura em ovo continuar a ser uma técnica válida para o isolamento bacteriano, é dispendiosa, incómoda, tem pouca reprodutibilidade, e consoante a espécie ou subtipo envolvidos, a sensibilidade é variável. No entanto, a cultura em ovo continua a ser utilizada, principalmente para obtenção de antígenos para produção de vacinas, ou para a obtenção de inóculos necessários em estudos de infecção experimental. A experimentação em embriões vivos está restrita em alguns países e obedece a legislação específica, requer instalações apropriadas e licenciadas, com sistemas de controlo face ao risco biológico envolvido e pessoal técnico especializado para o manuseamento das amostras (Sachse *et al.*, 2009).

O desenvolvimento dos métodos de cultura celular tornou-se uma alternativa com maior sensibilidade para isolamento dos agentes. Desde os anos 70 que a cultura em ovo foi sendo gradualmente substituída pela cultura de células, para isolamento direto de *Chlamydiae*. O isolamento de *Chlamydochila abortus*, na época designada *Chlamydia psittaci*, foi pela primeira vez descrito por Hobson e colaboradores (1977), utilizando células de McCoy, as mais frequentemente utilizadas para o isolamento deste agente. Contudo, *C. abortus* também cresce em outros tipos celulares, tais como BGMK (“Buffalo green monkey kidney cells”), BHK (“baby hamster kidney”) e fibroblastos de rato (Sachse *et al.*, 2009).

A infecção das *Chlamydiae* na cultura celular, beneficia da centrifugação e/ou tratamento químico, antes ou durante a infecção, utilizando por exemplo cicloheximida (1µg/ml), citocalasina B (2 µg/ml), emetina (1µg/ml), dietilaminoetil-dextrano (20µg/ml) ou 5-iodo-2deoxiuridina (80µg/ml). Os componentes do meio de cultura celular também podem influenciar o crescimento do microrganismo, particularmente no caso das espécies mais difíceis de propagar, ou quando o inóculo contém um baixo número de organismos (Sachse *et al.*, 2009).

Após uma incubação a 37°C durante 2-3 dias (dependendo da espécie de clamídia), as culturas celulares inoculadas podem ser fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa, fixadas em acetona/metanol e coradas por imunofluorescência ou utilizando o método da imunoperoxidase, para demonstrar a presença de inclusões intracitoplasmáticas (Sachse *et al.*, 2009).

### 1.7.2. Detecção de anticorpos

Em medicina veterinária, a deteção de anticorpos é principalmente utilizada na confirmação de suspeita de infeção, em estudos epidemiológicos para estimar a prevalência e na determinação do estatuto imunitário pós-vacinal dos efetivos. A deteção do anticorpo ligado pode ser conseguida através da utilização de anticorpos fluorescentes (teste de imunofluorescência indireta), anticorpos marcados com enzima (ELISA indireto), ou pelo teste de fixação do complemento (TFC). Como nos ruminantes e suínos, várias espécies de clamídia podem infetar o mesmo hospedeiro, a seleção do teste mais adequado deve basear-se na distribuição epidemiológica relativa ao hospedeiro em causa (Sachse *et al.*, 2009).

O diagnóstico sorológico do AEO é dificultado por vários fatores, nomeadamente pela natureza persistente da infeção, que permanece indetetável até ao dia 90 de gestação (Buxton *et al.*, 1990). Além disso, frequentemente os ruminantes encontraram-se infetados por *C. pecorum*, o que causa diferentes manifestações clínicas (Fukushi e Hirai, 1992; Kaltenboeck *et al.*, 1993; Philips e Clarkson, 1995; Anderson *et al.*, 1996). Outra limitação baseia-se no facto de terem sido isoladas das fezes de ovinos estirpes de *C. abortus*, sem história prévia de aborto, mas com baixos títulos de anticorpos, no limiar de positividade (Storz, 1971; Rodolakis e Souriau, 1989; Salti-Montesanto *et al.*, 1997; Gut-Zangger *et al.*, 1999).

Durante mais de 50 anos o teste de fixação de complemento (TFC) foi o teste mais utilizado para o diagnóstico sorológico de AEO, e o teste recomendado pela OMSA. Contudo, o TFC tem pouca especificidade, porque os antigénios em causa – principalmente os LPS – são comuns a todas as espécies de *Chlamydiaceae* (Brade *et al.*, 1987). Durante muito tempo, o principal entrave ao aperfeiçoamento dos testes sorológicos para diagnóstico de AEO foi a inexistência de um método específico que permitisse a distinção das infeções de *C. abortus* das causadas por *C. pecorum*. Todavia, têm sido desenvolvidos vários métodos para ultrapassar estas dificuldades, nomeadamente através do recurso a testes de imunofluorescência direta ou de “immunoblotting” (Markey *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1997). Com o avanço das técnicas moleculares, têm sido desenvolvidos testes baseados em antigénios recombinantes (LPS) (Griffiths *et al.*, 1996), bem como na MOMP (Kaltenboeck *et al.*, 1997; Salti-Montesanto *et al.*, 1997; Gut-Zangger *et al.*, 1999; Hoelzle *et al.*, 2004), e na 80-90 kDa POMP (Buendia *et al.*, 2001; Longbottom *et al.*, 2001; Longbottom *et al.*, 2002).

### 1.7.2.1. Testes baseados nos LPS

#### 1.7.2.1.1. Teste de fixação do complemento

O teste de fixação do complemento (TFC) foi o primeiro teste baseado nos lipopolissacarídeos (LPS) membranários (Stamp *et al.*, 1952), sendo frequentemente utilizado nos laboratórios veterinários (Sachse *et al.*, 2009). No AEO, os títulos de anticorpos aumentam no momento do aborto e permanecem elevados durante pelo menos 6 semanas (Storz, 1971). Um título no TFC superior a 32 é considerado indicativo de infecção por *C. abortus*, enquanto que valores mais baixos poderão dever-se à presença de infecções subclínicas por *C. abortus* ou a reações cruzadas com *C. pecorum* ou outros LPS bacterianos (Sachse *et al.*, 2009). O TFC não é exequível com soro hemolisado nem com soro anti-complementar (Cross e Clafin, 1963) e, além disso, nem todos os isótipos de imunoglobulinas têm a capacidade de fixar o complemento (Schmeer *et al.*, 1987; Kaltenboeck *et al.*, 1997). Estudos recentes em que foram utilizados soros de ovinos e caprinos com documentada presença ou ausência de AEO, obtiveram entre 83 e 98,1% de especificidade e 68,8 a 91,4% de sensibilidade (Jones *et al.*, 1997; Longbottom *et al.*, 2001, 2002; Vretou *et al.*, 2007). A origem e a preparação dos LPS para utilização no TFC têm uma grande importância no sucesso da técnica (Sachse *et al.*, 2009). Foi desenvolvida uma versão automatizada da técnica do TFC, cujos resultados possuem uma elevada correlação com os testes manuais (Magnino *et al.*, 2005).

#### 1.7.2.1.2. ELISA recombinante

O teste de ELISA recombinante (rELISA), baseado nos LPS foi descrito como uma alternativa viável ao TFC (Griffiths *et al.*, 1996). O antigénio utilizado no rELISA contém os dois tipos de epítomos presentes no LPS, o “ $\alpha 2 \rightarrow 4$  linked dissaccharide moiety” e o “(2  $\rightarrow$  8) linked chlamydial specific epitope” (Brade *et al.*, 1994). Este teste foi originalmente desenvolvido para o diagnóstico das infeções por *Chlamydia trachomatis* e *C. pneumoniae* em humanos, mas foi posteriormente adaptado para o diagnóstico sorológico do AEO (Griffiths *et al.*, 1996). Tal como outros meios de diagnóstico sorológicos, este teste não consegue diferenciar a infeção de *C. abortus* da causada por *C. pecorum*, mas mostrou possuir uma sensibilidade superior à do TFC no rastreio primário de AEO (Griffiths *et al.*, 1996). De uma forma geral, o rELISA caracteriza-se por uma boa sensibilidade e reprodutibilidade, bem como uma

correspondência de 80,6% com o TFC estimada por análise de 297 amostras de soro (Sachse *et al.*, 2009).

## **1.7.2.2. Testes baseados na MOMP**

### **1.7.2.2.1. Péptidos sintéticos e MOMP recombinantes**

A diversidade dos domínios variáveis VD1-4 nos genes *ompA* de *C. abortus* e *C. pecorum* constituiu a base molecular para o desenvolvimento de testes específicos capazes de distinguir as duas espécies (Kaltenboeck *et al.*, 1993). A reatividade dos decapeptídeos sintéticos abrangendo os quatro domínios variáveis (VDs) das MOMP em soro de sete ovelhas gestantes infetadas por *C. abortus* e em soro de dez borregos SPF (“specific pathogen free”) infetados por *C. pecorum* foi significativamente diferente (Sachse *et al.*, 2009).

### **1.7.2.2.2. ELISA de competição**

O teste ELISA de competição (cELISA) baseia-se na ligação de anticorpos monoclonais específicos dirigidos aos domínios variáveis 1 e 2 da MOMP, que é inibida pela presença de anticorpos séricos. Esta inibição depende em grande parte da quantidade e afinidade dos anticorpos séricos que irão competir com os monoclonais, que podem reconhecer epítomos lineares e conformacionais na MOMP (Vretou *et al.*, 2001). Uma avaliação recente do teste utilizando soros de referência e um “cut-off” a 50% de inibição, permitiu estimar uma especificidade de 98,1% e uma sensibilidade de 77,7% para o teste de cELISA (Vretou *et al.*, 2007). O teste mostrou-se adequado para um estudo em larga-escala que abrangeu 76% da população de ovinos da Suíça que, recorrendo a “pools” de soros e métodos estatísticos sofisticados, permitiu estimar a prevalência da infeção no país. Os resultados do rastreio sorológico demonstraram uma boa correlação com a incidência de abortos (Borel *et al.*, 2004). Um recente estudo de campo comparou os títulos de anticorpos entre animais com infeção latente, animais doentes e animais vacinados, durante um período de dois anos consecutivos (Gerber *et al.*, 2007). As principais conclusões desse estudo são as seguintes: os títulos de anticorpos anti-MOMP não baixaram significativamente durante o período em estudo, em nenhum dos grupos, confirmando resultados anteriormente obtidos (Papp *et al.*, 1994); os títulos

de anticorpos anti-MOMP provocados pela vacinação com uma vacina viva foram variáveis, bem como os títulos de anticorpos observados em animais naturalmente infetados (Gerber *et al.*, 2007). Além disso, o estudo sublinhou a necessidade do desenvolvimento de testes capazes de distinguir animais infetados de animais vacinados (Gerber *et al.*, 2007).

### **1.7.2.3. Testes baseados nos POMP**

Com a descoberta da família multigénica codificadora de proteínas de 90 kDa em 1996, verificou-se que estas proteínas altamente imunorreativas e bastante complexas do ponto de vista antigénico, incluíam epítomos presentes nas espécies de *Chlamydomphila*. Com base nesta constatação, foram então desenvolvidos vários testes de cELISA (Sachse *et al.*, 2009).

Num recente estudo comparativo de 6 testes sorológicos distintos, os dois testes de ELISA com base no rOMP90 provaram ser os mais específicos e sensíveis (Wilson *et al.*, 2009). O teste ELISA rOMP90-3 apresentou uma sensibilidade de 96,8%, e não ocorreram reações cruzadas em animais infetados por *C. pecorum* (100% especificidade). Os anticorpos dirigidos contra as proteínas da família POMP apareceram mais cedo do que os anticorpos anti-MOMP, tanto na infeção experimental de ovinos gestantes, como após hiperimunização no rato (Vretou *et al.*, 1996; Livingstone *et al.*, 2005). Além disso, a resposta anti-POMP foi elevada e excedeu a resposta anti-MOMP em animais com um parto normal (Livingstone *et al.*, 2005). Esta observação sugere que a infeção dos ovinos por *C. abortus* pode ser detetada sorologicamente antes da manifestação da doença, porém, são necessários mais estudos para confirmar esta hipótese (Sachse *et al.*, 2009).

