

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO DE *Salmonella* sp., *Mycoplasma* spp. E
Escherichia coli DE AVES SINANTRÓPICAS DA REGIÃO
METROPOLITANA DE GOIÂNIA-GOIÁS**

Hilari Wanderley Hidas
Orientadora: Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA
2013



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Hilari Wanderley Hidas** E-mail: **hhidasi@yahoo.com.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: **Zoológico Municipal de Guarulhos** Agência de fomento:

País: **Brasil** UF: **SP** CNPJ: **46319000/0001-50** Sigla: **ZMG**

Título: **Deteção de Salmonella sp., Mycoplasma spp. E Escherichia coli de aves sinantrópicas da região metropolitana de Goiânia-Goiás** Palavras-chave: **colibacilose, micoplasmose, pombos, salmonelose, urubus, virulência**

Título em outra língua: **Detection of Salmonella sp., Mycoplasma spp. and Escherichia coli of sinantropic birds in the metropolitan area of Goiânia-Goiás**

Palavras-chave em outra língua: **Colibacillosis, micoplamosis, pigeons, salmonelosis, vulture, virulence.**

Área de concentração: **Sanidade Animal Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **12/04/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Programa de pós graduação em Ciencia Animal**

Orientador(a): **Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@ufg.br**

Co-orientador(1): **Valéria de Sá Jayme** E-mail: **valeria.mg@uol.com.br**

Co-orientador(2): **Guido Fontgalland Coelho Linhares** E-mail: **guidofcl@gmail.com**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 6 de fevereiro de 2014


 Hilari Wanderley Hidas
 Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

HILARI WANDERLEY HIDASI

DETECÇÃO DE *Salmonella* sp., *Mycoplasma* spp. E *Escherichia coli* DE AVES SINANTRÓPICAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA-GOIÁS

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás

Área de Concentração:
Sanidade Animal Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade – UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares – UFG

Prof. Dr. Valéria de Sá Jayme – UFG

GOIÂNIA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

H632d	<p>Hidasi, Hilari Wanderley. Detecção de Salmonella sp., Mycoplasma spp. e Escherichia coli de aves sinantrópicas da região metropolitana de Goiânia-Goiás [manuscrito] / Hilari Wanderley Hidasi. - 2013. 114 f. : figs, tabs.</p> <p>Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013. Bibliografia.</p> <p>1. Aves. 2. Salmonelose aviaria. 2. Micoplasmose. 3. <i>Escherichia coli</i>. I. Título.</p> <p>CDU: 636.6</p>
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

À minha rainha, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À muitos tenho que agradecer por ter chegado até aqui!

À Deus por ter tornado tudo isso possível.

À toda minha família, minha mãe Solanita, meu pai José Hidasí, meus irmãos, Christine, Ayra, Zezinho, e minha irmãzinha Barbara. Aos meus sobrinhos, Maria Rita e Kevin, meu cunhado João e minha futura colega e cunhada Patrícia. Ao meu avó, José Hidasí, pelo incentivo.

À Universidade Federal de Goiás - Escola de Veterinária e Zootecnia, pelos 10 anos de formação profissional, ao CNPq e ao MAPA pelo financiamento e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade, pela orientação, amizade, broncas e amor. Tenho certeza que foi Deus que te colocou no meu caminho.

Aos meus co-orientadores Valéria de Sá Jayme e Guido Linhares.

Aos alunos que me colaboraram na execução do projeto, Luiza Lucena Albuquerque, Anderson, Marcus, André e Marcos.

Às minhas colegas e amigas da pós graduação, Dunya, Sabrina, Hérika, Eliete, Ana Caroline, Fernanda, Juliana, Angélica e ao meu amigo e colega Osvaldo.

À equipe do Zoológico de Guarulhos, que me receberam de braços abertos e me ajudaram muito nessa etapa, muito obrigada à Cristiane, Cláudia, Rose, Gilberto, Fernanda, Thaís, Sandra, Amélia, Nilvan, Ferreira, Péricles, Renata, Marcelo, Valter e tantos outros, agradeço muito pela recepção e amizade.

À **TODOS** os meu amigos veterinários de animais silvestres espalhados pelo mundo.

À minhas amigas Illa, Gabi, Lara, Carol e Flavinha, muito obrigada pela grande amizade e suporte.

Agradecimento especial aos animais do experimento.

Muito Obrigada!!!!!!

