

Eficácia do tratamento da *Chlamydophila psittaci* com doxiciclina na água por 21 dias em papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*). =20 (20)

#### RESUMO:

*Chlamydophila psittaci* foi identificado por ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras fecais de papagaios-de-peito roxo (*Amazona vinacea*). Para determinar a eficácia de 21 dias de terapia com hclato de doxiciclina as aves receberam 625 mg/L em água potável diariamente. Exames clínicos e hematológicos foram realizados antes e após o tratamento. Durante o período de tratamento, as aves foram observadas diariamente. Para as concentrações plasmáticas de doxiciclina amostras de sangue foram coletadas no dia 14 e 21 do tratamento. Não foram observados efeitos adversos a terapia. Embora as mensurações das concentrações plasmáticas de doxiciclina deste estudo não terem sido concluídas até o presente momento, a incapacidade para detectar *C psittaci* ao final do tratamento e o retorno dos valores hematológicos a normalidade sugerem que o mesmo tenha sido bem sucedido. Os resultados deste estudo corroboram que a doxiciclina na água potável pode oferecer um método seguro e prático para tratar *Amazona vinacea* infectado com *C psittaci*. Estudos adicionais são necessários para avaliar a eficácia destes tratamentos em outras espécies de aves. = 987 (1000)

**PALAVRAS-CHAVE:** clamidiose; psitacose; zoonose aviária; psitacídeos.

**INTRODUÇÃO:** A infecção por *Chlamydophila psittaci*, uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória<sup>1</sup>, é causa comum de morbidade e mortalidade em psitacídeos e uma das principais zoonoses de origem aviária<sup>2-6</sup>. A doença, especialmente em portadores assintomáticos, é de difícil diagnóstico<sup>7</sup> assim como o tratamento, fatores que contribuem para a alta incidência do agente em aves de vida livre e cativo<sup>3, 8-9</sup>.

As tetraciclina são as drogas mais eficazes para o tratamento da *C psittaci*<sup>10, 11</sup>, no entanto, são bacteriostáticos e presumivelmente mais eficiente quando a bactéria está replicando. Isto porque o agente pode permanecer latente dentro das células hospedeiras<sup>4,5,12</sup>, e portanto períodos de tratamento de 30-45 dias são recomendados<sup>6, 10,11</sup>. Este prolongamento no tempo de tratamento dificulta a administração de drogas, especialmente quando há um grande número de aves a serem medicadas. A redução do período de tratamento e a praticidade do uso de água medicada como via de administração, provavelmente aumenta a adesão e assegura um tratamento bem sucedido de um agente patogénico potencialmente zoonótico. Em estudo de infecção experimental com *C psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) é relatada a eficácia do tratamento de 21 dias com doxiciclina na água<sup>13</sup>.

A doxiciclina é uma tetraciclina semi-sintética que tem várias vantagens quando comparados com outras tetraciclina. Este fármaco é completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal com menos efeitos deletérios sobre a flora normal porque é parcialmente excretado como um conjugado inativo nas fezes, o que evita ciclo entero-hepático, tem menor afinidade para a quelação de cálcio, tem uma melhor distribuição nos tecidos, e tem uma meia-vida e conseqüente eliminação prolongada<sup>14-16</sup>. Em psitacídeos concentrações plasmáticas  $\geq 1$  mg/ml foram consideradas adequadas para inibir a replicação<sup>4, 17-20</sup>.

Várias formas de administração da doxiciclina têm sido exploradas para atingir essa concentração mínima inibitória com as vantagens e desvantagens de cada método. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia no combate a *C psittaci*, fornecendo água medicada para psitacídeos da espécie *Amazona vinacea* em um período de 21 dias. =1897 (2000)

**MATERIAL E MÉTODOS:** Os 35 papagaios-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) (pesando 365g ± 20g) envolvidos neste estudo foram na maioria vítimas do tráfico ilegal de animais selvagens e destinados a um projeto de reintrodução da espécie que está enquadrada em perigo de extinção categoria C2a(i), ou seja, estimativa de até 2500 indivíduos adultos, em declínio populacional contínuo e com subpopulações de até 250 aves adultas<sup>21</sup>. A falta de informações sobre o histórico dessas aves impossibilitou a identificação da idade, e o sexo ainda não foi determinado.

As aves foram isoladas em grupos conforme a origem e assim o grupo 1 foi alojado em dois viveiros (3,9m l x 2,7m c x 4m a), contendo 9 e 8 animais e o grupo 2 foi alojado em quatro gaiolas (0,8m l x 2,0m c x 0,9m a) com 3, 4, 4 e 5 indivíduos cada em ambiente protegido. As aves eram alimentadas com frutas da estação, ração para psitacídeos e mistura de sementes, incluindo *Araucaria angustifolia* in natura. Água fresca era fornecida diariamente e *ad libitum*.