## **1.7.3. Métodos de amplificação de DNA**

### **1.7.3.1. PCR convencional**

A utilização de métodos moleculares na deteção de *Chlamydiae*, particularmente a utilização do PCR, melhorou significativamente o diagnóstico da doença, permitindo uma análise rápida e específica, bem como a diferenciação de diferentes espécies e a sua identificação direta em amostras clínicas (Sachse *et al.*, 2009).

A maioria dos protocolos de PCR convencional publicados têm como alvo o operão de RNA ribossómico (Messmer *et al.*, 1997; Everett *et al.*, 1999) ou o gene *ompA* (Kaltenboeck *et*

*al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1998). Este último codifica as MOMP e possui quatro domínios variáveis (VDs), cada um deles flanqueado por uma região conservada. Enquanto os determinantes antigénicos específicos do género e da espécie estão codificados pelas regiões conservadas, os segmentos específicos de cada serovar estão localizados nos domínios variáveis, principalmente em VD2 e VD4. Esta estrutura heterogénea primária torna o gene *ompA* o alvo ideal para o diagnóstico por PCR, bem como para os testes de diferenciação intraespecíficos (Pantchev *et al.*, 2009; Sachse *et al.*, 2009).

Estão descritos na literatura diversos protocolos de PCR. No ano 2000, foi validado um ensaio para a deteção de *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae* e *Chlamydia psittaci* (antiga nomenclatura), executado em modo triplex (Madico *et al.*, 2000). Em 2001 foi proposto um sistema de PCR cujo alvo era o gene *ompB*, o qual inicialmente originava um produto específico da família, e, após clivagem por enzimas de restrição, conseguia identificar a maioria das espécies de clamídias, de acordo com a classificação revista (Hartley *et al.*, 2001). Em 2003, foi descrito um teste otimizado de “nested PCR” para *Chlamydiaceae* (Sachse e Hotzel, 2003). A primeira amplificação origina um produto *Chlamydiaceae*-específico, que irá servir como molde na segunda amplificação, onde são utilizados “primers” específicos para cada espécie. Este teste foi considerado válido para uso na rotina laboratorial, sendo o mais sensível quando comparado com outros protocolos. Contudo, o facto de os “primers” terem sido desenhados com base na tradicional classificação de quatro espécies, tornou-se uma importante limitação da técnica (Sachse *et al.*, 2009). Foi proposto um teste de PCR para identificação das estirpes de *C. psittaci* (antiga classificação), que foi utilizado para identificar clamídias em aves e ovinos. Notavelmente, este teste tinha como alvo o locus *pmp* e demonstrou possuir uma sensibilidade superior a outros testes PCR baseados no gene *ompA* ou no espaço intergénico 16S-23S (Laroucau *et al.*, 2007).

À medida que o número de testes PCR para clamídias ou outros microrganismos aumenta, podem surgir dúvidas acerca da validação dos protocolos. A utilização de protocolos mal validados, ou mesmo não validados, pode conduzir à origem de resultados inválidos. Esta temática foi abordada num recente artigo de revisão (Apfalter *et al.*, 2005). Os autores salientaram que os procedimentos pré-analíticos, preparação de amostras e extração de DNA, a conceção do ensaio e das instalações, bem como a interpretação e confirmação dos resultados devem ser cuidadosamente avaliados, de modo a garantir a sua validade.

### 1.7.3.2. PCR em tempo real

Enquanto o PCR convencional apenas consegue confirmar a presença ou ausência de um determinado agente, o PCR em tempo real (PCRrt), adicionalmente, permite quantificar o genoma do microrganismo presente na amostra. A acumulação de produto amplificado é monitorizada pela medição do sinal fluorescente originado por digestão de uma sonda fluorogénica (Livak *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 1996). Uma importante vantagem do PCR em tempo real é que este não requer manipulação da amostra após a amplificação, o que dificulta potenciais contaminações e proporciona resultados mais rápidos e válidos (Sachse *et al.*, 2009).

A possibilidade de quantificação representa a eliminação da principal desvantagem do PCR convencional, no qual a amplificação logarítmica está limitada apenas a um determinado número de ciclos. Esta fase de amplificação logarítmica é caracterizada pelo aumento logarítmico dos produtos de amplificação após cada ciclo e é seguida de um patamar onde o aumento na produção se torna cada vez menos íngreme. Enquanto o PCR convencional é geralmente efetuado até ao patamar (35-50 ciclos) para produzir altas quantidades de produtos amplificados, o PCRrt quantitativo baseia-se nas medições efetuadas na fase de crescimento logarítmico. Os sinais fluorescentes são gerados por ligação específica a moléculas de um corante - SYBR Green I - à dupla cadeia DNA (Wittwer *et al.*, 1997) ou a sondas de hibridização marcadas com fluorocromos (Livak *et al.*, 1995). Como a leitura da fluorescência pode ser correlacionada com o número inicial de cópias do gene alvo, pode efetuar-se a estimativa do número de células microbianas presentes na amostra. Na prática, a concentração de DNA é calculada a partir do número de ciclos de amplificação necessário para originar o sinal fluorescente de um determinado limiar de intensidade (Sachse *et al.*, 2009).

Ao contrário dos testes de PCR convencionais previamente descritos, a maioria dos testes de PCRrt têm como alvo o gene 23S rRNA. Diversas metodologias têm sido validadas e utilizadas na rotina laboratorial (Everett *et al.*, 1999; DeGraves *et al.*, 2003; Ehricht *et al.*, 2006). O limite de deteção foi descritos como sendo de uma única cópia de DNA alvo. No entanto, Ehricht e colaboradores (2006) salientam que o limite de deteção está dependente da integridade do DNA alvo. Em alguns casos, o processo de extração do DNA da amostra clínica poderá causar ruturas na cadeia e conseqüente degradação parcial dos ácidos nucleicos, o que requer um número superior de cópias alvo para assegurar a reprodutibilidade do teste (Sachse *et al.*, 2009).

#### 1.7.4. “Microarrays” de DNA

À medida que os testes de diagnóstico se têm estendido a um número maior de microrganismos, e com a atual disponibilidade de tecnologia sofisticada, tem-se assistido ao aparecimento de novas metodologias capazes de fornecer informações adicionais sobre os agentes em estudo. Em muitos casos, a mera identificação das espécies envolvidas não será suficiente, sendo necessária informação adicional sobre subespécies, serótipos, genótipos, toxinas e outros fatores de virulência. Sempre que são necessários dados multidimensionais acerca do microrganismo presente na amostra, tornam-se óbvias as limitações dos testes de PCR. A detecção de diferenças subtis entre estirpes, tais como polimorfismos num nucleótido e outras variações intraespecíficas, torna-se difícil recorrendo a testes padrão de amplificação, pois apenas algumas regiões alvo podem ser analisadas em paralelo (Sachse *et al.*, 2009).

A tecnologia dos “microarrays” abriu novas possibilidades particularmente benéficas para o diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas. A sua abordagem paralela permite que as amostras de DNA sejam simultaneamente analisadas por um grande número de provas, que podem ser derivadas de um segmento genético polimórfico e/ou de diferentes regiões do genoma. Essencialmente, um teste de hibridação específico “microarray” é equivalente à sequenciação do respetivo local genómico. Assim, os “microarrays” de DNA podem alcançar uma discriminação entre amostras superior à conseguida com o PCR (Sachse *et al.*, 2009).

Apesar de os “microarrays” se terem tornado amplamente aceites pela comunidade científica como ferramentas para a monitorização da expressão do mRNA na análise de transcrição genética, a sua utilização no diagnóstico de bactérias e agentes patogénicos virais é ainda emergente (Sachse *et al.*, 2009).

### 1.8. Tratamento

Quando se suspeita de um surto de AEO numa exploração, deve administrar-se oxitetraciclina de longa ação às fêmeas gestantes, na dose de 20mg/kg, por via intramuscular, de modo diminuir a ocorrência de aborto (Aitken *et al.*, 1982). O tratamento deverá ser administrado após o dia 95-100 de gestação, altura em que começam as primeiras alterações patológicas na placenta causadas pelo agente (Buxton *et al.*, 1990). Sendo o objetivo do tratamento suprimir a multiplicação do microrganismo, devem administrar-se doses adicionais de antibiótico de duas em duas semanas, até ao momento do parto. Apesar de se reduzir a

quantidade de bactérias libertadas para o ambiente, este tratamento não erradica a infeção nem consegue reverter as lesões placentárias presentes em infeções muito avançadas. Portanto, algumas ovelhas poderão continuar a abortar ou produzir cordeiros fracos ou inviáveis e a libertar *C. abortus* nas secreções vaginais. Por este motivo, o tratamento antibiótico não deverá ser utilizado por rotina para controlar a infeção, mas sim estar reservado para circunstâncias excepcionais. A alternativa preferencial é controlar a infeção através do correto maneio e da vacinação (Longbottom e Coulter, 2003; Woldehiwet, 2006).

### 1.9. Controlo e Prevenção

Após o aborto, as ovelhas devem ser imediatamente isoladas. Durante a época de partos, deve assegurar-se a identificação e isolamento de todos os animais que evidenciaram sinais clínicos compatíveis com AEO. Todos os cordeiros mortos, placentas e camas dos animais devem ser eliminados com segurança, e as baias de parição limpas e desinfetadas, para limitar o risco de disseminação da infeção. É essencial uma boa assepsia das mãos após o contacto com material infeccioso, particularmente antes de cuidar de outros animais (Longbottom e Coulter, 2003).

O principal objetivo do maneio consiste em evitar a introdução do agente na exploração, mantendo-a “fechada” ou introduzindo animais de reposição de explorações comprovadamente livres de *C. abortus* (Entrican *et al.*, 2001). Quando existem dúvidas acerca da condição de animais a introduzir, estes devem ser vacinados antes da sua entrada na exploração. Se a infeção já foi previamente diagnosticada numa exploração, os animais devem ser vacinados antes da época reprodutiva, e fazer o reforço da vacinação após 3 anos, ou mais cedo se a exploração estiver gravemente afetada (Longbottom e Coulter, 2003).

A estratégia mais eficaz para o controlo das infeções causadas pelas espécies de *Chlamydia* e *Chlamydophila* baseia-se no desenvolvimento de vacinas. Estão disponíveis vacinas inativadas e atenuadas, e ambas proporcionam um grau de proteção aceitável, reduzindo também a quantidade de bactérias libertadas para o ambiente (Woldehiwet, 2006).

As vacinas inativadas podem ser preparadas promovendo a multiplicação do microrganismo em ovo embrionado de galinha ou em cultura celular. As vacinas atenuadas são produzidas com estirpes obtidas por mutagénese química, que origina mutantes sensíveis à temperatura, que crescem a 35°C mas não a 39,5°C. Como as estirpes vacinais se multiplicam de uma forma semelhante à que ocorre na infeção natural, originam uma resposta imunitária celular

e humoral (Woldehiwet, 2006). Rocchi e colaboradores (2009) estudaram a resposta celular face aos CEs de *C. abortus* em ovelhas previamente imunizadas com Enzovax® (vacina atenuada). Os autores descrevem que é possível estimular a proliferação celular induzida pelo antígeno e a produção de IFN- $\gamma$  pelas células mononucleadas de sangue periférico das ovelhas vacinadas. Esta condição mimetiza a resposta imunitária das ovelhas pós-abortadas, reforçando o conceito de que o IFN- $\gamma$  está fortemente correlacionado com a proteção contra o AEO (Rocchi *et al.*, 2009).

As ovelhas saudáveis e as infetadas mas não gestantes podem ser vacinadas com qualquer uma destas apresentações em qualquer época do ano, até 4 semanas antes do acasalamento. A vacina atenuada não poderá ser administrada a animais submetidos a tratamento com antibióticos, particularmente tetraciclina (Longbottom e Coulter, 2003).