“Se voce pode sonhar, voce pode fazer.”
Walt Disney

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 AVES SINANTRÓPICAS	3
2.2 SALMONELOSE.....	6
2.3 MICOPLASMOSE	8
2.4 <i>Escherichia coli</i>	101
2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS.....	106
REFERENCIAS.....	18
CAPITULO 2 - DETECÇÃO DE <i>Salmonella enterica</i> EM AVES SINANTRÓPICAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIANIA-GO	30
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS.....	40
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO 3: <i>Mycoplasma gallisepticum</i> E <i>M. synoviae</i> EM POMBOS COMUNS (<i>Columba livia</i>) E URUBUS DE CABEÇA PRETA (<i>Coragyps atratus</i>) NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA	55
INTRODUÇÃO	54
MATERIAL E MÉTODOS	57
RESULTADOS.....	61
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	69
CAPITULO 4 – DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE <i>Escherichia coli</i> E PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE AVES SINANTRÓPICAS ...	80
INTRODUÇÃO	76

MATERIAL E MÉTODOS	79
RESULTADOS.....	90
DISCUSSÃO	89
CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS.....	101
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103

RESUMO

Aves sinantrópicas aproximam-se de atividades humanas em busca de abrigo, água e alimento, podendo percorrer grandes distâncias para tanto. Em busca de informações acerca da importância dessas aves na transmissão de agentes patogênicos de importância na avicultura comercial, foi realizado estudo com 260 aves de comportamento sinantrópico, sendo 200 pombos comuns (*Columba livia*) e 60 urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*), na região metropolitana de Goiânia - Goiás. Foram colhidas amostras de fezes, soro e suabes traqueais que foram submetidos a testes para detecção de *Salmonella* sp. por bacteriologia convencional e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (rPCR), *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae* pela Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR) e rPCR, além de isolamento de *Escherichia coli* pela bacteriologia convencional com detecção de genes de virulência de *E. coli* patogênica para aves (APEC) pela PCR e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados. Os resultados observados, na pesquisa de *Salmonella* sp. das amostras de pombos, 13% (26/200) foram positivas no exame bacteriológico e 27% (54/200) das amostras positivas no rPCR. Do total de 60 amostras obtidas dos urubus, nenhuma amostra foi positiva no bacteriológico convencional e 8,3% (5/60) foram positivas no rPCR. Para a pesquisa de *Mycoplasma*, das amostras colhidas dos pombos, 7,5% (15/200) amostras foram reativas no teste sorológico, sendo 4,5% (9/200) positivas para *M. gallisepticum* e 3% (6/200) para *M. synoviae*. Já no rPCR, 2,5% (5/200) foram positivas para *M. gallisepticum*. Das amostras colhidas dos urubus, nenhuma foi positiva nos dois testes aos quais foram submetidas. Foi isolado *E. coli* das excretas e detectado pela PCR os genes de virulência *papC*, *tsh*, *iuc* e *iss*, com resultado para amostras de pombos de 11,23% (20/178) para *iuc*, 2,24% (4/178) *papC*, 11,79% (21/179) *tsh* e 6,17% (11/178). Para urubus 8,16% (4/49) *iuc*, 14,28% (7/49) *tsh*, 6,12% (3/49) *iss*, e nenhuma positiva para *papC*. Adicionalmente, os isolados de *E. coli* foram submetidos a teste de perfil de resistência à antibióticos em que se obteve: sulfametazina 122/178 (68,53%), ampicilina 130/178 (73,03%), ciprofloxacina 40/178 (22,47%), apramicina 57/178 (32,02%), sulfametropin 110/178 (61,79%), enrofloxacina 71/178 (39,88%), tetraciclina 119/178 (66,85%), sulfonamida 123/172 (69,10%), neomicina 59/178 (33,14%), doxaciclina 67/178 (37,64%), oxitetraciclina 51/178 (28,65%), gentamicina 42/178 (23,59%), ceftiofur 79/178 (44,38%), amoxicilina + ac. clavulânico 92/178 (51,68%) de resistência nas amostras isoladas de pombos, e em amostras isoladas de urubus: sulfametazina 36/49 (73,46%), ampicilina 39/49 (79,59%), ciprofloxacina 12/49 (24,48%), apramicina 9/49 (18,36%), sulfametropin 30/49 (61,22%), enrofloxacina 7/49 (14,28%), tetraciclina 27/49 (55,10%), sulfonamida 32/49 (65,30%), neomicina 12/49 (24,48%), doxaciclina 11/49 (22,44%), neomicina 9/49 (18,36%), oxitetraciclina 11/49 (22,44%), gentamicina 10/49 (20,40%), ceftiofur 12/49 (24,48%), associação de amoxicilina e ácido clavulânico 31/49 (63,26%) de resistência. Os resultados sugerem que essas aves de comportamento sinantrópico, são potenciais veiculadores de agentes causadores de perdas na produção avícola e preocupantes para a saúde pública. Além disso, podem constituir em suporte de transferência de fenótipos de *E. coli* resistentes.