Exames clínicos e laboratoriais incluindo hemograma e bioquímica sérica foram realizados antes e após o tratamento. Para as análises hematológicas os animais foram contidos fisicamente, e seguindo metodologia proposta por Campbell e Ellis<sup>22</sup> 1,5 ml de sangue foi coletado com seringas 30 x 12,7 mm por venipunção braquial, onde 0,6 ml foram utilizados para a bioquímica e o restante para o hemograma. Os tubos de armazenamento a vácuo continham heparina 1%. Esfregaços sanguíneos foram realizados para complementar a avaliação dos parâmetros hematológicos. Todas as amostras foram refrigeradas e enviadas ao laboratório de análises. Os parâmetros avaliados foram no eritrograma: eritrócitos totais, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (CHM) e amplitude de distribuição das hemácias (RDW) e no leucograma: contagem das células brancas (WBC), contagem diferencial das células brancas (basófilos, eosinófilos, heterófilos, linfócitos e monócitos) e trombócitos. Em relação aos parâmetros de bioquímica sérica foram avaliados Aspartato Aminotransferase (AST), ácido úrico, proteína plasmática total (PPT).

As aves também foram testadas antes e após o tratamento através de amostras fecais para a presença de *C psittaci* por teste comercial-PCR onde a reação utilizou primers de oligonucleotídeos específicos para amplificação de uma porção de 264 pb do gene da “principal proteína externa de membrana” – major outer membrane protein (MOMP) da *C psittaci*. As amostras foram coletadas e armazenadas em coletor universal onde foram enviadas ao laboratório de análise.

As aves que tiveram detectada a presença da *C psittaci* permaneceram isoladas e receberam água medicada com hiclato de doxiciclina (625 mg/L) durante 21 dias sendo monitoradas diariamente quanto à presença de rinite, dispneia, conjuntivite, depressão e diarreia.

No 14 e 21 dias de tratamento amostras de sangue (1-2 ml) foram coletadas para a mensuração da concentração plasmática de doxiciclina. As amostras foram centrifugadas e o plasma separado dentro de 1 hora após a coleta. Os plasmas para a análise da doxiciclina foram armazenadas a -80° C. A concentração de doxiciclina será então mensurada por cromatografia de fase reversa líquida de elevado rendimento, como descrito previamente<sup>23</sup>. Para avaliar a possibilidade de persistência da *C psittaci* pós-tratamento as aves ao serem transportadas por 3 horas para um novo viveiro em ambiente inédito passaram por observações diárias quanto aos sinais de clamidiose.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio- protocolo 25133-2) e pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA-UFSC protocolo PP00589). = 3202 (4000)

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** As aves não demonstravam sinais clínicos evidentes de

clamidiose. Sendo relatado pelos tratadores somente a ocorrência de espirros no grupo 2 antes do tratamento. Entretanto, as aves do grupo 2 foram positivas para *C psittaci* e ao término da terapia de 21 dias com doxiciclina foram negativas ou não houve eliminação de ácido nucleico a níveis detectáveis ao PCR. O teste de PCR pode ser considerado o mais sensível e específico disponível comercialmente podendo fornecer inclusive resultados rápidos<sup>24-26</sup>.

A doxiciclina é o antibiótico de escolha para o tratamento da clamidiose aviária por alterar a replicação, o crescimento e a cisão dos corpos reticulados e possivelmente, a reorganização dos corpos elementares<sup>5</sup>. Embora as mensurações das concentrações plasmáticas de doxiciclina deste estudo não terem sido concluídas até o presente momento, a incapacidade para detectar *C psittaci* na coleta após o tratamento sugere que o mesmo tenha sido bem sucedido. A experiência clínica indica que a resolução da infecção por *Chlamydophila*, na maioria das aves é alcançada quando o tratamento mantém as concentrações plasmáticas de doxiciclina perto de 1 mg/ml<sup>27</sup>. Todavia, é relatado também que concentrações plasmáticas de doxiciclina menores e mais variáveis do que as publicados para psitacídeos<sup>27,28</sup>, foram eficazes na resolução da infecção em papagaios (*Amazona viridigenalis*)<sup>29</sup> e pombos (*Columba livia*)<sup>30</sup>. No entanto, nenhum esquema de tratamento antimicrobiano pode garantir o sucesso do tratamento, pois isso depende também da atividade do sistema imune do hospedeiro<sup>5</sup>.

Alterações na patologia clínica associadas a clamidiose incluem leucocitose acentuada (2 a 3 vezes o normal), heterofilia, monócitos, eosinófilos e basófilos normais e Ht reduzido (20 a 30%)<sup>22,3</sup>. Os valores observados na tabela 1 possibilitam identificar uma reversão para a normalidade desses parâmetros após o tratamento com doxiciclina em referência também aos valores das aves negativas para *C psittaci*.