O operador deverá tomar precauções no manuseamento e administração destas vacinas. Os organismos inativados são incorporados em vacinas com adjuvante oleoso, que pode induzir uma inflamação grave no local de injeção no animal, e são também um risco para o operador em caso de injeção acidental. A vacina viva deverá ser manuseada apenas com luvas, e nunca por mulheres grávidas ou imunodeprimidas, pois poderá causar infeção e aborto (Longbottom e Coulter, 2003).

Nas últimas décadas fizeram-se muitos progressos na identificação dos componentes bacterianos antigénicos mais importantes destes microrganismos intracelulares. Vários estudos demonstraram que as MOMP são as principais estimulantes da resposta imunitária humoral em animais e humanos. Contudo, as vacinas baseadas nos complexos membranares externos contendo MOMP, eram apenas parcialmente protetoras (Woldehiwet, 2006), principalmente devido a estas proteínas estruturais não estimularem significativamente a imunidade mediada por células, que tem um papel preponderante nas infeções causadas por bactérias intracelulares. Diversos estudos em humanos e animais mostraram que as células CD4+ “T-helper” tipo 1 e as suas citocinas, tais como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são importantes no desenvolvimento de uma imunidade eficaz (Igietseme *et al.*, 2000).

As vacinas obtidas por via recombinantes são geralmente menos imunogénicas quando comparadas com as vacinas inativadas e vacinas atenuadas (Petrovsky e Aguilar, 2004). Contudo, a utilização de adjuvantes e outros imunomoduladores são ferramentas com potencial para aumentar a sua eficácia (Woldehiwet, 2006).

Recentemente têm sido desenvolvidas vacinas de DNA eficazes no controlo de algumas doenças provocadas por *Chlamydiae* (Woldehiwet, 2006). A compreensão das bases celulares e

moleculares da imunidade anti-clamídia e a disponibilidade de informação acerca da natureza das principais proteínas imunogênicas e respectivos genes permitirão novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes (Woldehiwet, 2006).

### **1.10. Potencial zoonótico de *C. abortus***

Foram detetados casos esporádicos de doença respiratória em trabalhadores de laboratório, operários de matadouro e de fábricas produtoras de vacinas, que manusearam *C. abortus*. Contudo, aparentemente, os agricultores e proprietários de explorações infetadas não desenvolvem sintomas respiratórios associados (Longbottom e Coulter, 2003).

Em contrapartida, os rebanhos infetados na época de partos constituem um fator de elevado risco para mulheres grávidas, devido à capacidade de *C. abortus* colonizar a placenta humana. Desde os anos 50 que começou a suspeitar-se de uma possível relação entre os casos de aborto em pequenos ruminantes provocados por *Chlamydophila abortus* (na época designado *Chlamydia psittaci* serovar 1) e alguns casos de aborto espontâneo em mulheres grávidas, mas essa relação só foi descrita em 1967 (Roberts *et al.*, 1967).

Entre os anos 1987 e 2000 foram descritos 20 casos de aborto provocados por *C. abortus*, e todos relatam um contacto prévio com pequenos ruminantes (Hyde e Benirschke, 1997; Feist *et al.*, 1999). Nos casos descritos, os principais sinais clínicos são inespecíficos, tais como febre, dor de cabeça, vômitos e tonturas. Se não forem tratadas adequadamente, as pacientes poderão desenvolver septicemia com coagulação intravascular disseminada. O aborto espontâneo ocorre pouco tempo após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos, e nos casos descritos, ocorreu após as 14 semanas de gravidez. A bactéria replica-se no interior do epitélio do trofoblasto, conduzindo a uma disfunção placentária e morte fetal (Pospischil *et al.*, 2002). Assim, as mulheres grávidas devem ser aconselhadas a evitar o contacto com pequenos ruminantes na época de partos, e com qualquer produto resultante de aborto. As mulheres grávidas que desenvolvam febre ou outros sintomas não-específicos, devem ser hospitalizadas tendo em conta uma possível infeção por *C. abortus* (Pospischil *et al.*, 2002).

Têm sido descritas infecções zoonóticas por *C. abortus*, provenientes de diversas espécies animais (Longbottom e Coulter, 2003).

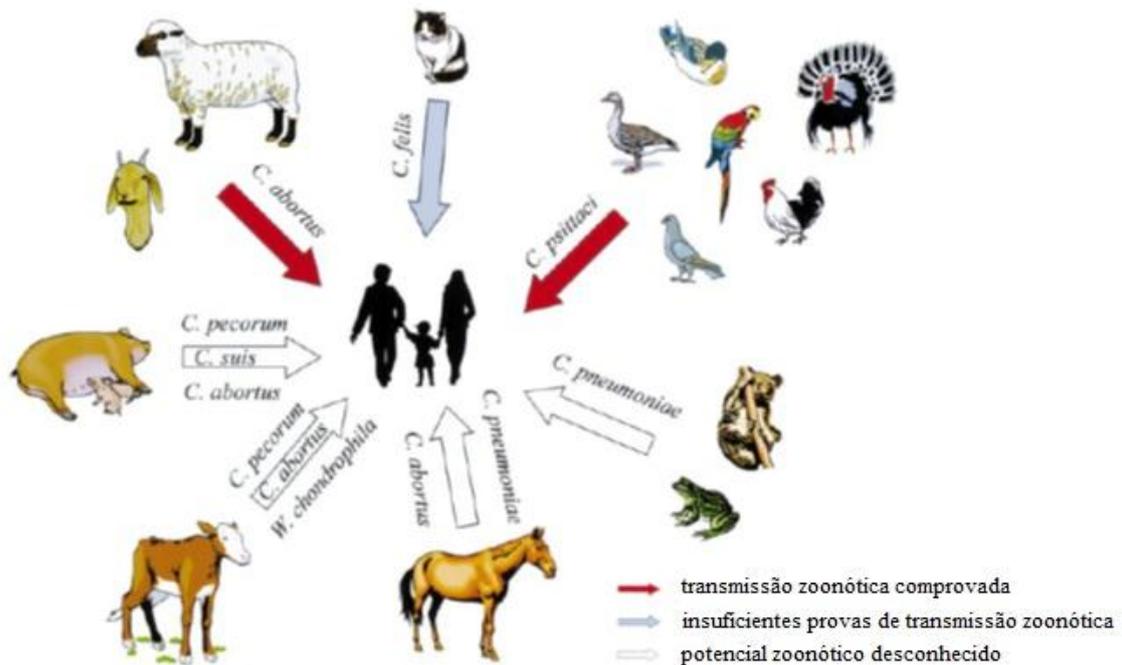


Figura 6 - Potencial zoonótico de *Chlamydiae*. Adaptado de Longbottom e Coulter, 2003

## 2. Pesquisa de *Chlamydophila abortus* por PCR em ovinos Serra da Estrela após aborto

O presente estágio curricular foi desenvolvido em cooperação com as Brigadas Sanitárias da ANCOSE - Associação Nacional de Criadores de Ovinos Serra da Estrela.

**Período:** 4 de Julho a 30 de Agosto de 2011

**Objetivo:** Avaliar a importância relativa da clamidiose nos casos de aborto declarado nos ovinos da região, através da técnica de PCR.

### 2.1. Instituição de acolhimento e Área geográfica do estudo

A ANCOSE, fundada em 1981 por um grupo de criadores, teve como principais objetivos o melhoramento e defesa da raça ovina Serra da Estrela. Desde 1988 que a Associação é detentora de uma estrutura interna responsável pela execução no terreno de campanhas de erradicação de várias doenças, bem como de um vasto conjunto de medidas de profilaxia, educação sanitária e bem-estar animal, com vista à melhoria do rendimento das explorações (ANCOSE, 2001).

A campanha de luta contra a Brucelose dos Pequenos Ruminantes, assumiu-se desde o início como a principal batalha a travar, pois além de se tratar de uma zoonose com importantes consequências na Saúde Pública da região, é uma doença que afeta gravemente os efetivos ovinos e caprinos, com implicações diretas na rentabilidade das explorações (ANCOSE, 2001).

A ação desta OPP (Organização de Produtores Pecuários) engloba atualmente doze concelhos: Fornos de Algodres, Celorico da Beira, Gouveia e Seia, que reportam à Direção Regional de Agricultura da Beira Interior, e Oliveira do Hospital, Tábua, Arganil, Góis, Pampilhosa da Serra, Nelas, Mangualde e Carregal do Sal – Direção Regional de Agricultura da Beira Litoral (Esteves, 2010).



Figura 7 - Distribuição dos principais efetivos da raça Bordaleira Serra da Estrela. Adaptado da Sociedade Portuguesa de Ovinos e Caprinos

## **2.2. A Região**

O presente trabalho foi desenvolvido na região Centro de Portugal, uma área geográfica dominada pela imponência da Serra da Estrela, a mais importante montanha de Portugal Continental.

A produção ovina é uma das principais atividades pecuárias do nosso país, sendo em muitas regiões uma importante fonte de subsistência. A região da Serra da Estrela é uma dessas zonas, em que o potencial da raça ovina autóctone associado a um dos melhores queijos de montanha da Europa, contribui decisivamente para a fixação da população nesta região, onde a indústria dos laticínios assume uma particular importância na criação de postos de trabalho diretos e indiretos (Esteves, 2010).

## **2.3. Efetivos pecuários**

A ovelha Serra da Estrela é explorada quase exclusivamente na vertente leiteira, em regime semiextensivo. O seu manejo alimentar é conseguido através do recurso a pastagens espontâneas e melhoradas, forragens e alimento concentrado, durante a época de lactação (Cabral *et al.*, 2004).

A maioria das explorações é do tipo familiar, em áreas geralmente pequenas, sendo os seus efetivos de dimensão bastante variada, como é típico da região Mediterrânea (Carolino *et al.*, 2003). Segundo Borrego (1985), em 1980, o efetivo ovino Serra da Estrela seria constituído por 275.654 animais, verificando-se desde então um constante decréscimo, particularmente acentuado nas duas últimas décadas, para cerca de 75.000 animais (Dinis, 2009). A desertificação do interior associada às dificuldades inerentes à atividade, são apenas alguns dos fatores que contribuem para a crescente diminuição do efetivo autóctone (Esteves, 2010).

Nos últimos anos, tem-se assistido à introdução crescente de efetivos de outras raças que ameaçam alterar significativamente o mapa populacional desta região. Na maioria das situações, os produtores adquirem machos de raças Assaf ou Lacaune, que inserem em efetivos de fêmeas Serra da Estrela, resultando em cruzamentos que em poucas gerações poderão pôr em causa a sobrevivência da raça autóctone, e desvirtuar o Queijo Serra da Estrela (Esteves, 2010).

## 2.4. Estrutura agrária e Sistemas de produção

A estrutura de produção na Região da Serra da Estrela é francamente minifundiária, estando a grande maioria da produção assente em pequenas explorações. A maioria dos produtores corresponde a uma população envelhecida, com baixo nível de instrução académica, cuja aprendizagem se baseou em conhecimentos empíricos, muitos passados de geração em geração. O número de produtores que abandonam a atividade não é suficientemente compensado pelos jovens agricultores que ingressam na atividade (Cabral *et al.*, 2004).

As principais justificações para o reduzido número de cabeças por exploração baseiam-se na estrutura agrária de pequenas dimensões, com parcelas muito reduzidas, e na escassez de mão-de-obra para a elaboração do queijo e condução do rebanho. Muitas explorações apresentam também muitas deficiências a nível estrutural, com reflexo nas condições higiossanitárias. No entanto, tem-se vindo a registar uma crescente melhoria nas condições de exploração, nomeadamente no que diz respeito ao nível da edificação dos ovis, e à instalação de salas de ordenha mecanizadas (Esteves, 2009).

O manejo alimentar baseia-se em produções forrageiras próprias ou arrendadas, bem como em subprodutos de cultivo, complementando-se com um importante recurso a matos, sob cobertos de floresta e baldios. A utilização de concentrados comerciais é, em média, baixa e restrita às épocas de maiores necessidades nutritivas dos animais (lactação), o que revela o predomínio dos esquemas tradicionais extensivos, com bastante pastoreio de percurso, mas poucos prados instalados. A escassez de recursos forrageiros implica que a transumância de Verão ainda tenha alguma expressão (Cabral *et al.*, 2004).