Palavras-chave: colibacilose, micoplasmose, pombos, salmonelose, urubus, virulência.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Dentro do processo de ocupação e exploração do ambiente pelo homem, uma série de consequências deletérias são atribuídas a essas ações. Entre os impactos provenientes das atividades urbana, industrial e agrícola, inclui-se a multiplicação de animais indesejáveis que são atraídos pelos produtos das atividades humanas em busca de abrigo, água e alimento, estabelecendo, portanto, uma relação de sinantropia.

Aves sinantrópicas podem albergar e veicular agentes infecciosos que potencialmente afetam tanto a saúde humana, como a saúde animal. Possuem grande mobilidade e podem vir a voar longas distâncias em busca de alimento, contaminando o ambiente em que passam com suas excretas.

Dentre as aves de vida livre com comportamento sinantrópico estão vastamente distribuídos os pombos domésticos (*Columba livia*) e os urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*). Os pombos são da ordem columbiforme, representada por pombas, rolas, juritis e afins. As aves desta ordem possuem morfologia homogênea e singular, cabeça pequena e redonda, com bico frágil. O pombo doméstico é considerado um problema ambiental por competir por alimento com as espécies nativas e de importância sanitária e por ser um potencial veiculador de doenças para humanos e animais. Já os urubus são aves da ordem dos cathartiformes e é uma das aves mais comuns em qualquer região do país, exceto em áreas florestadas com pouca presença humana. Vivem em grupos, alimentam-se de carcaças de animais e outros materiais em decomposição e, pela proximidade com humanos e animais, também é uma espécie que gera preocupação sanitária, inclusive para a cadeia produtiva animal.

Na avicultura industrial, o controle sanitário é realizado por meio de rigorosas medidas de biossegurança, com o propósito de evitar a entrada de agentes patogênicos na criação. Para tanto, preconiza-se, entre outras medidas, evitar o contato entre as aves de produção e aves de vida livre.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu através da Portaria Ministerial nº193 de 19 de setembro de 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) com o objetivo de garantir a qualidade dos produtos de origem avícola sanitariamente controlados, disponíveis nos mercados externo e interno. Este programa prevê normas de controle e/ou erradicação da salmonelose, doença de Newcastle e micoplasmose. Além de outras medidas, o Programa preconiza o monitoramento dos plantéis de reprodução para a certificação de núcleos e granjas avícolas como livres de *Salmonella enterica* sorotipo Gallinarum e de *Salmonella enterica* sorotipo Pullorum e livres ou controlados para *Salmonella entérica* sorotipo Enteritidis e sorotipo Typhimurium, bem como controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. melleagridis*) em todas as unidades federativas do Brasil. Entretanto, nenhum controle é realizado na população de aves de vida livre, mesmo constituindo potencial fonte de infecção para aves industriais.

Além dos agentes infecciosos contemplados no PNSA, outro microrganismo responsável por grandes perdas econômicas é a *Escherichia coli*, sendo considerado o agente patogênico de maior importância na avicultura em todo mundo. Por muito tempo julgou-se que a *E. coli* seria apenas agente comensal, sem nenhum potencial patogênico. Com o passar do tempo, cepas de *E. coli* foram relacionadas à várias patologias, sendo atualmente alvo de estudos em todo o mundo. A patogenicidade das cepas de *E. coli* é atribuída à diferentes conjuntos de genes que lhes conferiram a capacidade de ocasionar doença, fato que determina grande versatilidade patogênica. Por se tratar de uma enterobactéria, a principal forma de transmissão desse agente é pela contaminação ambiental por fezes de animais portadores de cepas possuidoras de genes de patogenicidade, mesmo que comensais em seus hospedeiros.

Pelo potencial de aves sinantrópicas atuarem como portadores de agentes de importância para a produção avícola industrial, objetivou-se com este estudo investigar a ocorrência, em pombos e urubus, de *Salmonella* sp., *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, além da detecção de *E.*

coli e pesquisa de seus genes de virulência e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em aves sinantrópicas provenientes da região metropolitana de Goiânia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aves sinantrópicas

As aves sinantrópicas buscam o ambiente habitado, próximo ou modificado por humanos em busca de alimento e abrigo. Dentre as aves sinantrópicas mais populares no Brasil estão os pombos domésticos (*Columba livia*) e urubus de cabeça preta ou urubu comum (*Coragyps atratus*) (SICK, 2001; NUNES, 2003).

As aves do gênero *Columba* estão distribuídas por todo mundo, possuem muitas variações quanto à plumagem, com diferentes tamanhos e hábitos. São aves granívoras e frugívoras, vivendo em bandos. Destas, a mais conhecida é o pombo doméstico, principalmente pela sua proximidade com o homem (SICK, 2001).