In vitro, esta droga não é eficaz no tratamento de células infectadas persistentemente em que o organismo não é replicante<sup>5</sup>. Mudanças ambientais ou infecções simultâneas podem ativar infecções persistentes por estresse e consequente imunossupressão, que resultam em doença clínica<sup>5,31</sup>. Neste estudo não foram observados sinais clínicos de clamidiose mesmo depois de mudanças ambientais importantes. Da mesma forma, em infecção por *C psittaci* em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) onde corticosteróides foram utilizados para induzir a presumida imunossupressão após 21 dias de tratamento com doxiciclina não houve reativação da infecção ou eliminação a níveis detectáveis<sup>13</sup>. Entretanto, as aves que se recuperam de infecções por *C psittaci* são suscetíveis à reinfeção, e resultados de estudos que sugerem a possibilidade de uma infecção persistente podem na verdade estar diante de uma reinfeção em vez de reativação de uma infecção quiescente.

Aves em tratamento com doxiciclina devem ser monitorados quanto a sinais de intoxicação, incluindo letargia, inapetência, inatividade, urina passando de amarelo a verde e aos sinais de efeitos adversos associado à terapia sendo em aves a regurgitação e vômito os mais comuns<sup>27</sup>. Em nenhuma das aves tratadas foram identificados efeitos adversos ou anormalidade de atitude, aparência, alteração de urina ou fezes durante as observações diárias. Entretanto, foi identificado um aumento de 40% no valor da AST (dados não mostrado) após o tratamento. Aumento este que é relatado também com o uso de doxiciclina em papagaio-cinza-africano (*Psittacus erithacus timneh*) sem maiores efeitos adversos<sup>27</sup>.

Quando se seleciona um regime de tratamento para um paciente com clamidiose, vários fatores devem ser considerados além da duração do tratamento e do tipo de droga. Tradicionalmente, a água potável não tem sido recomendado como um veículo para medicar psitacídeos porque essas aves podem ingerir menor quantidade de água medicada devido a alteração do sabor ou por assumirem padrões erráticos de consumo de água. Frutas e outras fontes vegetais podem fornecer uma grande percentagem da ingestão diária de líquidos, diminuindo assim o consumo global de água potável. Este protocolo foi realizado

com uma formulação específica de doxiciclina (doxiciclina hclato) em condições ambientais controladas, e em aves alimentadas com uma dieta equilibrada. Em situações clínicas, mudanças de temperatura, umidade, e dieta poderia alterar o consumo de água, a absorção de doxiciclina, ou ambos, e, assim, alterar as concentrações plasmáticas da droga. Concentrações tóxicas também podem ser obtido em aves alojadas em climas quentes, ao ar livre onde o consumo de água é maior. = 3996(4000)

#### CONCLUSÕES:

O tratamento com doxiciclina na água (0,625 mg/ml) durante 21 dias é eficaz na eliminação da *C psittaci* em *Amazona vinacea*. A água potável como via de administração é alternativa prática e o tempo necessário para o tratamento pode ser reduzido de forma significativa, métodos que podem aumentar a aderência, reduzir o estresse do tratamento sobre as aves, reduzir a possibilidade de reações indesejáveis, diminuir a quantidade de antimicrobianos ambientalmente, e reduzir o custo do tratamento.

Embora isso seja encorajador, as limitações devem ser consideradas antes de uma extrapolação indiscriminada. As medidas sanitárias são fundamentais para erradicar a infecção e para evitar a reinfecção. Tratamento subterapêutico pode levar a geração de cepas resistentes de *C psittaci*. Infecções crônicas ou persistentes podem ser mais difíceis de erradicar e exigem maior tempo de tratamento. Finalmente, aves alojadas em condições precárias ou alimentados com dietas deficientes podem mostrar resultados diferentes. As aves deste estudo poderão ser novamente testadas para avaliar a ocorrência de uma reinfecção ou reativação da doença. = 967 (1000)

#### REFERÊNCIAS:

1. Everett KDE, Bush RM, Andersen AA. 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1999;49:415–440.
2. Fudge AM. Avian chlamydiosis. In: Roskopf WJ, Woerpel R, editors. *Diseases of Cage and Aviary Birds*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1996. p.572–585.
3. Flammer K. Chlamydia. In: Altman RB, Clubb SL, Dorrestein GM, Quesenberry K, editors. *Avian Medicine and Surgery*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1996. p.364–379.
4. Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F. Chlamydia psittaci infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*. 1995;45:93–119.
5. Gerlach H. Chlamydia. In Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, editors. *Avian Medicine, Principles and Application*. Lake Worth, FL: Wingers Publishing; 1994. p.984–996.
6. Johnston WB, Eidson M, Smith KA, Stobierski MG. Compendium of chlamydiosis (psittacosis) control. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1999;214:640–646.
7. Fudge AM. A review of methods to detect Chlamydia psittaci in avian patients. *The Journal of Avian Medicine and Surgery*. 1997; 11:153–165.
8. Raso, TF. Chlamydophila psittaci em psitacídeos de vida livre e cativo e suas implicações à saúde pública. [Tese Doutorado]. Jaboticabal: Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2004. 79f.
9. Raso TF, Seixas GH, Guedes NM, Pinto AA. Chlamydophila psittaci in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Veterinary Microbiology*. 2006; 117: 235-241.
10. Wachendorfer JG. Epidemiology and control of psittacosis. *Journal of American Veterinary*