O período de atividade sexual decorre durante todo o ano mas em regra a época principal de cobrição decorre entre Abril e Junho, havendo outra época complementar em Setembro e Outubro, para as malatas e as ovelhas vazias da época anterior (Barbas *et al.*, 1998).

O manejo reprodutivo tradicional está orientado fundamentalmente para parições outonais, visando o fabrico do queijo durante o Inverno. No entanto, a melhoria das condições de fabrico do queijo tem conduzido ao aparecimento gradual de explorações que optam por duas épocas de cobrição (Esteves, 2010).

## 2.5. Raça

A ovelha Serra da Estrela é uma das raças portuguesas mais produtivas, sendo explorada nas suas duas variedades: branca e preta. A variedade preta constitui cerca de 10% do efetivo total (Borrego, 1985).

Das suas características consagradas no Livro Genealógico, destacam-se os olhos grandes e expressivos, os cornos em ambos os sexos e enrolados em espiral, e nas fêmeas o úbere de forma globosa, desenvolvido, com sulco mediano evidente, e tetos grandes e bem implantados (Esteves, 2010).



Figura 8 - Exemplar da raça Bordaleira Serra da Estrela - variedade branca. Foto do autor.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais

Neste estudo foram colhidas amostras aos ovinos recentemente abortados, até um período máximo de 14 dias após o aborto. A área geográfica limitou-se à zona de ação da ANCOSE.

Foram colhidas um total de vinte amostras – Anexo I.

#### 3.2. Caracterização da amostra

Todas as amostras foram obtidas em animais da raça Bordaleira Serra da Estrela.

A temperatura corporal registada encontra-se no intervalo de 38,2 a 40,0°C (valor médio 38,92°C).

O tempo decorrido entre o aborto e a data de colheita da amostra foi de 1 a 13 dias.

As amostras são provenientes de explorações com estatuto sanitário B3 e B4.

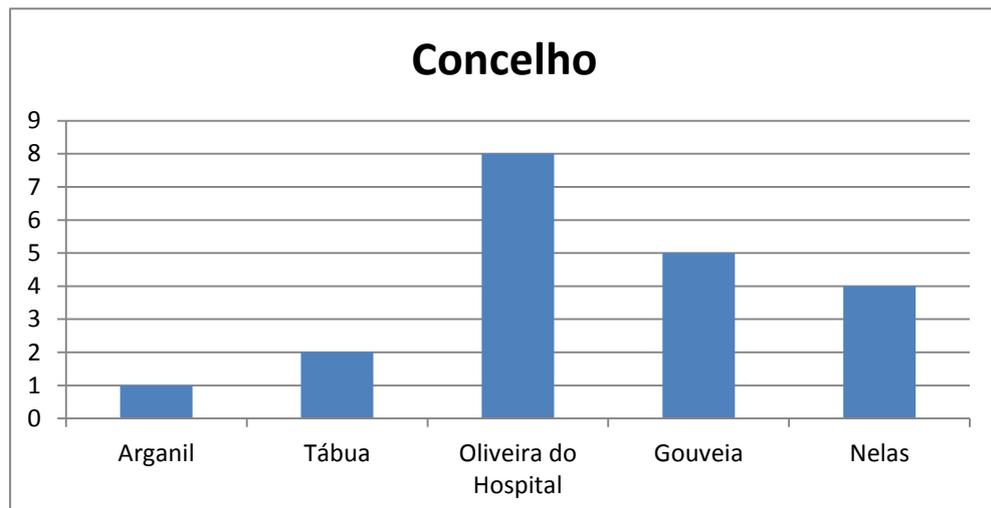


Gráfico 1 - Número de amostras colhidas por concelho

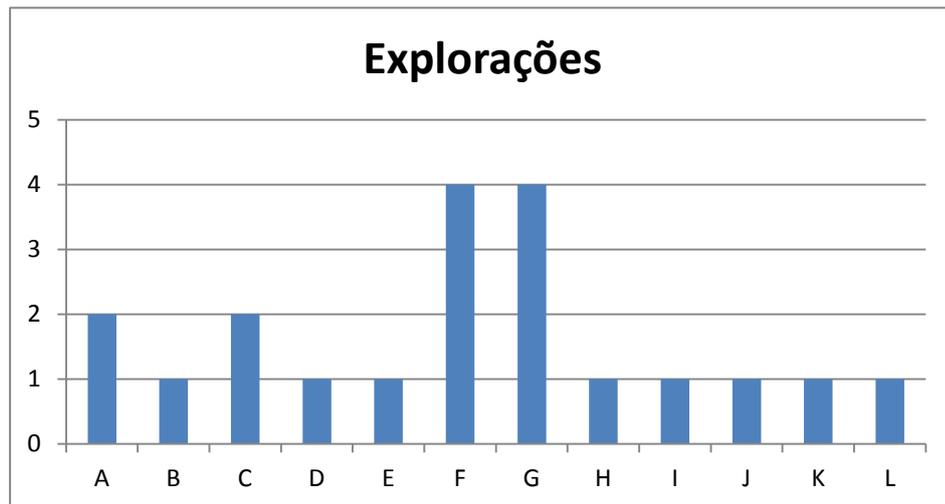


Gráfico 2 - Número de amostras colhidas por exploração

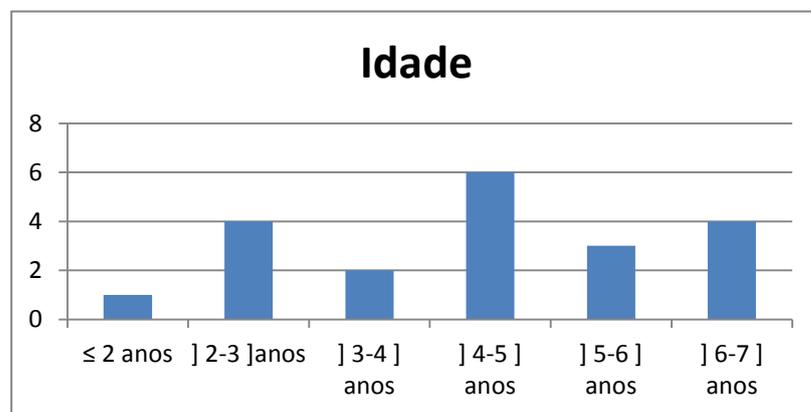


Gráfico 3 - Distribuição etária da população em estudo

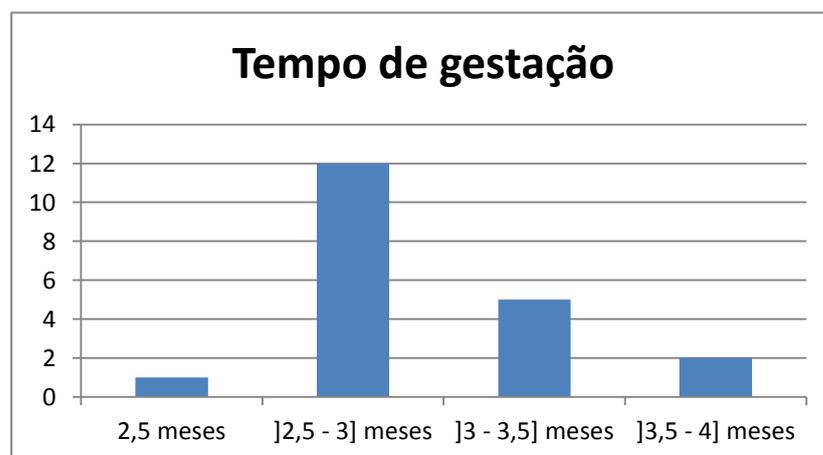


Gráfico 4 - Tempo estimado de gestação no momento do aborto

### 3.3. Colheita e armazenamento das amostras

As amostras foram colhidas por zangaratoa vaginal. Seguidamente, foram inseridas em tubo estéril seco, e armazenadas a -20°C até posterior análise no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Veterinárias da UTAD.

### 3.4. Protocolo experimental

Adicionou-se 400µl de tampão fosfato (pH 7,2) aos tubos e, após homogeneização, retirou-se 200 µl para extração dos ácidos nucleicos.

O DNA foi extraído recorrendo ao “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche®), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante – ANEXO II.

Como controlo positivo, foi extraído o DNA de 50 µl de vacina Bedsa-Vac (Fort Dodge®), segundo o mesmo protocolo.

### 3.5. “Primers”

Foram selecionados os oligonucleótidos descritos por Panchev e colaboradores (2009), que têm como alvo o gene *ompA*, resultando um fragmento com 82 pb.

Sequência dos “primers” utilizados:

CpaOMP1-F            5' GCAACTGACACTAAGTCGGCTACA 3'

CpaOMP1-R            5' ACAAGCATGTTCAATCGATAAGAGA 3'

Os “primers” foram elaborados pela empresa STAB VIDA. Previamente, foram testados na Plataforma BLAST® (“Basic Local Alignment Search Tool”) onde a sua especificidade foi comprovada.

### 3.6. PCR

As reações de amplificação ocorreram em termociclador (T Personal, Biometra®) tendo em conta as precauções inerentes à realização da técnica, como sejam a utilização de compartimentos e pipetas automáticas diferentes para a extração de DNA, a mistura dos reagentes, a colocação das amostras e a eletroforese dos produtos de amplificação. Também não se descurou a utilização de pontas com filtro e luvas descartáveis, bem como de hipoclorito de sódio, com 2% de cloro livre, na limpeza das superfícies.

Foi seguido o protocolo descrito por Panchev e colaboradores (2009). Para a reação foram utilizados 12,5µl de SuperHot Master Mix (Bioron®) – Anexo III – 5µl da amostra, 0,5µl (25pmol) de cada “primer” e água ultrapura até perfazer um volume de 25µl.

Como controlo negativo foi utilizada água ultrapura.

As condições de amplificação foram: 94 °C – 15 min; 45 ciclos de 94 °C – 15 seg, 60 °C – 15 seg, 72 °C – 45 seg; extensão final, 72 °C - 3 min.

Não foi efetuada a sequenciação dos produtos de amplificação.

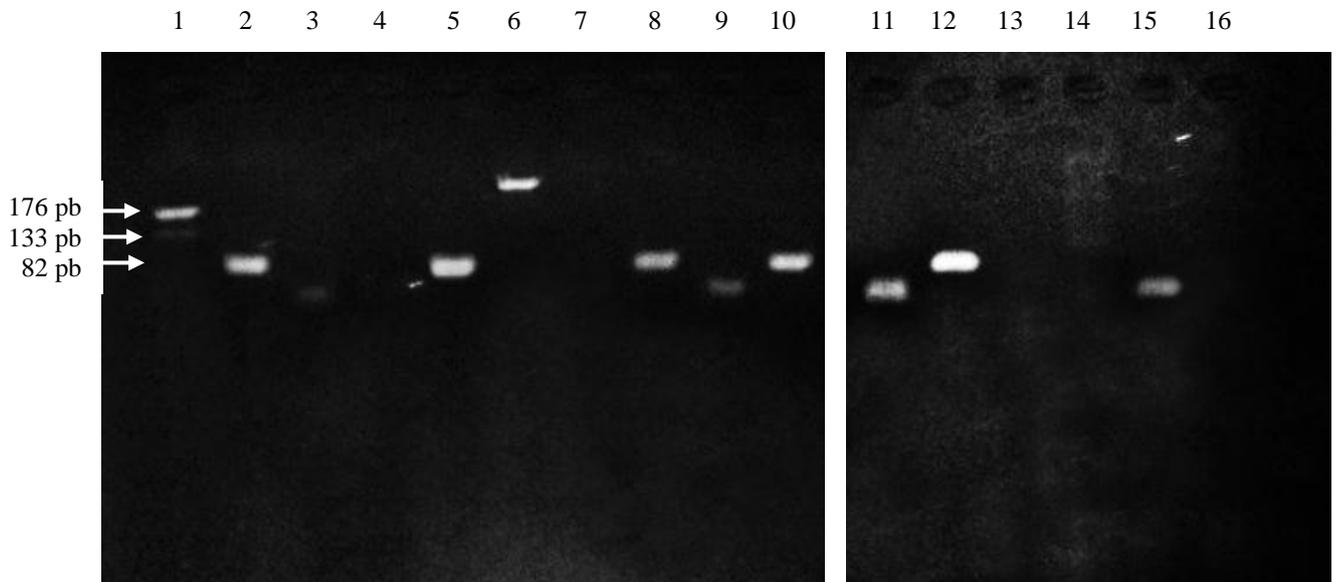
### 3.7. Eletroforese

A visualização dos produtos das amplificações foi feita após eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA), contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, em tina de eletroforese apropriada (Pharmacia®).