Os pombos domésticos costumam habitar edificações elevadas, similares aos rochedos que habitam no ambiente natural. Essas aves são, de forma geral, monogâmicas e podem realizar de duas a três ovoposições a cada ano. Quanto maior é a oferta de alimento, maior a capacidade reprodutiva, levando à sua multiplicação descontrolada (SICK, 2001; NUNES, 2003; SCHULLER, 2012).

Os pombos estão amplamente disseminados, sendo comum a coabitação dessas aves com as criações comerciais de aves. Por ser uma ave de vida livre e possuir grande mobilidade, pode transmitir doenças para aves comerciais e em alguns casos ainda transmitir agentes patogênicos provenientes das aves de produção e contaminar outras populações de vida livre (CARRASCO, 2009). Estudos relacionam que cerca de 60 patógenos já foram encontrados, identificados e diagnosticados em pombos (HAAG-WACKERNAGEL & MOCH, 2004; VAZQUEZ et al., 2010).

Devido à grande quantidade dessas aves nos ambientes antropizados, foi instituída a Instrução Normativa nº141, de 19/12/2006,

pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) que regulamenta o controle e o manejo da fauna sinantrópica nociva, com os pombos fazendo parte desta lista.

Tais aves podem atuar como reservatórios de vários agentes patogênicos de importância para as criações comerciais de aves ou ainda de risco para a saúde pública (BENSKIN et al., 2009; CARRASCO et al., 2011). Na produção avícola, os pombos são atraídos principalmente pela oferta de alimentos, alimentando-se principalmente de grãos e sementes e por isso, muitas vezes competem por alimentos com aves de produção. Contaminam os depósitos de armazenamento de grãos, como silos, entrepostos, armazéns, fábricas de rações na busca por alimentos, podendo contaminar também fontes de água, assim como reservatórios, caixa d'água, bebedores e também o ambiente (FERREIRA, 2012).

Além disso, de acordo com SCHULLER (2003), os pombos se alimentam no chão e costumam pousar em locais elevados, precisando se deslocar frequentemente de um ponto para outro, e devido ao bater de asas da revoada, aumenta a suspensão de partículas secas, contendo pó, detritos e fezes secas, e assim, provocando uma maior dispersão dos agentes patogênicos.

Os urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*) são animais que por muitas vezes são discriminados, devido à sua aparência e o hábito necrófago (SICK, 2001, DEL HOYO et al, 2003). Os urubus, devido à grande degradação ambiental, muitas vezes encontram seu alimento no ambiente antropizado. No entanto, a importância ecológica destes animais vem sendo cada vez mais discutida, assim como sua preservação. Um declínio generalizado da população de urubus está ocorrendo em todo mundo (GANGOSO et al., 2009), sendo que dentre as principais causas destacam-se o grande uso de produtos farmacêuticos, as mudanças no meio ambiente e também o efeito de doenças infecciosas emergentes (RONDEAU & THIOLLAY, 2004).

A capacidade do urubu não se infectar com agentes patogênicos que comumente seriam letais a outras espécies animais traz muitos questionamentos. Muitas propostas já foram levantadas sobre particularidades anatômicas, imunológicas, fisiológicas e microbiológicas

(OCANDO et al., 1991; CARVALHO et al., 2003; LIMA et al., 2011). No entanto, pouco se sabe quanto a transmissibilidade de agentes infecciosos pelos urubus (SILVA et al., 2010).

Portanto, o maior problema relacionado com essas aves sinantrópicas são os microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos por elas, notadamente através das fezes. O deslocamento territorial de aves de vida livre portadoras de patógenos se constitui em um mecanismo de estabelecimento de novos focos endêmicos de agentes infecciosos em grandes distâncias dos locais onde foram adquiridos (ABULREESH et al., 2007; IKUNO et al., 2008). As excretas das aves podem contaminar os ambientes por onde passam e os agentes podem persistir desta forma por longos períodos (BARNES et al., 2003).

2.2 Salmonelose

As salmoneloses aviárias são enfermidades provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*. Mais de 2.610 sorovares desta bactéria já foram identificados (GUIBOURDENCHE et al., 2010), sendo todos potencialmente patogênicos para diferentes espécies animais. Para as aves apresentam maior importância, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *S. enterica* sorovar Enteritidis, que são potencialmente patogênicos para os humanos (GAST, 2003). Aves aparentemente saudáveis podem portar *Salmonella* no seu organismo se estabelecendo um *status* de portadoras inaparentes, e excretar o patógeno de forma intermitente. Aves de vida livre são apontadas como potenciais carreadoras de patógenos para criações comerciais sendo as aves sinantrópicas consideradas importantes nesta cadeia de transmissão visto sua grande proximidade com as atividades humanas (GOPEE et al., 2000).