- Medical Association. 1973;162:298–303.
11. Arnstein P, Buchanan WG, Eddie B, Meyer KF. Control of psittacosis by group chemotherapy of infected parrots. *American Journal of Veterinary Research*. 1968;11:2213–2227.
  12. Wyrick PB, Richmond SJ. Biology of chlamydiae. Reports from the Symposium on Avian Chlamydiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1989;195:1507–1512.
  13. Guzman DS-M, Diaz-Figueroa O, Tully T Jr, Ciembor PM. Evaluating 21-day doxycycline and azithromycin treatments for experimental *Chlamydophila psittaci* infection in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2010; 24:35-45.
  14. Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF. Antimicrobial agents—tetracycline, chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, NY: McGraw-Hill; 1996. P.1123–1153.
  15. Shaw DH, Rubin SI. Pharmacologic activity of doxycycline. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1986;189:808–810.
  16. Riond JL, Riviere JE. Pharmacology and toxicology of doxycycline. *Veterinary and Human Toxicology*. 1988;30:431–443.
  17. Gylsdorff L. The treatment of chlamydiosis in psittacine birds. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 1987;43:11–19.
  18. Teichmann B, Gerlach H. Bloodlevels in cockatiels after parenteral administration of minocycline and doxycycline. *Prakt Tierarztl*. 1976;57:87–93.
  19. Jakoby JR, Gylstorff I. Comparative investigations of chemotherapeutic psittacosis control [in German]. *Berlin Munch Tierarztl Wochenschr*. 1983;96:261–264.
  20. Prus SE, Clubb SL, Flammer K. Plasma concentrations of doxycycline achieved by feeding a medicated diet in macaws. *Avian Diseases*. 1992;36:480–483.
  21. IUCN, International Union for Conservation of Nature, 2012.1. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em URL: <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>. Acessado em 9 de julho de 2012.
  22. Campbell TW, Ellis CS. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3th ed. Iowa: 2007.
  23. Powers LV, Flammer K, Papich M. Preliminary investigation of doxycycline plasma concentrations in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) after administration by injection or in water or feed. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2000;14:23–30.
  24. Celebi BS, Ak S. A comparative study of detecting *Chlamydophila psittaci* in pet birds using isolation in embryonated egg and polymerase chain reaction. *Avian Diseases*. 2006;50:489-493.
  25. Trevejo RT, Chomel BB, Kass PH. Evaluation of the polymerase chain reaction in comparison with other diagnostic methods for the detection of *Chlamydia psittaci*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1999;11: 491-496.
  26. Domeika M, Ganusauskas A, Bassiri M, Froman G, Mardh PA. Comparison of polymerase chain reaction, direct immunofluorescence, cell culture and enzyme immunoassay for the detection of *Chlamydiopsittaci* in bull semen. *Veterinary Microbiology*. 1994;42:273-280.
  27. Flammer K, Whitt-Smith D, Papich M. Plasma Concentrations of Doxycycline in Selected Psittacine Birds When Administered in Water for Potential Treatment of *Chlamydophila psittaci* Infection. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2001; 15:276–282,
  28. Dorrestein GM, Welink J, Haagsma N. Pharmacokinetic differences for doxycycline between racing pigeons (*Columba livia*) and collared doves (*Streptopelia decaocto*) and the effect of a *Salmonella* infection. *Tagung uber Vogelkrankheiten*. 1990;132–143.
  29. Gylstorff I, Jakoby JR, Gerbermann H. Comparative studies of psittacosis control on a drug basis. Efficacy trial of different drugs in different dosage forms in experimentally infected parrots (*Amazona viridigenalis*) [in German]. *Berlin Munch Tierarztl Wochenschr*. 1984;97:91-

99.

30. Padilla L, Flammer K, Miller RE. Doxycycline-Medicated Drinking Water for Treatment of *Chlamydophila psittaci* in Exotic Doves. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2005;19:88–91.
31. Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiological Reviews*. 1994;58: 686-699.
32. Delaney CAJ. *Exotic Companion Medicine Handbook for Veterinarians*. Zoological Education Network, Florida: 1996.
33. Harris, DJ. Laboratory testing in pet avian medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 1991; 21: 1166-1167.

=5364 (?)