A eletroforese decorreu durante 1 hora a 85 V.

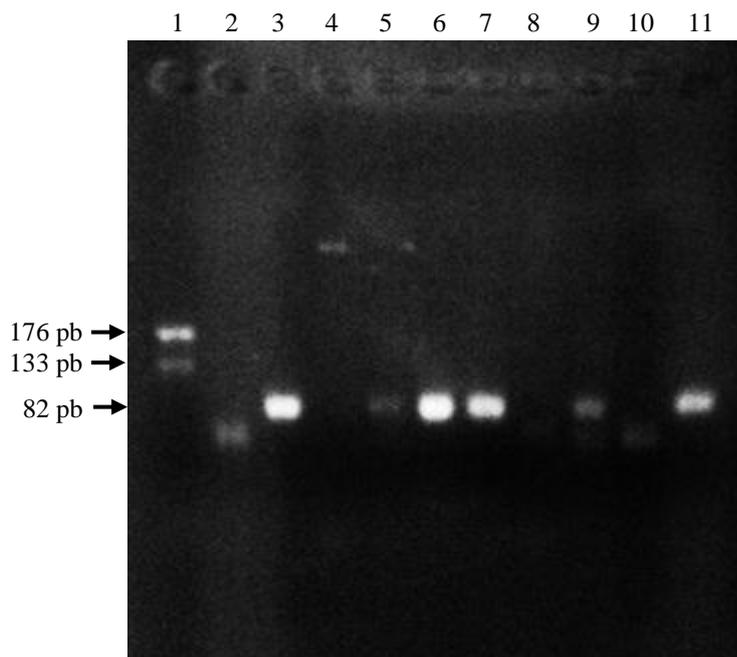
Registaram-se imagens, sob a ação de luz UV, com câmara fotográfica digital (FinePix ax250, Fujifilm®).

## 4. Resultados



**Legenda:**

- |                               |                       |
|-------------------------------|-----------------------|
| 1. Marcadores 176 pb e 133 pb | 9. Amostra 14         |
| 2. Controlo Positivo          | 10. Amostra 10 (+)    |
| 3. Amostra 1                  | 11. Amostra 4         |
| 4. Amostra 16                 | 12. Amostra 19 (+)    |
| 5. Amostra 18 (+)             | 13. Amostra 17        |
| 6. Amostra 5                  | 14. Amostra 12        |
| 7. Amostra 2                  | 15. Amostra 3         |
| 8. Amostra 7 (+)              | 16. Controlo Negativo |



**Legenda:**

- |                               |
|-------------------------------|
| 1. Marcadores 176 pb e 133 pb |
| 2. Amostra 3                  |
| 3. Amostra 11 (+)             |
| 4. Amostra 13                 |
| 5. Amostra 9 (+)              |
| 6. Controlo Positivo          |
| 7. Amostra 8 (+)              |
| 8. Amostra 15                 |
| 9. Amostra 6 (+)              |
| 10. Amostra 20                |
| 11. Controlo Positivo         |

Oito das 20 amostras (40%) revelaram uma banda nos 82 pb pelo que foram consideradas positivas. Estes 8 animais pertenciam a 5 explorações de um total de 12 em que foram colhidas amostras, localizadas nos concelhos de Oliveira do Hospital, Gouveia e Tábua. A caracterização dos animais onde as amostras positivas foram recolhidas encontra-se na tabela seguinte:

Tabela 2 - Caracterização das amostras positivas

<b>Identificação da amostra</b>	<b>Exploração</b>	<b>Concelho</b>	<b>Idade do animal</b>	<b>Tempo estimado de gestação</b>	<b>Dias após o aborto</b>	<b>Temperatura corporal</b>
6	D	Gouveia	7 anos	3 meses	12	38,9
7	E	Gouveia	2 anos	3 meses	13	39,2
8	F	Oliveira do Hospital	5 anos	3 meses	1	38,8
9	F	Oliveira do Hospital	3 anos	3 meses	6	38,2
10	F	Oliveira do Hospital	5 anos	4 meses	5	39,1
11	F	Oliveira do Hospital	3 anos	3 meses	3	38,5
18	J	Gouveia	3 anos	4 meses	8	38,8
19	K	Tábua	3 anos	3,5 meses	4	39,3

No exame físico dos animais abortados na exploração F verificou-se a presença de corrimentos vaginais sanguinolentos:

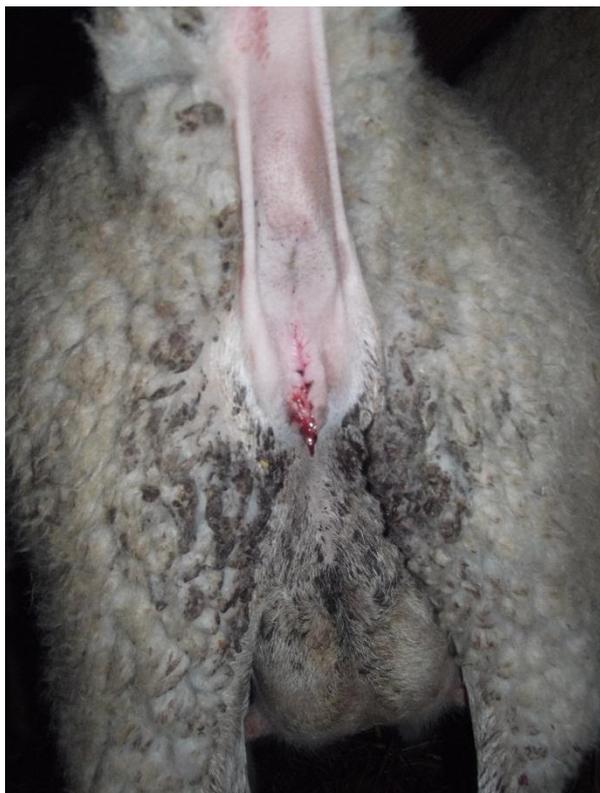


Figura 9 - Corrimento vaginal (amostra 8).  
Foto do autor



Figura 10 - Corrimento vaginal (amostra 9).  
Foto do autor

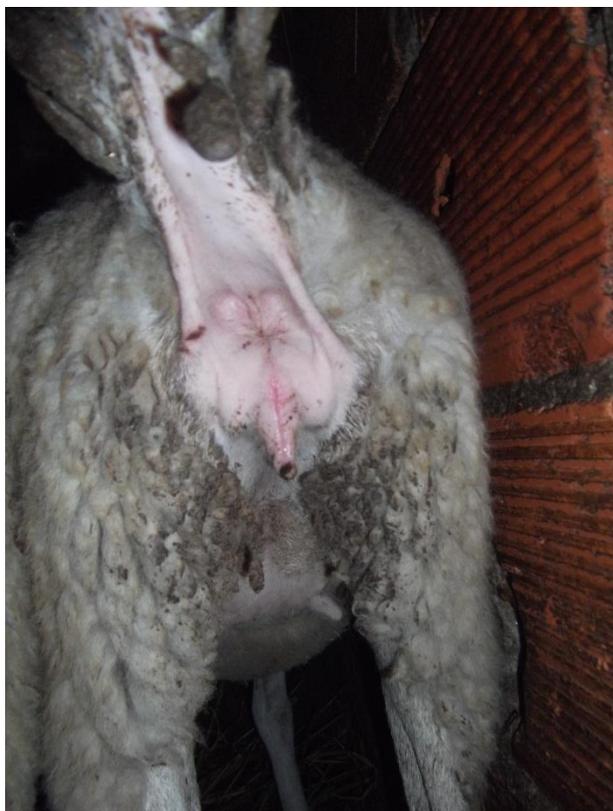


Figura 11 - Corrimento vaginal (amostra 10).  
Foto do autor



Figura 12 - Corrimento vaginal (amostra 11).  
Foto do autor

## 5. Discussão

*Chlamydophila abortus* pode ser detetada diretamente na placenta, órgãos fetais e excreção vaginal até 14 dias após o aborto, através de cultura em ovo embrionado ou cultura de células, imunofluorescência direta, imunohistoquímica, ELISA e testes de detecção de DNA (Storz *et al.*, 1968; Johnson *et al.*, 1983; Mahony *et al.*, 1987; Brown e Newman, 1989; Dagnall e Wilshire, 1990; Griffiths *et al.*, 1992; Buxton *et al.*, 1996; Laroucau *et al.*, 2001). Apesar das diferenças significativas em termos de sensibilidade e especificidade, todas as técnicas são um recurso importante no diagnóstico do AEO (Sachse *et al.*, 2009).

A utilização do PCR revelou-se uma opção válida, não só pela elevada especificidade e sensibilidade, como também pela facilidade de colheita e manuseamento das amostras, e pela diminuição dos riscos zoonóticos associados à manipulação destes materiais. Foram selecionados os “primers” descritos por Pantchev e colaboradores (2009), tendo como alvo o gene *ompA*. Este é considerado o segmento mais promissor para uma distinção eficaz das espécies de *Chlamydiae*, quando analisadas por PCR (Pantchev *et al.*, 2009).

Apesar das limitações do PCR convencional quando comparado com o PCR em tempo real (Sachse *et al.*, 2009), não nos foi possível utilizar esta última metodologia. A impossibilidade de quantificar o material genético (e indiretamente o número de microrganismos presente na amostra) obriga a precauções adicionais na análise dos resultados, uma vez que um resultado positivo apenas indica a presença do microrganismo nos corrimentos vaginais. Apesar de o quadro clínico ser compatível com AEO, não pode contudo afirmar-se que o aborto foi causado por *Chlamydophila abortus*, pois também não evidenciámos as lesões placentárias características provocadas por este agente. Além disso, não foram realizados testes para pesquisa de outros agentes infecciosos potencialmente causadores de aborto.

O reduzido número de amostras poderá ter resultado do receio dos produtores declararem casos de aborto, associando possivelmente à infeção por *Brucella* spp, e conseqüente recolha dos animais. Talvez por este motivo, alguns produtores ignoraram este tema, mesmo sabendo tratar-se de um estudo gratuito e apenas com fins académicos. As explicações dadas pelos produtores na presença de casos de aborto fundamentavam-se sobretudo, e empiricamente, em causas ligadas ao regime alimentar e de maneio, não sendo geralmente por eles admitida a possibilidade da presença de agentes infecciosos como causa do aborto.

Os dados obtidos aquando da colheita de amostras serviram para complementar a informação da anamnese. A temperatura corporal dos animais foi registada, embora esses dados não devam ser submetidos a análise estatística, pois a comparabilidade não está assegurada.

Os resultados estão de acordo com a evidência clínica da presença de *C. abortus* na região, como causa frequente de aborto em ovinos, mas poucas vezes alvo de diagnóstico laboratorial devido a restrições económicas. Apesar do tamanho reduzido da amostra (n=20), a deteção do genoma da bactéria em 8 dos animais testados alerta-nos para a possibilidade de esta ser uma infeção frequente na região, e com um elevado impacto económico nas explorações. A percentagem obtida (40%) aproxima-se dos resultados de Chanton-Greutmann e colaboradores (2002) que analisaram um total de 86 amostras suspeitas de aborto infeccioso em ovinos, em duas épocas reprodutivas consecutivas, na Suíça. Os autores identificaram o agente em 39% dos ovinos testados, sendo a causa infecciosa de aborto mais frequente nos ovinos testados (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002). Em Portugal, os únicos dados encontrados acerca da infeção em ovinos relataram uma presença do agente em 26/59 (44%) dos animais testados, em amostras enviadas para o LNIV, ao longo de 4 estações reprodutivas consecutivas, provenientes das regiões de Trás-os-Montes, Beira Interior e Alentejo (Clemente *et al.*, 2011).