A transmissão da *Salmonella* pode ocorrer de diversas maneiras, sendo a via oro-fecal a de maior importância. A ave pode adquirir a bactéria pelo contato indireto com outros animais infectados ou superfícies contaminadas, pela água ou alimento, ou pela inalação de partículas aerolizadas. Roedores, insetos e alguns helmintos podem servir como

carreadores da *Salmonella* sp. Animais com infecções crônicas são fontes de contaminação e aves de vida livre, podem ser carreadoras e servirem como reservatórios para animais mantidos em cativeiro (FRIEND, 1999; BROWN, 2000).

As aves têm sido alvo de diversas pesquisas sobre salmonelose em muitos países do mundo, com o enfoque em aves de produção com o objetivo de produzir alimentos seguros para humanos, pois esses agentes podem determinar quadros de toxinfecção no homem (LOPES, 2008).

O não tratamento adequado do esgoto ou esterco, associado a grandes aglomerações favorece o acúmulo e dispersão de salmonelas no ambiente. Isto por sua vez aumenta a probabilidade de animais de vida livre da região serem expostos, tornando-se portadores intestinais e dispersantes desta bactéria. Existe portanto uma correlação direta entre a prevalência de *Salmonella* no trato intestinal de várias espécies silvestres e a proximidade destas aves com pessoas e animais de produção, fato relatado em gaivotas e pombos, que com frequência aproveitam da proximidade com humanos e animais domésticos. Esta forma de exposição de aves silvestres à *Salmonella* raramente envolve doença clínica e a eliminação da bactéria pelas fezes na maioria dos casos é de curta duração (DAOUST & PRESCOTT, 2007).

Pesquisas em aves silvestres mostram que o carreamento de *Salmonella* é incomum, apresentando frequência de 0 a 1% em aves de vida livre, migratórias ou não migratórias (BRITTINGHAM et al., 1988; HIDASI et al, 2013). A maioria dos casos de carreamento de *Salmonella* intestinal nessas aves não é associada com doença clínica e, se não houver reinfecção, dura apenas algumas semanas. Este fato e a pequena quantidade de bactéria que normalmente é excretado por animais infectados, provavelmente, limitam a transmissão para outros do mesmo bando. De forma que aves jovens são, geralmente, mais suscetíveis à infecção por *Salmonella*, sendo ninhegos e aves recém emplumadas as mais predisponentes (DAOUST & PRESCOTT, 2007).

GUANG-ZHI et al. (2011) inocularam experimentalmente uma cepa de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em pombos e relataram que a mesma provocou alterações clínicas e patológicas, além da excreção do

agente pelas fezes, indicando que os pombos podem desenvolver a salmonelose e dispersar o agente no ambiente em que vivem. Os diferentes hábitos alimentares das espécies aviárias podem influenciar na ocorrência da *Salmonella*. Gaivotas, por exemplo, comumente albergam *Salmonella*, pois, aparentemente, contaminam-se devido ao contato com esgoto de humanos ou com outros ambientes com material fecal de animais. Possuem hábito gregário de alimentação e descanso em grandes bandos, o que facilita a dispersão do agente. Além disso, essas aves podem viajar longas distâncias para se alimentarem e assim contaminarem regiões próximas ou distantes (DAOUST & PRESCOTT, 2007).

2.3 Micoplasmose

As micoplasmoses são enfermidades causadas por micoplasmas, as menores bactérias conhecidas, com tamanho semelhante ao de grandes vírus. Os microrganismos do gênero *Mycoplasmas* são conhecidos como causadores de doenças em plantas, no homem e em outros animais. Nos animais, têm predileção pelas membranas mucosas e serosas, onde provocam problemas respiratórios, articulares e urogenitais (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009).

Nas aves, os micoplasmas são importantes patógenos, responsáveis por doenças respiratórias e articulares, acarretando grandes perdas econômicas na avicultura brasileira e mundial. A espécie de micoplasma que causa o maior impacto econômico é *Mycoplasma gallisepticum*, seguido de *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. meleagridis* (METTIFOGO & BUIM, 2009).

De acordo com WILLIAMS et al. (2002) esse agente foi detectado em muitas espécies aviárias e associado a enfermidades nos animais de produção, sugerindo-se que aves de vida livre podem ter papel na manutenção deste agente.

BOZEMAN et al. (1984) observaram mortalidade de 20% de um bando de papagaios verdadeiros, aparentemente causada por lesões de micoplasmas associadas a outras bactérias. Dos animais acometidos, os pesquisadores isolaram *M. gallisepticum* e *M. iowae*. Com as cepas

isoladas dos papagaios, um grupo de periquitos australianos e outro de frangos da raça Leghorn foram submetidos à infecção experimental. No grupo de periquitos australianos, todos os animais apresentaram aerosaculite e sorologia positiva para micoplasmose. Já os frangos não apresentaram nenhuma lesão de saco aéreo, entretanto, a sorologia foi positiva. Com o estudo, os autores levantaram a hipótese de que diferentes cepas de *M. gallisepticum* poderiam causar lesões mais graves em determinadas espécies.

