

**ESTUDO DO AGENTE *CHLAMYDOPHILA PSITTACI* POR PCR EM
CALOPSITA NYMPHICUS HOLLANDICUS
STUDY OF THE AGENT *CHAMYDOPHILA PSITTACI* BY PCR IN *NYMPHICUS
HOLLANDICUS***

Rafael Prange Bonorino*, Docente, Centro Universitário ICESP, Brasília, Brasil
Andryelle Assunção Fraga, Discente, Centro Universitário ICESP, Brasília, Brasil
*Autor correspondente: rafael.bonorino@icesp.edu.br

Submetido: 16/03/2020
Aceito: 11/06/2020

Resumo

A *Chlamydophila psittaci* é uma bactéria gram. negativa intracelular obrigatória, conhecida popularmente como clamidiose aviária. Acomete aves e mamíferos, incluindo o ser humano causando sinais clínicos sintomáticos. Essa patologia é uma das principais zoonoses acometidas por aves que preocupa a saúde humana. Foi realizada uma pesquisa para saber a incidência da doença nas Agropecuárias do DF. Várias porções de fezes espalhadas pela gaiola foram recolhidas para realizar exames de fezes por PCR para detecção de *C. psittaci* em calopsitas. Foram coletadas 32 amostras aleatórias de fezes em diferentes agropecuárias no DF. Os proprietários autorizaram as coletas diretamente das gaiolas sem a necessidade de contenção das aves para a relevância da pesquisa e autorizaram as coletas, as quais foram divididas em três lotes. Cada gaiola havia aproximadamente 10 animais. Os materiais foram armazenados em frascos com solução conservativa e devidamente rotulados com a identificação do local, após enviados para o laboratório de referência para análise. Os Testes utilizando PCR para detecção de *C. psittaci* possuem o valor de gene mpA. As fezes foram coletadas diretamente das gaiolas onde havia uma bandeja para depósito dos mesmos sem necessidade de contenção da ave. Concluiu-se que não houve incidência do agente em Agropecuárias do DF no período pesquisado, porém não se descarta que devemos ficar atento à doença, pois uma vez ela sendo encontrada no ambiente, as aves podem ser assintomáticas e consequentemente afetar os seres humanos.

Palavras-chave: Calopsitas; Clamídia; Zoonose; Gripe aviária; Humanos.

Abstract

The *Chlamydophila psittaci* is an intracellular negative gram bacterium, the bacterium knows popularly as avian chlamydia. It affects birds and others animals, including humans, causing symptomatic clinical signs. This pathology is one of the main zoonosis affected by birds that concerns human health. A research was carry out to find out the occurrence of the disease in pet stores of the DF. Some potions of feces scattered around the cage were collect to perform stool examinations by PCR for detection of *C. psittaci* in cockatiels. 32 random samples of feces were collected in different Agropecuária in DF. Owners of agropecuarias were instruct on the need to research and authorized collections, which were divide into three lots. There were 10 animals in each cage. The materials were stored in bottles with a conservative solution and duly labeled with the location identification, after to send to the reference laboratory for analysis. Tests using PCR to detect *C. psittaci* have the value of mpA gene. The feces were collect directly from the cages where there was a tray for depositing them without the need to contain the bird. It was conclude that there was no occurrence of the agent in pet stores of the DF in the researched period however. It is not discard that we must be aware of the disease, because once it is found in the environment, birds can be asymptomatic and consequently affect humans.

Keywords: Antibiotic; Cockatiels; chlamydia; zoonosis; Bird flu; humans

Introdução

A *Chlamydophila psittaci* é uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória, conhecida popularmente como clamidiose aviária. A clamidiose acomete aves, mamíferos e os seres humanos, causando sinais clínicos sintomáticos, sendo uma patologia zoonótica. Atualmente, o termo clamidiose é utilizado para determinar a patologia nas aves e o termo psitacose para denominar nos seres humanos¹. Essa patologia é uma das principais zoonoses acometidas por aves que preocupa a saúde humana devido com distribuição mundial e acometida em qualquer estação do ano no contato direto com o animal¹. Patologias comuns nessas espécies, como a clamidiose, não possuem relevância e acaba sendo subestimada, por ter seu diagnóstico definitivo difícil em virtude da complexa fisiopatologia da infecção por *Chlamydophila psittaci*², podendo ser confundida com uma gripe, tanto em humanos e nas aves e conseqüentemente, sendo tratada erroneamente. A realização de medidas de prevenção e controle é fundamental em criatórios, granjas e abatedouros, objetivando evitar a disseminação do agente, diminuindo, assim, o impacto da doença a saúde pública e os prejuízos econômicos para o produtor³.