No grupo dos resultados positivos, observam-se 4 casos de abortos isolados, detetados nas explorações D, E, J e K, e 4 resultados positivos obtidos na exploração F. Nessa exploração, o produtor revelou a introdução de 11 animais adquiridos no ano 2010, de uma exploração com estatuto desconhecido relativamente à presença de *C. abortus*. De acordo com a epidemiologia da doença, esta introdução de animais poderá ter sido a porta de entrada do microrganismo na exploração, e que terá originado vários casos de aborto na estação reprodutiva seguinte (2011). Ocorreram 4 abortos em ovelhas das quais foram colhidas amostras positivas para *C. abortus*, tendo-se observado corrimentos vaginais sanguinolentos nos animais afetados. Além disso, o proprietário referiu a ocorrência de mais 3 abortos na mesma época reprodutiva, num total de 68 fêmeas que ficaram gestantes, indicando portanto uma percentagem de aborto de cerca de 10%. Relativamente à época reprodutiva de 2012, tudo decorreu com normalidade, sem casos de aborto a relatar.

O microrganismo foi identificado em 42% das explorações que notificaram a ocorrência de abortos, distribuídas pelos concelhos de Oliveira do Hospital, Gouveia e Tábua. A idade média das fêmeas no momento do aborto foi de 3,9 anos. O tempo médio de gestação foi de aproximadamente 3,3 meses, período que se encontra no limite inferior relatado pela maioria das fontes bibliográficas, que referem o último terço de gestação. Em alguns animais foram

observados corrimentos vaginais sanguinolentos, um sinal clínico compatível com AEO (Aitken e Longbottom, 2007).

Tendo em conta a metodologia utilizada, os resultados negativos apontam para outras causas de aborto, uma vez que não foi detetada *C. abortus* nas zaragatoas vaginais. Nestes casos seria útil a realização de análises para deteção de outros agentes infecciosos. Todas as explorações em que se efetuaram colheitas possuíam estatuto sanitário B3 ou B4, sendo portanto menos provável a ocorrência de abortos causados por *Brucella* spp. Contudo, seria importante afastar esta possibilidade uma vez que a deteção precoce desta afeção é uma importante medida para o seu controlo.

A técnica permitiu detetar *C. abortus* no período descrito na bibliografia como adequado para a colheita das amostras por zaragatoa vaginal, pois por exemplo as amostras 6 e 7, foram colhidas 12 e 13 dias após o aborto. Assim, confirma-se a utilidade da técnica mesmo após um período considerável de tempo após o aborto bem como a importância da excreção do agente por via vaginal.

## 6. Considerações finais

*Chlamydophila abortus* encontra-se muito bem adaptada aos seus hospedeiros, estabelecendo uma infecção subclínica persistente nas fêmeas não gestantes, e provocando aborto na fase final de gestação. Conseqüentemente, são libertados para o ambiente grandes quantidades de CEs infecciosos, não só na época do parto como em cios posteriores (Livingstone *et al.*, 2009; Rocchi *et al.*, 2009). Apesar de ainda permanecerem muitas questões relativas à patogenia, tais como o local de persistência do microrganismo, os conhecimentos atuais indicam que a prevenção da infecção placentária é a chave do sucesso (Rocchi *et al.*, 2009).

O método de PCR convencional permitiu-nos analisar de uma forma rápida e relativamente económica as amostras colhidas, e comprovar por métodos moleculares que o organismo está presente em várias explorações de ovinos na Região da Serra da Estrela.

No futuro, seria vantajoso o desenvolvimento de metodologias PCR (nomeadamente “PCR multiplex”) que permitam a deteção simultânea de vários agentes infecciosos potencialmente causadores de aborto em ovinos, e desta forma, reduzir os custos analíticos.

Em Portugal, até à data desta publicação não foram encontrados dados epidemiológicos acerca do papel das *Chlamydiaceae* na patologia reprodutiva dos animais de produção. Apesar de não poder excluir-se a presença de outros agentes potencialmente causadores de aborto, a frequência de deteção de *Chlamydophila abortus* no presente estudo, e os dados obtidos por Clemente e colaboradores (2011) sugerem que esta infecção tenha um papel importante no aborto dos ruminantes domésticos em Portugal.

No nosso país são necessários estudos epidemiológicos adicionais de forma a melhorar a performance reprodutiva dos ovinos e reduzir o risco de transmissão zoonótica do agente.

## 7. Referências bibliográficas

- Aitken, I.D., Robinson, G.W. and Anderson, I.E., "Long-acting oxytetracycline in the treatment of enzootic abortion in ewes." *Vet Rec*, 1982, 111(19): 445-446.
- Aitken, I.A., Longbottom, D. Chlamydial abortion. In: Aitken, I.D. (Ed.), *Disease of Sheep*. 4th edition. Blackwell Publishing, London, 2007 : 105–112.
- ANCOSE – Associação Nacional de Criadores de Ovinos Serra da Estrela. *Ancose: 20 anos*. Oliveira do Hospital, 2001: 23-39.
- Anderson, I.E., Baxter, S.I., Dunbar, S., Rae, A.G., Philips, H.L., Clarkson, M.J. and Herring, A.J., "Analyses of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*." *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46(1): 245-251.
- Apfalter, P., Reischl, U. and Hammerschlag, M.R., "In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results?" *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12): 5835-5841.
- Arck, P., Hansen, P.J., Mulac Jericevic, B., Piccinni, M.P. and Szekeres-Bartho, J., "Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress." *Am J Reprod Immunol*, 2007, 58(3): 268-279.
- Baker, J.A., "A Virus Obtained from a Pneumonia of Cats and Its Possible Relation to the Cause of Atypical Pneumonia in Man." *Science*, 1942, 96(2499): 475-476.
- Baker, J.A., "A Virus Causing Pneumonia in Cats and Producing Elementary Bodies." *J Exp Med*, 1944, 79(2): 159-172.
- Baldwin, C.L., Sathiyaseelan, T., Naiman, B., White, A.M., Brown, R., Blumerman, S., Rogers, A. and Black, S.J., "Activation of bovine peripheral blood gammadelta T cells for cell division and IFN-gamma production." *Vet Immunol Immunopathol*, 2002, 87(3-4): 251-259.
- Barbas, J. P., Mascarenhas, R., Baptista, C. Ribeiro, J., Efeito de duas técnicas de manejo reprodutivo (MND e IA) sobre os índices reprodutivos da ovelha Serra da Estrela. *Coletanea S. P. O*, 1998. C. 8(1): 231-247.
- Bettelli, E., Korn, T. and Kuchroo, V.K., "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." *Curr Opin Immunol*, 2007, 19(6): 652-657.
- Borel, N., Doherr, M.G., Vretou, E., Psarrou, E., Thoma, R. and Pospischil, A., "Seroprevalences for ovine enzootic abortion in Switzerland." *Prev Vet Med*, 2004, 65(3-4): 205-216.
- Borrego, J. D., *Manual de Produção de Ovinos*. Parte I. Publicações Ciência e Vida, Lisboa. 1985.
- Brade, H., Brade, L. and Nano, F.E., "Chemical and serological investigations on the genus-specific lipopolysaccharide epitope of *Chlamydia*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(8): 2508-2512.
- Brade, L., Brunnemann, H., Ernst, M., Fu, Y., Holst, O., Kosma, Persson, K. and Brade, H., "Occurrence of antibodies against chlamydial lipopolysaccharide in human sera as measured by ELISA using an artificial glycoconjugate antigen." *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1994, 8(1): 27-41.
- Brown, J., Howie, S.E. and Entrican, G., "A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep." *Vet Immunol Immunopathol*, 2001, 82(1-2): 107-119.
- Brown, P.A. and Newman, J.A., "Methods of chlamydial antigen detection." *J Am Vet Med Assoc*, 1989, 195(11): 1567-1570.
- Buendia, A.J., Cuello, F., Del Rio, L., Gallego, M.C and Salinas, J., "Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection." *Vet Microbiol*, 2001, 78(3): 229-239.
- Buxton, D., Anderson, I.E., Longbottom, D., Livingstone, M., Wattedegera, S. and Entrican, G., "Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues." *J Comp Pathol*, 2002, 127(2-3): 133-141.
- Buxton, D., Barlow, R.M., Finlayson, J., Anderson, I.E. and Mackellar, A., "Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep." *J Comp Pathol*, 1990, 102(2): 221-237.
- Buxton, D., Rae, A.G., Maley, S.W., Thomson, K.M., Livingstone, M., Jones, G.E. and Herring, A.J., "Pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection in sheep: detection of the organism in a serial study of the lymph node." *J Comp Pathol*, 1996, 114(3): 221-230.