Em pesquisa realizada por YAGIHASHI et al. (1988), a patogenicidade foi avaliada por inoculação em frangos SPF (specific pathogen free) a de cinco cepas de campo de *M. gallisepticum*, isoladas de diferentes hospedeiros aviários. Apenas duas cepas de campo causaram alterações no trato respiratório dos frangos.

Nos anos de 1994 e 1995, nos Estados Unidos, foi descrita uma epizootia de conjuntivite em tentilhões (*Haemorrhous mexicanus*) associada à infecção por *M. gallisepticum* que se espalhou pela região leste e oeste dos Estados Unidos (DHONDT, et al., 1998; DUCKWORTH et al., 2003; LEY et al., 2006). Acredita-se que no surto documentado, cerca de dez milhões de tentilhões tenham morrido (NOLAN et al., 2004). Existem evidências de que o *M. gallisepticum* tornou-se endêmico na população de tentilhões da região leste, embora a prevalência da enfermidade tenha diminuído, sugerindo que houve uma adaptação da bactéria em relação ao hospedeiro (LEY et al., 2006).

Após a detecção de *M. gallisepticum* nos tentilhões foi sugerido que as agregações de aves em comedouros coletivos são uma causa importante de epidemia de conjuntivite por *Mycoplasmaspp.*, pois as aves doentes podem depositar gotículas com patógenos nos comedouros, e então, promover a transmissão do agente de forma indireta, através de fômites (HARTUP et al., 2004).

Embora seja provável que aglomerações dessas aves em comedouros artificiais aumentem a transmissão do agente, a transmissão da forma leve da enfermidade por via de fômites pode servir para imunizar aves contra a ocorrência de infecções mais graves. Algumas aves desenvolvem anticorpos para *M. gallisepticum*, indicando a presença de

uma resposta imune, no entanto, sem evidências diretas de proteção (DHONDT et al., 2007).

Estudos baseados em polimorfismo de produto de DNA amplificado (RAPD) têm documentado a presença de um único perfil de RAPD, de *M. gallisepticum* isolados de tentilhões, sugerindo um único ponto de origem, que concorda com as observações epidemiológicas. Quando as sequências do DNA do *M. gallisepticum* dos tentilhões foram comparadas com as sequências de isolados de frangos e perus, algumas das amostras se aproximavam geneticamente com amostras de frangos ou às de perus, com maior proximidade genética com os isolados de frangos. Os resultados observados nestes estudos fortalecem a hipótese de que o surto teve uma única fonte pontual e que a evolução molecular resultou na variabilidade genotípica paralela (PILLAI et al., 2003).

Após a larga expansão da conjuntivite causada por *M. gallisepticum* em tentilhões, outras 31 espécies aviárias foram identificadas nos Estados Unidos como portadoras deste agente. Pesquisadores apontam os tentilhões como possíveis responsáveis pela transmissão deste microrganismo à outras espécies (HARTUP et al., 2001) . Acredita-se que outras aves de canto, além dos tentilhões, possam ser sensíveis a infecções e desenvolvimento de doença por *M. gallisepticum*, consecutivamente, podem ser potenciais reservatórios deste microrganismo (HARTUP et al., 2000; FARMER et al., 2005).

A micoplasmose também pode promover grande impacto no desenvolvimento corporal e também no sucesso reprodutivo das aves. NOLAN et al. (2004) documentaram que os animais adultos de ambos os sexos são capazes de transmitir a infecção para seus filhotes, provavelmente após o nascimento, sendo uma importante forma de disseminação do agente. Outros pesquisadores já haviam evidenciado que os ninhegos acometidos teriam atraso no desenvolvimento, além de proporcionar uma dispersão mais lenta dos filhotes de sua área natal (BRAWNER et al., 2000).

Além dos relatos de impacto ecológico na população de tentilhões, foi observada, no estado do Alabama-EUA, uma alta mortalidade de rolas-da-índia (*Streptopelia decaocto*) devido à infecção por micoplasma

associada a paramyxovírus, levando a um alto impacto ecológico também nesta espécie aviária (TORO et al., 2005).

No Brasil, em estudos com psitacídeos oriundos de um centro de triagem utilizando a técnica de PCR para a detecção de *M. gallisepticum*, obteve-se aproximadamente 70% (97/140) de positividade das aves examinadas. A alta frequência demonstrada reforça a importância do estudo deste agente em diferentes espécies aviárias, devido à importância clínica e econômica da enfermidade (GOMES et al., 2010).