Em 1874, na Europa, foi descrito o primeiro caso de clamidiose em papagaios e em humanos por Morange em 1895, após constatação de um agente infeccioso transmitido por papagaios⁴. Por esse motivo, recebeu o nome de *psitacose*, da palavra grega *psittacus*, que significa papagaio⁴. A família Psittacidae compõe o maior reservatório de *C. psittaci*, em cativeiros normalmente são colocados em numerosos grupos dentro de gaiolas em condições precárias e assim tendo a super população e por ser uma ave comercializada, são vendidas e mantidas como animal pet⁵, tendo o contato direto com o proprietário e assim, contaminando com a doença.

Com o crescimento do comércio de aves exóticas, principalmente as calopsitas (*Nymphicus hollandicus*), o ser humano vem substituindo animais domésticos como cachorros e gatos por aves e criando um contato íntimo, tornando-as um animal pet e conseqüentemente assumindo um potencial risco pelo contato íntimo desses animais e sua convivência nos lares sendo susceptível a contaminação⁵.

A comercialização desse animal cresceu ao longo dos anos, devido ao comportamento dócil quando domesticado e seu pequeno tamanho, além de sua facilidade de criação e manuseio.

Quanto a patogenicidade, nas células epiteliais da mucosa conjuntival do aparelho respiratório urogenital e gastrointestinal presentes no animal, a bactéria *Chamydophila* se aloja e se reproduz podendo causar infecção em seres humanos ⁶.

Sua transmissibilidade para o homem ocorre pelo contato direto, ou seja, pela inalação das bactérias presentes no meio em que as calopsitas vivem, contato direto das fezes ou no momento da limpeza onde o animal vive. Os sintomas podem ser idênticos a de uma gripe como: febre, fadiga, dores de cabeça severas, calafrios, anorexia, mialgia, fotofobia, náuseas e vômitos ⁽⁶⁾. Em casos mais graves, ocorrem: pneumonia atípica grave, tosse seca, respiração difícil e dolorosa, ou em casos crônicos, ocorrem insuficiências cardiovasculares e tromboflebitas, ocasionando a morte ⁶.

A bactéria *Chamydophila*, além de acometer o trato respiratório, afeta outros órgãos de forma sistêmica e assim podem ocasionar infecções e inflamações como: endocardite, miocardite, hepatite, artrite, ceratoconjuntivite e encefalite. Falência respiratória, trombocitopenia, hepatite.

Em gestantes, a infecção por clamídia pode causar a morte fetal, abortos espontâneos, baixo peso ao nascer e prematuridade, a clamídia pode ser transmitida da mãe para o feto e provocar patologias no recém-nascido. Os sintomas variam desde uma pneumonia intersticial até uma encefalite ⁶.

Na Classe Aves, *C. psittaci* foi demonstrada, tanto o agente, quanto os seus anticorpos detectados em pelo menos 469 espécies de vida livre ou companhia ⁶.

A pesquisa tem como o objetivo alertar os proprietários de Agropecuárias que comercializam aves no Distrito Federal e informar a respeito da disseminação da doença e o problema aos futuros compradores sobre a necessidade de conhecer o mesmo, e assim evitar que ela seja transmitida ao ser humano. Uma vez que ela pode ser confundida com uma gripe forte podendo evoluir para pneumonia e até a morte.

Ao mesmo tempo ela pode estar na forma subclínica, o que não é percebido tanto pelo vendedor quanto o comprador destes animais. Por isso é necessário uma boa anamnese e caso haja necessidade, realizar exames de fezes por PCR para a detecção de *C. psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) que são os maiores reservatórios de *C. psittaci*, pelo seu alto potencial zoonótico e facilidade de transmissão aos humanos que se dá pelas secreções respiratórias, associado ao íntimo contato. As calopsitas

(*Nymphicus hollandicus*) são carreadores frequentes da *C. psittaci* e podem eliminar o agente nas fezes por mais de um ano após da contaminação.

Materiais e Métodos

Foram coletadas 32 amostras por gaiola de fezes de calopsitas de forma aleatória em diferentes agropecuárias no DF e entorno. Os proprietários das agropecuárias foram orientados quanto à necessidade da pesquisa e autorizaram as coletas sem a necessidade de contato com os animais as quais foram divididas em três lotes. Cada gaiola havia 10 calopsitas (Figura 1).

As aves ficaram expostas em gaiolas onde havia trânsito de outras aves de rua que sobrevoavam a área devido a presença de comida.