- Cabral, R., Almeida C., Jorge, J., Fonseca, L., *Dossier Queijo*. Programa de apoio aos Jovens Agricultores, folhetos de divulgação. Direção Regional de Agricultura da Beira Litoral 2004 Coimbra.
- Carolino, N., Gama, L., Dinis, R., Sá, T., Características produtivas da ovelha Serra da Estrela. *Archivos de Zootecnia*, 2003. 52(197): 3-14.
- Cazerta, S. M. M., Miglino, M. A., Marques, R. S., Vulcano, M. e Pereira, F. T. V. Caracterização das áreas hemófagas da placenta bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 2007. 27(6):229-235.
- Chanton-Greutmann, H., Thoma, R., Corboz, L., Borel, N. and Pospischil, A., "[Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996-1998) with special regard to chlamydial abortions]." *Schweiz Arch Tierheilkd*, 2002, 144(9): 483-492.
- Clemente, M.L., Braganca Barahona, M.J., Capela Andrade, M.F., Botelho, A.R. and Vicari, N., "Diagnosis by PCR-REA of *Chlamydia* species infections in late-term abortions of domestic ruminants." *Vet Rec*, 2011, 168(23): 619.
- Cox, R.L., Kuo, C.-C., Grayston, J.T., Campbell, L.A., Deoxyribonucleic acid relatedness of *Chlamydia* sp. strain TWAR to *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988. 38, 265±268.
- Cross, R.F. and Clafin, R.M., "The incidence and removal of procomplementary activity in swine serum." *Am J Vet Res*, 1963, 24: 334-336.
- Dagnall, G.J. and Wilsmore, A.J., "A simple staining method for the identification of chlamydial elementary bodies in the fetal membranes of sheep affected by ovine enzootic abortion." *Vet Microbiol*, 1990, 21(3): 233-239.
- Davis, C.H., Raulston, J.E. and Wyrick, P.B., "Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells." *Infect Immun*, 2002, 70(7): 3413-3418.
- DeGraves, F.J., Gao, D., Hehnen, H.R., Schlapp, T. and Kaltenboeck, B., "Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high-sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle." *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1726-1729.
- Dinis, R., Melhoramento da raça ovina Serra da Estrela. Relatório anual. Associação Nacional de Criadores de Ovinos Serra da Estrela, Oliveira do Hospital, 2009.
- Duffy, P.E., "Plasmodium in the placenta: parasites, parity, protection, prevention and possibly preeclampsia." *Parasitology*, 2007, 134(Pt 13): 1877-1881.
- Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H. and Sachse, K., "Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies." *Mol Cell Probes*, 2006, 20(1): 60-63.
- Entrican, G., "Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion." *J Comp Pathol*, 2002, 126(2-3): 79-94.
- Entrican, G., Brown, J. and Graham, S., "Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1998, 21(1): 15-26.
- Entrican, G., Buxton, D. and Longbottom, D., "Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology." *J R Soc Med*, 2001, 94(6): 273-277.
- Entrican, G., Wattedgedera, S., Chui, M., Oemar, L., Rocchi, M. and McInnes, C., "Gamma interferon fails to induce expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and does not control the growth of *Chlamydia abortus* in BeWo trophoblast cells." *Infect Immun*, 2002, 70(5): 2690-2693.
- Essenberg, R.C., Seshadri, R., Nelson, K. and Paulsen, I., "Sugar metabolism by *Brucellae*." *Vet Microbiol*, 2002, 90(1-4): 249-261.
- Esteves, F., Importância da Paratuberculose em Ovinos Serra da Estrela. Tese de Mestrado. Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, 2009.
- Esteves, F., O papel do Médico Veterinário como sanitário de pequenos ruminantes. Instituto Politécnico de Viseu. 2010.
- Everett, K.D., "*Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye." *Vet Microbiol* 2000, 75(2): 109-126.
- Everett, K.D. and Andersen, A.A., "The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp." *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(2): 461-473.
- Everett, K.D., Bush, R.M. and 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*, 1999, 49 Pt 2: 415-440.
- Everett, K.D., Hornung, L.J. and Andersen, A.A., "Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests." *J Clin Microbiol*, 1999, 37(3): 575-580.
- Feist, A., Sydler, T., Gebbers, J.J., Pospischil, A. and Guscetti, F., "No association of *Chlamydia* with abortion." *J R Soc Med*, 1999, 92(5): 237-238.
- Fukushi, H. and Hirai, K., "Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants." *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 42(2): 306-308.
- Gerber, A., Thoma, R., Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, C., Doherr, M.G., Zimmermann, D.R., Polkinghorne, A., Pospischil, A. and Borel, N., "Ovine Enzootic Abortion (OEA): a comparison of antibody responses in vaccinated and naturally-infected swiss sheep over a two year period." *BMC Vet Res*, 2007, 3: 24.
- Graham, S.P., Jones, G.E., MacLean, M., Livingstone, M. and Entrican, G., "Recombinant ovine interferon gamma inhibits the multiplication of *Chlamydia psittaci* in ovine cells." *J Comp Pathol*, 1995, 112(2): 185-195.
- Grayston, J.T., Kuo, C.-C., Campbell, L.A., Wang, S.-P., *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989: 39, 88±90.
- Griffiths, P.C., Philips, H.L., Dawson, M. and Clarkson, M.J., "Antigenic and morphological differentiation of placental and intestinal isolates of *Chlamydia psittaci* of ovine origin." *Vet Microbiol*, 1992, 30(2-3): 165-177.
- Griffiths, P.C., Plater, J.M., Horigan, M.W., Rose, M.P., Venables, C. and Dawson, M., "Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by comparative inclusion immunofluorescence assay, recombinant lipopolysaccharide enzyme-linked immunosorbent assay, and complement fixation test." *J Clin Microbiol*, 1996, 34(6): 1512-1518.
- Gut-Zangger, P., Vretou, E., Psarrou, E., Pospischil, A. and Thoma, R., "[*Chlamydia* abortion in sheep: possibilities for serological diagnosis using a competitive ELISA and insight into the epidemiologic situation in Switzerland]." *Schweiz Arch Tierheilkd*, 1999, 141(8): 361-366.
- Hartley, J.C., Kaye, S., Stevenson, S., Bennett, J. and Ridgway, G., "PCR detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species." *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9): 3072-3079.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M., "Real time quantitative PCR." *Genome Res*, 1996, 6(10): 986-994.
- Herring, A.J., "Typing *Chlamydia psittaci*--a review of methods and recent findings." *Br Vet J*, 1993, 149(5): 455-475.
- Hobson, D., Johnson, F.W., Byng, R.E., The growth of the ewe abortion chlamydial agent in McCoy cell cultures. *J. Comp. Pathol.* 1977. 87, 155-159.
- Hoelzle, L.E., Hoelzle, K. and Wittenbrink, M.M., "Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera." *Vet Microbiol*, 2004, 103(1-2): 85-90.
- Huang, H.S., Buxton, D., Burrells, C., Anderson, I.E. and Miller, H.R., "Immune responses of the ovine lymph node to *Chlamydia psittaci*. A cellular study of popliteal efferent lymph." *J Comp Pathol*, 1991, 105(2): 191-202.
- Hyde, S.R. and Benirschke, K., "Gestational psittacosis: case report and literature review." *Mod Pathol*, 1997, 10(6): 602-607.
- Igietseme, J.U., Ananaba, G.A., Bolier, J., Bowers, S., Moore, T., Belay, T., Eko, F.O., Lyn, D. and Black, C.M., "Suppression of endogenous IL-10 gene expression in dendritic cells enhances antigen presentation for specific Th1 induction: potential for cellular vaccine development." *J Immunol*, 2000, 164(8): 4212-4219.
- Johnson, F.W., Clarkson, M.J. and Spencer, W.N., "Direct isolation of the agent of enzootic abortion of ewes (*Chlamydia psittaci*) in cell cultures." *Vet Rec*, 1983, 113(18): 413-414.
- Jones, G.E., Low, J.C., Machell, J. and Armstrong, K., "Comparison of five tests for the detection of antibodies against chlamydial (enzootic) abortion of ewes." *Vet Rec*, 1997, 141(7): 164-168.
- Kaltenboeck, B., Heard, D., DeGraves, F.J. and Schmeer, N., "Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants." *J Clin Microbiol*, 1997, 35(9): 2293-2298.

- Kaltenboeck, B., Kousoulas, K.G. and Storz, J., "Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species." *J Bacteriol*, 1993, 175(2): 487-502.
- Kaltenboeck, B., Schmeer, N. and Schneider, R., "Evidence for numerous *omp1* alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR." *J Clin Microbiol*, 1997, 35(7): 1835-1841.
- Kerr, K., Entrican, G., McKeever, D. and Longbottom, D., "Immunopathology of *Chlamydophila abortus* infection in sheep and mice." *Res Vet Sci*, 2005, 78(1): 1-7.
- Laroucau, K., Souriau, A. and Rodolakis, A., "Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using *pmp* genes." *Vet Microbiol*, 2001, 82(2): 155-164.
- Laroucau, K., Trichereau, A., Vorimore, F. and Mahe, A.M., "A *pmp* genes-based PCR as a valuable tool for the diagnosis of avian chlamydiosis." *Vet Microbiol*, 2007, 121(1-2): 150-157.
- Leiser, R., Krebs, C., Klish, K., Ebert, B., Dantzer, V., Hoffmann, B. Fetal villosity and microvasculature of the bovine placenta in the second half of gestation. *J. Anat.* 1997 191,517-527
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K., "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." *PCR Methods Appl*, 1995, 4(6): 357-362.
- Livingstone, M., Entrican, G., Wattedgedera, S., Buxton, D., McKendrick, I.J. and Longbottom, D., "Antibody responses to recombinant protein fragments of the major outer membrane protein and polymorphic outer membrane protein POMP90 in *Chlamydophila abortus*-infected pregnant sheep." *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(6): 770-777.
- Livingstone, M., Wheelhouse, N., Maley, S.W. and Longbottom, D., "Molecular detection of *Chlamydophila abortus* in post-abortion sheep at oestrus and subsequent lambing." *Vet Microbiol*, 2009, 135(1-2): 134-141.
- Longbottom, D. and Coulter, L.J., "Animal chlamydioses and zoonotic implications." *J Comp Pathol*, 2003, 128(4): 217-244.
- Longbottom, D., Fairley, S., Chapman, S., Psarrou, E., Vretou, E. and Livingstone, M., "Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*." *J Clin Microbiol*, 2002, 40(11): 4235-4243.
- Longbottom, D., Psarrou, E., Livingstone, M. and Vretou, E., "Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*." *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 195(2): 157-161.
- Madico, G., Quinn, T.C., Boman, J. and Gaydos, C.A., "Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes." *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1085-1093.
- Magnino, S., Giovannini, S., Paoli, C., Ardenghi, P. and Sambri, V., "Evaluation of an automated complement fixation test (Seramat) for the detection of chlamydial antibodies in sheep and goat sera." *Vet Res Commun*, 2005, 29 Suppl 1: 157-161.
- Mahony, J.B., Sellors, J. and Chernesky, M.A., "Detection of chlamydial inclusions in cell culture or biopsy tissue by alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase staining." *J Clin Microbiol*, 1987, 25(10): 1864-1867.
- Majewski, A.C. and Hansen, P.J., "Progesterone inhibits rejection of xenogeneic transplants in the sheep uterus." *Horm Res*, 2002, 58(3): 128-135.
- Maley, S.W., Livingstone, M., Rodger, S.M., Longbottom, D. and Buxton, D., "Identification of *Chlamydophila abortus* and the development of lesions in placental tissues of experimentally infected sheep." *Vet Microbiol*, 2009, 135(1-2): 122-127.
- Markey, B.K., McNulty, M.S. and Todd, D., "Comparison of serological tests for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection of sheep." *Vet Microbiol*, 1993, 36(3-4): 233-252.
- McCafferty, M.C., Maley, S.W., Entrican, G. and Buxton, D., "The importance of interferon-gamma in an early infection of *Chlamydia psittaci* in mice." *Immunology*, 1994, 81(4): 631-636.
- Medawar, P.B., Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1953. 7, 320-338.

- Messmer, T.O., Skelton, S.K., Moroney, J.F., Daugharty, H. and Fields, B.S., "Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks." *J Clin Microbiol*, 1997, 35(8): 2043-2046.
- Moulder, J.W., "The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and viruses." *Annu Rev Microbiol*, 1966, 20: 107-130.
- Moulder, J.W., "Interaction of *chlamydiae* and host cells in vitro." *Microbiol Rev*, 1991, 55(1): 143-190.
- Navarro, J.A., Garcia de la Fuente, J.N., Sanchez, J., Martinez, C.M., Buendia, A.J., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Ferri, E.F., Ortega, N. and Salinas, J., "Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes." *Vet Pathol*, 2004, 41(5): 498-505.
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J. and Sachse, K., "New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples." *Vet J*, 2009, 181(2): 145-150.
- Papp, J.R. and Shewen, P.E., "Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding." *Infect Immun*, 1996, 64(4): 1116-1125.
- Papp, J.R., Shewen, P.E. and Gartley, C.J., "Abortion and subsequent excretion of *chlamydiae* from the reproductive tract of sheep during estrus." *Infect Immun*, 1994, 62(9): 3786-3792.
- Peltier, M.R., Liu, W.J. and Hansen, P.J., "Regulation of lymphocyte proliferation by uterine serpin: interleukin-2 mRNA production, CD25 expression and responsiveness to interleukin-2." *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000, 223(1): 75-81.
- Petrovsky, N. and Aguilar, J.C., "Vaccine adjuvants: current state and future trends." *Immunol Cell Biol*, 2004, 82(5): 488-496.
- Philips, H.L. and Clarkson, M.J., "Spontaneous change from overt to covert infection of *Chlamydia pecorum* in cycloheximide-treated mouse McCoy cells." *Infect Immun*, 1995, 63(9): 3729-3730.
- Piccinni, M.P., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Beloni, L., Giannarini, L., Sampognaro, S., Parronchi, P., Manetti, R., Annunziato, F., Livi, C. and et al., "Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones." *J Immunol*, 1995, 155(1): 128-133.
- Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P. and Gebbers, J., "Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1)." *Swiss Med Wkly*, 2002, 132(5-6): 6466.
- Pudjiatmoko, Fukushi, H., Ochiai, Y., Yamaguchi, T. and Hirai, K., "Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16S rRNA gene sequences." *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47(2): 425-431.
- Raghupathy, R., "Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy." *Immunol Today*, 1997, 18(10): 478-482.
- Roberts, W., Grist, N.R. and Giroud, P., "Human abortion associated with infection by ovine abortion agent." *Br Med J*, 1967, 4(5570): 37.
- Rocchi, M.S., Wattedegera, S., Meridiani, I. and Entrican, G., "Protective adaptive immunity to *Chlamydophila abortus* infection and control of ovine enzootic abortion (OEA)." *Vet Microbiol*, 2009, 135(1-2): 112-121.
- Rodolakis, A. and Mohamad, K., "Zoonotic potential of *Chlamydophila*." *Vet Microbiol*, 2010, 140(3-4): 382-391.
- Rodolakis, A. and Souriau, A., "Variations in the virulence of strains of *Chlamydia psittaci* for pregnant ewes." *Vet Rec*, 1989, 125(4): 87-90.
- Sachse, K. and Hotzel, H., "Detection and differentiation of *Chlamydiae* by nested PCR." *Methods Mol Biol*, 2003, 216: 123-136.
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A. and Longbottom, D., "Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections." *Vet Microbiol*, 2009, 135(1-2): 2-21.
- Salti-Montesanto, V., Tsoli, E., Papavassiliou, P., Psarrou, E., Markey, B.K., Jones, G.E. and Vretou, E., "Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1." *Am J Vet Res*, 1997, 58(3): 228-235.
- Sammin, D.J., Markey, B.K., Quinn, P.J., McElroy, M.C. and Bassett, H.F., "Comparison of fetal and maternal inflammatory responses in the ovine placenta after experimental infection with *Chlamydophila abortus*." *J Comp Pathol*, 2006, 135(2-3): 83-92.