Apesar de a micoplasmose ser frequentemente relacionada com afecções das articulações em aves de produção (KLEVEN, 2003), este acometimento é pouco relatado em aves silvestres. Existem indícios que tal manifestação clínica seja de importância em aves de rapina, como descrito por RUDER et al., (2009), que identificaram a espécie *Mycoplasma corogypsi* como agente responsável por poliartrite em urubus (*Coragyps atratus*). Outros *Mycoplasmas* também foram isolados de rapinantes, como *M. gallisepticum*, *M. glycyphilum*, *Mycoplasma falconis*, *Mycoplasma gateae*, *Mycoplasma buteonis* e *M. vulturi* (BOLSKE & MORNER, 1982; POVEDA et al., 1990, 1994; ERDÉLYI, et al., 1999; LIERZ et al., 2000; OAKS et al., 2004). No entanto, a importância da micoplasmose para a saúde dos rapinantes não está bem documentada (LORIA et al., 2008). Dada a ausência de manifestações clínicas na maior parte dos casos, foi sugerida que micoplasmas em aves de rapina ocorrem na maior parte das vezes como comensais e em pequena frequência, de forma patogênica (LIERZ et al., 2008).

2.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Por muito tempo foi considerada um habitante comensal da microbiota de várias espécies, sem haver potencial patogênico na maioria das vezes. No entanto em muitas espécies aviárias é considerado um patógeno tão ou mais importante que a *Salmonella* (RITCHIE et al., 1994). Essa bactéria é um dos principais constituintes da microbiota intestinal (BIER, 1984; HOEFER, 1997; SCHREMMER et al.,

1999). Acredita-se que a maioria dos sorotipos de *E. coli* seja desprovida de qualquer fator de virulência, entretanto algumas cepas adquiriram durante o processo evolutivo diferentes conjuntos de genes que conferiram a capacidade de ocasionar doença, fato que determina sua grande versatilidade patogênica (SUSSMAN, 1997; HIRSH, 2004).

E. coli é o agente patogênico de maior importância para a produção comercial avícola em todo o mundo (GUASTALLI, 2010). A colibacilose pode ter diversas apresentações clínicas com sintomas entéricos e/ou extraentéricos como pneumonia, peritonite, colisepticemia, celulite, pleuropneumonia, periepatite, pericardite, salpingite, panoftalmia, osteomielite, sinovite, onfalite, síndrome da cabeça inchada, doença crônica respiratória, entre outras (BARNES et al., 2003).

A colibacilose aviária é uma enfermidade mundialmente distribuída e capaz de causar danos em todas as espécies aviárias. Os animais adquirem a infecção através da ingestão da bactéria presente nas fezes dos animais que causam a contaminação ambiental. *E. coli* pode sobreviver em ambientes secos por longos períodos (LA RAGIONE et al., 2002). A higiene inadequada é um dos principais fatores predisponentes à infecção, além de fatores estressantes, contaminação da alimentação, deficiência nutricional e doença prévia (ZWART, 2010). Na avicultura, é considerado um dos patógenos que mais causam prejuízos, decorrentes de menor desenvolvimento corpóreo, baixa conversão alimentar, mortalidade embrionária, aumento da mortalidade e custos com medicações e condenação de carcaças (FERREIRA & KNOBL, 2009).

Sorotipos desta bactéria são determinados pelos antígenos somático (O), capsular (K), flagelar (H) e *pili* (F) (BARNES et al., 2004). Com avanços da biologia molecular, tornou-se possível também a classificação em diferentes patotipos pela detecção de fatores de virulência (FERREIRA & KNOBL, 2009).

E. coli pode, portanto, ser agrupada de acordo com seus mecanismos de patogenicidade, em patotipos que estão frequentemente associados a doença em animais e humanos. Os mais importantes patotipos em humanos e animais são a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli*

enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC), *E. colide* meningite neonatal (NMEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* produtora de shigatoxina (STEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) (FERREIRA & KNÖBL, 2009; GYLES & FAIRBROTHER, 2010).

A patogenia das infecções por *E. coli* está diretamente correlacionada aos mecanismos de virulência que apresentam (SUSSMAN, 1997). Os fatores de virulência que vão atribuir à bactéria a habilidade de causar doenças são elementos genéticos que podem ser combinados de diferentes formas. A capacidade de causar doença da cepa vai ser determinada pela combinação de tais fatores, que estão relacionados com variedades cromossomais e genes plasmidiais que codificam variedade de *pili*, flagelos, antígenos capsulares, fatores de aderência intestinal, enterohemolisinas, produção de colicina, enterotoxinas termolábeis e termoestáveis, resistência sérica, presença de aerobactina, entre outros (LA RAGIONE & WOODWARD, 2002; EWERS et al., 2004). Portanto, o conceito de patogenicidade das amostras está vinculado com o impacto acumulativo de um ou vários desses fatores de virulência, o que diferencia as amostras patogênicas de não patogênicas (JOHNSON, 1991).