Figura 1 - Media de 10 calopsitas por gaiola



O primeiro lote teve 16 amostras coletadas em agosto de 2018. Na época predominava o clima mais seco, sendo as amostras recolhidas nas seguintes regiões administrativas: Núcleo Bandeirante, Asa Sul, Gama e Arniqueiras. O segundo lote obteve 14 amostras das regiões de Taguatinga, SIA e Ceilandia. Nesses locais foi observada alta densidade populacional por gaiola. O terceiro lote foram recolhidas 12 amostras nas cidades Paranoá, Varjão, Asa Norte, Itapoã e Lago Norte, observou-se que o período era chuvoso, porem o clima não teve relevância no fator de replicação bacteriana.

As fezes foram coletadas diretamente das gaiolas onde se encontrava uma bandeja para que os dejetos fossem depositados, assim coletou-se pequenas amostras dos mesmos em diferentes partes, conseqüentemente não houve a necessidade de contenção das aves.

Os materiais foram armazenados em frascos (Figura 2 e 3) com solução conservativa onde o laboratório não divulgou o tipo de conservante, porem de fabricação própria, o material biológico foi devidamente rotulado com a identificação do local. O material foi enviado para o laboratório de referência localizado em São Paulo para análise em PCR.

Figura 2 - Frascos onde são armazenadas as amostras de fezes



Figura 3 - Frascos com solução onde são armazenadas as amostras de fezes.



O exame de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) vem crescendo na Medicina veterinária na acurácia dos resultados pela sua especificidade e sensibilidade. Essa técnica é muito utilizada em laboratórios devido a sua precisão em relação a outros testes sorológicos, pois detecta patógenos presentes no material a ser investigado.

A detecção do método é feita por amplificação do DNA através de uma quantidade significativa da amostra. A técnica é bastante sensível, o diagnóstico molecular de clamídias é determinado através da visualização em gel de marcador molecular. O par de primers utilizados amplifica exclusivamente o marcador molecular de nucleotídeos do plasmídeo mencionado de *C. psittaci*^{5,15}.

Segundo Raso *et al*^{2,12}, o exame apresenta uma alta detecção da sequência específica para identificar o DNA presente no material coletado, com um grande potencial de especificidade e sensibilidade.

Hewinson *et al.* (1997) e Ferreira (2014) detectaram *C. psittaci* utilizando os primers com uma reação decorrente a termociclador que inicialmente desnatura a dupla hélice, conseqüentemente os primers se hibridiza com sequencias complementares, a enzima de polimerase, adiciona bases e compõe a uma nova molécula de DNA assim, utilizando o mesmo molde para outras cadeias de desnaturação, ciclos que produz e que amplificam parte do gene *ompA*. Hewinson *et al.* (1997) detectou presença do marcador molecular de *C. psittaci* a partir de amostras de DNA que possuíam de 60 a 600fg por reação de PCR.

Ferreira (2014) não descreveu qual foi o mínimo e máximo de quantidade de DNA utilizados nas amostras extraídas nas quais houve detecção molecular do patógeno.

Com uma pequena amostra de DNA, é possível amplificar esta sequência e constatar a presença do agente antes da manifestação dos sintomas.

Neste trabalho, foram utilizadas amostras de fezes para o teste de PCR para o resultado de *C. psittaci* utilizando-se como alvo o gene ompA (8; 9). A extração de DNA pode ser feita através de kits comerciais de acordo com a amostra utilizada ou reagentes mais baratos, como por exemplo o fenol-clorofórmio ⁸.

Amostras mais confiáveis para a detecção de clamidiose são as fezes, em estágios avançados da doença ¹¹.

Resultados

Em média foram recolhidas aproximadamente 32 amostras de fezes em diferentes pontos da gaiola devido a uma grande população de animais no ambiente

No primeiro lote (Figura 4), todas as amostras foram negativas para o agente. Foi observada que, nesse período, a seca imperava como condição climática.

A reação de PCR utilizou primers de oligonucleotídeos específicos para amplificação de uma porção de 264 pb do gene MOMP (major outer membrane protein) da "*Chlamydophila psittaci*".