- Schmeer, N., Krauss, H., Apel, J., Adami, M., Muller, H.P., Schneider, W., Perez-Martinez, J.A. and Rieser, H., "Analysis of caprine IgG1 and IgG2 subclass responses to *Chlamydia psittaci* infection and vaccination." *Vet Microbiol*, 1987, 14(2): 125-135.
- Spencer, W.N. and Johnson, F.W., "Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material." *Vet Rec*, 1983, 113(23): 535-536.
- Stamp, J.T., Watt, J.A. and Cockburn, R.B., "Enzootic abortion in ewes; complement fixation test." *J Comp Pathol*, 1952, 62(2): 93-101.
- Storz, J., Carroll, E.J., Ball, L. and Faulkner, L.C., "Isolation of a psittacosis agent (*Chlamydia*) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome." *Am J Vet Res*, 1968, 29(3): 549-555.
- Storz, J., Intestinal chlamydial infections of ruminants. In: *Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases*, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A., 1971. pp.146–154.
- Szeredi, L. and Bacsadi, A., "Detection of *Chlamydophila abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method." *J Comp Pathol*, 2002, 127(4): 257-263.
- Takahashi, T., Masuda, M., Tsuruno, T., Mori, Y., Takashima, I., Hiramune, T. and Kikuchi, N., "Phylogenetic analyses of *Chlamydia psittaci* strains from birds based on 16S rRNA gene sequence." *J Clin Microbiol*, 1997, 35(11): 2908-2914.
- Tanner, M.A., Harris, J.K., Pace, N.R., Molecular phylogeny of *Chlamydia* and relatives. In: Stephens, R.S. (Ed.), *Chlamydia*, American Soc. for Microbiology Press, Washington, DC, 1999. pp. 1±8.
- Thejls, H., Gnarpe, J., Gnarpe, H., Larsson, P.G., Platz-Christensen, J.J., Ostergaard, L. and Victor, A., "Expanded gold standard in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in a low prevalence population: diagnostic efficacy of tissue culture, direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, PCR and serology." *Genitourin Med*, 1994, 70(5): 300-303.
- Thomson, N.R., Yeats, C., Bell, K., Holden, M.T., Bentley, S.D., Livingstone, M., Cerdano-Tarraga, A.M., Harris, B., Doggett, J., Ormond, D., Mungall, K., Clarke, K., Feltwell, T., Hance, Z., Sanders, M., Quail, M.A., Price, C., Barrell, B.G., Parkhill, J. and Longbottom, D., "The *Chlamydophila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation." *Genome Res*, 2005, 15(5): 629-640.
- Vretou, E., Loutrari, H., Mariani, L., Costelidou, K., Eliades, P., Conidou, G., Karamanou, S., Mangana, O., Siarkou, V. and Papadopoulos, O., "Diversity among abortion strains of *Chlamydia psittaci* demonstrated by inclusion morphology, polypeptide profiles and monoclonal antibodies." *Vet Microbiol*, 1996, 51(3-4): 275-289.
- Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, M., Vlisidou, I., Salti-Montesanto, V. and Longbottom, D., "Identification of protective epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of a variant strain of *Chlamydia psittaci* serotype 1 (*Chlamydophila abortus*)." *Infect Immun*, 2001, 69(1): 607-612.
- Vretou, E., Radouani, F., Psarrou, E., Kritikos, I., Xylouri, E. and Mangana, O., "Evaluation of two commercial assays for the detection of *Chlamydophila abortus* antibodies." *Vet Microbiol*, 2007, 123(1-3): 153-161.
- Wilson, K., Livingstone, M. and Longbottom, D., "Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep." *Vet Microbiol*, 2009, 135(1-2): 38-45.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. and Rasmussen, R.P., "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." *Biotechniques*, 1997, 22(1): 130-131, 134-138.
- Woldehiwet, Z., "Vaccines against chlamydial infections--a complex but effective strategy for disease control." *Vet J*, 2006, 171(2): 200-203.
- Wooding, P. e Burton, G. Comparative Placentation – Chapter 6: Synepitheliochorial Placentation: Ruminants (Ewe and Cow); Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, 2008. pp. 133-167.
- Wooding, F., Flint, A., Placentation. In: Lamming, G.E. (Ed.), *Marshall's Physiology of Reproduction*. Chapman and Hall, London, 1994. pp. 233–460.
- Yoshida, H., Kishi, Y., Shiga, S. and Hagiwara, T., "Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis." *Microbiol Immunol*, 1998, 42(5): 411-414.

# **ANEXOS**

## Anexo I – Caracterização das amostras

<b>Amostra</b>	<b>Exploração</b>	<b>Estatuto Sanitário</b>	<b>Concelho</b>	<b>Idade Animal</b>	<b>Tempo estimado gestação</b>	<b>Tempo de colheita após aborto</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	A	B3	Oliveira do Hospital	7 anos	3 meses	1 dia	40,0
2	A	B3	Oliveira do Hospital	6 anos	3 meses	2 dias	39,4
3	B	B4	Arganil	4 anos	2 meses e meio	13 dias	38,2
4	C	B3	Oliveira do Hospital	5 anos	3 meses	10 dias	39,5
5	C	B3	Oliveira do Hospital	4 anos	3 meses	8 dias	38,7
6	D	B4	Gouveia	7 anos	3 meses	12 dias	38,9
7	E	B4	Gouveia	2 anos	3 meses	13 dias	39,2
8	F	B4	Oliveira do Hospital	5 anos	3 meses	1 dia	38,8
9	F	B4	Oliveira do Hospital	3 anos	3 meses	6 dias	38,2
10	F	B4	Oliveira do Hospital	5 anos	4 meses	5 dias	39,1
11	F	B4	Oliveira do Hospital	3 anos	3 meses	3 dias	38,5
12	G	B4	Nelas	7 anos	3 meses e meio	10 dias	38,9
13	G	B4	Nelas	5 anos	3 meses	10 dias	38,4
14	G	B4	Nelas	6 anos	3 meses e meio	12 dias	38,9
15	G	B4	Nelas	5 anos	3 meses	8 dias	39,2
16	H	B3	Gouveia	6 anos	3 meses e meio	7 dias	39,4
17	I	B4	Gouveia	5 anos	3 meses e meio	3 dias	38,4
18	J	B4	Gouveia	3 anos	4 meses	8 dias	38,8
19	K	B3	Tábua	3 anos	3 meses e meio	4 dias	39,3
20	L	B4	Tábua	7 anos	3 meses	12 dias	38,6

## Anexo II — Protocolo de extração de ácidos nucleicos

- 1- Para um tubo estéril de microcentrifugadora de 1,5 ml:
  - a. Adicionar 200 µl da amostra.
  - b. Adicionar 200 µl de *Binding Buffer*.
  - c. Adicionar 40 µl da solução de Proteinase K reconstituída, e misturar imediatamente o conteúdo do tubo.
  - d. Incubar o tubo durante 10 minutos a 70°C.
  
- 2- Após a incubação, misturar a amostra com 100 µl de Isopropanol.
  
- 3- Para transferir a amostra para o *High Pure Tube*:
  - a. Inserir um *High Pure Filter Tube* num *Collection Tube*.
  - b. Pipetar toda a amostra para o reservatório superior do *Filter Tube*.
  
- 4- Inserir toda a montagem do *High Pure Tube* na microcentrifugadora, e centrifugar durante 1 minuto a 8000 x g.
  
- 5- Após a centrifugação:
  - a. Remover o *Filter Tube* do *Collection Tube* e descartar o líquido e o *Collection Tube*.
  
- 6- Para remover os inibidores:
  - a. Adicionar 500 µl de *Inhibitor Removal Buffer* ao reservatório superior do conjunto *Filter Tube*. Repetir a centrifugação (1 min a 8000 x g) e descartar o sobrenadante e o *Collection Tube*.
  - b. Voltar a inserir o *Filter Tube* num novo *Collection Tube*.
  
- 7- Para lavar a amostra:
  - a. Adicionar 500 µl de *Wash Buffer* ao reservatório superior do *Filter Tube*.
  - b. Repetir a centrifugação (como no Ponto 4).

- 8- Após a primeira lavagem:
  - a. Repetir o Ponto 5.
  - b. Repetir o passo de lavagem (Ponto 7). Descartar o sobrenadante.
  - c. Centrifugar o conjunto *Filter Tube* – *Collection Tube* durante 10 segundos à velocidade máxima (aprox. 13 000 x g) para remover a *Wash Buffer* residual.
  
- 9- Descartar o *Collection Tube* e inserir o *Filter Tube* num tubo estéril de microcentrifugadora de 1,5 ml.
  
- 10- Para eluir o ácido nucleico:
  - a. Adicionar ao *Filter Tube* 200 µl de *Elution Buffer* pré-aquecida (70°C).
  - b. Centrifugar o conjunto durante 1 minuto a 8000 x g.
  
- 11- O tubo contém agora os ácidos nucleicos eluídos.
  - a. Utilizar diretamente uma fração dos ácidos nucleicos eluídos para PCR, ou conservar a uma temperatura de 2-8°C para posterior análise.

## **ANEXO III – SuperHot Master Mix (2x)**

### **Composição**

- Taq DNA Polimerase em tampão de reação: 0.1 u/ $\mu$ l
- Anticorpos anti- Taq DNA Polimerase, concentração ajustada para a inibição eficaz da DNA Polimerase a 37°C
- 32 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 130 mM TrisHCl, pH 8.8 a 25°C
- 0.02% Tween-20
- 3 mM  $\text{MgCl}_2$
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP): 0.4 mM de cada

### **Condições de armazenamento**

-20°C

### **Protocolo de PCR utilizando a “SuperHot PCR Master Mix (2x)”**

Devido à inibição da actividade da polimerase através da presença de anticorpos anti- Taq DNA Polimerase, as reações poderão decorrer à temperatura ambiente.

**ANEXO IV – Formulário de caracterização de amostras**AMOSTRA<sup>º</sup> \_\_\_\_\_ DATA DE COLHEITA \_\_\_\_\_

CÓDIGO DE EXPLORAÇÃO : \_\_\_\_\_ ESTATUTO SANITÁRIO: \_\_\_\_\_

MORADA: \_\_\_\_\_

PROPRIETÁRIO: \_\_\_\_\_

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ RAÇA: \_\_\_\_\_

JÁ ABORTOU PREVIAMENTE: SIM ( ) NÃO ( )

DATA DO ABORTO: \_\_\_\_\_ T(°C) \_\_\_\_\_

TEMPO PROVÁVEL DE GESTAÇÃO: \_\_\_\_\_

VACINAÇÃO: BRUCELOSE ( )

LÍNGUA AZUL ( )

OUTROS:

DESPARASITAÇÃO: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_\_

OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