Figura 4 - Resultado de PCR para clamidophila do primeiro lote

nº Unigen	Espécie	Lote	ID / Linhagem	Qde. no pool	Amostra	Resultado
X285654	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 15	03	Fezes	NEGATIVO
X285680	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 14	02	Fezes	NEGATIVO
X286108	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 13		Fezes	NEGATIVO
X285684	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 12		Fezes	NEGATIVO
X285646	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 11	02	Fezes	NEGATIVO
X285673	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 10		Fezes	NEGATIVO
X285691	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 9	02	Fezes	NEGATIVO
X285690	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 8		Fezes	NEGATIVO
X285652	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 7	02	Fezes	NEGATIVO
X285676	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 6	03	Fezes	NEGATIVO
X285668	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 5	03	Fezes	NEGATIVO
X285692	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 4	02	Fezes	NEGATIVO
X285658	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 3		Fezes	NEGATIVO
X285650	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 2	02	Fezes	NEGATIVO
X285665	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 1		Fezes	NEGATIVO

O segundo lote (Figura 5) todas as amostras também foram negativas. Nesse período não houve incidências de chuvas, as amostras não foram comparadas com as condições climáticas.

Figura 5 - Resultado de PCR para clamidophila do segundo lote

nº Unigen	Espécie	Lote	ID / Linhagem	Qde. no pool	Amostra	Resultado
X285685	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 16		Fezes	NEGATIVO
X285659	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 17		Fezes	NEGATIVO
X285698	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 18	03	Fezes	NEGATIVO
X285662	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 19	04	Fezes	NEGATIVO
X285683	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 20	02	Fezes	NEGATIVO
X285663	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 21	03	Fezes	NEGATIVO
X285697	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 22	05	Fezes	NEGATIVO
X285661	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 23	04	Fezes	NEGATIVO
X285707	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 24	07	Fezes	NEGATIVO
X285657	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 25	08	Fezes	NEGATIVO
X285689	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 26	05	Fezes	NEGATIVO
X285700	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 27	05	Fezes	NEGATIVO
X285671	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 28	03	Fezes	NEGATIVO
X285669	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Agropec Grupo 29	07	Fezes	NEGATIVO

SENSIBILIDADE: 60 a 600 fg de DNA (aproximadamente 6 a 60 cópias genômicas)

IMPORTANTE: Resultado de PCR negativo nem sempre indica ausência total de "C. psittaci", pois uma ave infectada pode manter o organismo de forma intermitente. Portanto, em casos de suspeita de clamidiose os testes devem ser repetidos com nova amostra.

O terceiro lote (Figura 6) todas as amostras também foram negativas. Foi observada que, nesse período, houve incidência de chuvas.

Figura 6 - Resultado de PCR para clamidophila do terceiro lote.

nº Unigen	Espécie	Lote	ID / Linhagem	Qde. no pool	Amostra	Resultado
X285666	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 30	03	Fezes	NEGATIVO
X285655	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 31	04	Fezes	NEGATIVO
X285674	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 32	02	Fezes	NEGATIVO
X285660	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 33	05	Fezes	NEGATIVO
X285653	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 34	06	Fezes	NEGATIVO
X285706	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 35	03	Fezes	NEGATIVO
X285677	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 36	02	Fezes	NEGATIVO
X285651	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 37	04	Fezes	NEGATIVO
X285682	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 38	02	Fezes	NEGATIVO
X285656	<i>Nymphicus hollandicus</i>		Grupo 39	01	Fezes	NEGATIVO

SENSIBILIDADE: 60 a 600 fg de DNA (aproximadamente 6 a 60 cópias genômicas)

IMPORTANTE: Resultado de PCR negativo nem sempre indica ausência total de "C. psittaci", pois uma ave infectada pode manter o organismo de forma intermitente. Portanto, em casos de suspeita de clamidiose os testes devem ser repetidos com nova amostra.

Para o período pesquisado não foi encontrada a presença do agente em agropecuárias, porém ressalta-se que a clamidiose é liberada intermitentemente nas fezes^{9; 12; 13} podendo as aves apresentarem sinais clínicos ou assintomáticos.

Discussão

Devido a criação de aves exóticas como animais de estimação estar crescendo em todo o mundo, no Brasil ganha maior dimensão pela sua grande biodiversidade, o que torna o comércio de animais silvestres e exóticos uma demanda crescente.

Segundo o Art. 1º - A Instrução Normativa Ibama 03/2011, de 1º de abril de 2011 algumas espécies silvestres podem ser comercializadas legalmente, seguindo o decreto do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), órgão governamental do Brasil responsável por fiscalizar a fauna silvestre nacional e exótica, garantindo que as aves sejam vendidas por criadouros comerciais autorizados.

Com o crescimento das criações desses animais, além da proximidade do ser humano com essas aves, há a necessidade de um estudo e uma vistoria mais ampla sobre as doenças zoonóticas, principalmente àquelas que cursam com uma fase subclínica.

Para o presente estudo, foi observado: a quantidade de aves por gaiolas, influências climáticas e o trânsito de aves sinantrópicas como pombos e pardais, que são transmissores do agente bacteriano.

Para corroborar a dificuldade de encontrar a bactéria em animais hígidos, foi realizada uma pesquisa em 2013, onde foram analisadas 106 calopsitas. Avaliou-se fisicamente os animais: escore corporal, inspeção visual, palpação das penas e sistema musculoesquelético, além da inspeção visual das narinas, cloaca, olhos, ouvidos e cavidade oral. Todos os animais eram pesados antes do início da coleta e foram avaliados também aparência e comportamento do animal⁹. Nesses casos houve a realização de exames de hemograma e bioquímico.

Na referida pesquisa, as amostras foram recolhidas da cloaca e orofaringe e o resultado foi que apenas em uma ave foi encontrado o agente, pelo swab oral, enquanto o swab cloacal da ave apresentou resultado negativo.

A pesquisa realizada pela UNB, mostrou que não houve proliferação em animais que foram atendidos, seja de criadouros, agropecuárias ou de residência. O presente estudo mostra que não há incidência da doença em agropecuárias consequentemente sem proliferação¹². As amostras analisadas foram apenas de um dia, sabendo que a ave

tem a liberação do agente intermitente.

No presente estudo, o exame realizado foi de alta especificidade pela técnica de PCR, devido a sua alta acurácia. Por isso, um resultado falso negativo é improvável, mesmo porque a quantidade de fezes coletadas por gaiola foi representativa, assim como a quantidade de animais. Associado a esse fato, o número variado de regiões administrativas pesquisadas. Mesmo assim, não houve relato do agente em agropecuárias.

Conclusão

A referida patologia não possui profilaxia por vacinação, por isso, o único método profilático são os exames preventivos, como também a sanidade no ambiente, viveiros com baixa população e principalmente a procedência da ave. A detecção da doença é viável por meio específico com o exame de PCR, por sua alta precisão em animais subclínicas.

Na presente pesquisa não houve a incidência do agente em Agropecuárias do DF no período pesquisado, porém não se descartam cuidados de manejo, pois, uma vez o agente sendo encontrada no ambiente, pode ser disseminado rapidamente, principalmente se estiver na sua forma subclínica, quando a ave não aparenta sinais.

Agradecimentos

Ao Centro Universitário ICESP por intermédio do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa – NIP, por meio do apoio institucional e financeiro.

Referências

1. Revolledo L, Ferreira AJP. Clamidiose aviária. *Patologia Aviária*. Barueri: Manole, 2009; p.367-373.
2. Raso TF, Junior AB, Pinto AA. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrots in Brazil. *J Zoo Wildl Med.*, 2002 vol. 33, n.2, p.118-121.
3. Calnek BW, Jonh BH, Beard CW, Reid WM, Yoder HW. DISEASES OF POULTRY, ninth edition, Chlamydiosis (Ornithosis), 1991; cap. 14, p.311-325.
4. Morange A. De la psittacose, or infection speciale determinee par desperruches. Academie de Paris, France, 1895.
5. Andersen AA, Vanrompay D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: SAYF, Y.M. Disease of poultry. 11. ed. Ames: Iowa State University, 2003, p.863-879.
6. Harkinezhad T. et al. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. *Vet. Microbiol.* 2009, v. 135, p.68-77.
7. Kaleta EF, Taday MA. Avian host range of *Chlamydophila spp.* based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, v. 32, n.5, 2003, p.435-462,
8. Andersen AA, Vanrompay D. Avian Chlamydiosis (psittacosis, ornithosis). In: SAYF, Y.M. Disease of poultry. 11. ed. Ames: Iowa State University, p.863-879.
9. Degraeves FJ, Gao D, Kaltenboeck High-sensitivity quantitative PCR platform. *Biotechniques*, vol. 34, n. 1, 2003 p.106 –115.
10. Moulder JW. Interaction of Chlamydia and host cells in vitro. *Microbiological Reviews*, v.55, 1991 p.143-190.
11. Vasconcelos TCB. et al. *Chlamydophila psittaci* em aves silvestres e exóticas: Uma revisão com ênfase em saúde pública. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, v. 9, n. 16, 2013, p. 2462 2477.
12. Silva SS. Avaliação clínica, laboratorial e detecção de *Chlamydophila Psittaci* em calopsitas (*Nymphicus Hollandicus*) do distrito federal, Brasil. Dissertação de mestrado em saúde animal. Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.
13. Vanrompay D. et al. *Chlamydia psittaci* infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*
14. Longbottom D, Coulter LJ. Animal Chlamydiosis and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, v.128, 2003, p.217-244.
15. Hewinson RG. et al. Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*. n. 54, 1997 p. 155 – 166.