Genes localizados em plasmídeos ou em cromossomos são identificados para a determinação de tais fatores. No cromossomo estão organizados em grandes fragmentos de DNA e são denominados ilhas de patogenicidade (HACKER et al., 1997). A gravidade do quadro clínico irá depender do potencial de virulência do agente causador, que é determinado pelo conjunto de genes localizado nas ilhas de patogenicidade (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999).

Os mecanismos de virulência da *E. coli* patogênica para aves (APEC) são considerados multifatoriais. Os mais frequentemente relacionados são os mecanismos de resistência sérica (*iss*), de adesão (*pap* e *fela*), presença de aerobactina (*iuc*), produção de colicina (*cva*), flagelos, antígenos capsulares (*kps*) e hemaglutinina temperatura-sensível (*tsh*) (LA RAGIONE & WOODWARD, 2002; ROCHA et al., 2002; EWERS et al., 2004).

O gene *tsh* codifica a produção de uma proteína auto-transportadora que parece ter semelhança a uma subclasse da família de proteases do tipo IgA, estando envolvida em mecanismos de aderência ao trato respiratório (STATHOPOULOS et al., 1999; DOZOIS et al., 2000), e é frequentemente descrita como importante fator de patogenicidade na colibacilose (PROVENCE & CURTISS, 1994).

A função do gene *iss* está relacionada à resistência sérica, associada com a capacidade de ultrapassar barreiras do sistema imune do hospedeiro, produzindo infecções generalizadas na APEC (NGELEKA et al., 1996; MELLATA et al., 2003). MCPEAKE et al. (2005) relataram que o gene *iss* é encontrado com maior frequência em aves clinicamente acometidas que em aves portadoras assintomáticas. O gene *iss* é localizado em plasmídeos de grandes dimensões e podem simultaneamente carrear os fatores de virulência e resistência a antimicrobianos (JOHNSON et al., 2002). Esse gene pode servir como marcador de virulência das cepas patogênicas nas aves, uma vez que a sua expressão frequentemente mensura seus efeitos patogênicos (NOLAN et al., 2002; GIBBS et al., 2003).

O gene *iuc* codifica a aerobactina, um sideróforo de origem bacteriana, encontrada em grande parte das cepas de *E. coli* mais virulentas. Junto com a alfa-hemolisina (gene *hlyA*), causa lise das hemácias e age como mecanismo para a aquisição de ferro em meios de baixa concentração deste ion (SUSSMAN, 1997). A capacidade do patógeno invadir e se multiplicar é influenciada pela disponibilidade de ferro, elemento essencial para o seu crescimento. Apesar de o ferro ser encontrado em grande quantidade nos tecidos e fluidos corporais, este elemento permanece ligado a glicoproteínas. A bactéria, por suavez, possui sistemas que captam o ferro via sideróforos. Genes que codificam proteínas envolvidas na aquisição de ferro foram encontrados com alta frequência em linhagens de APEC (GOPHNA et al., 2001; JANBEN et al., 2001). Os cinco genes da biossíntese da aerobactina são denominados *iucA*, *iucB*, *iucC* e *iucD*. Esses genes têm sido encontrados em plasmídeos que também codificam a resistência a certos antimicrobianos (VIDOTTO et al., 1991; GOES et al., 1993).

As adesinas fimbriais P são descritas em *E. coli* associadas a infecções de trato urinário e cepas de isolados de APEC. Em aves de produção, a fimbria P costuma se relacionar com a capacidade de aderir a órgãos internos e com a proteção contra células de defesa (JANBEN et al., 2001). No entanto, a função da fimbria P na virulência de amostras APEC ainda não está esclarecida. Estudos confirmam que a fimbria P permite que bactérias patogênicas sejam capazes de se aderir a superfície celular para a instalação de um processo infeccioso (BRITO et al., 2003; DELICATO et al., 2003, RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005).

O fator citotóxico necrotizante (codificado pelo gene *cnf1*) é uma toxina capaz de causar a formação de células gigantes, além de ser encontrado em casos de diarreia, também é descrito em APEC. As infecções por APEC em aves comerciais causam doenças respiratórias, poliserosite fibrinosa e colisepticemia. Em aves de produção, a *E. coli* é raramente descrita como causadora de enterites, no entanto, em aves granívoras e frugívoras, é frequentemente descrita como causa de enterite (BARNES et al., 2004).

Com a determinação de algumas associações desses genes de virulência, os patótipos vêm sendo estudados para sua melhor compreensão clínica e epidemiológica. (FRANCO & LANDGRAF, 1996). A disponibilidade de informações genéticas, como genoma de APEC (JOHNSON et al., 2007) e plasmídeos sequenciados (JOHNSON et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; MELLATA et al., 2009), dão suporte para estudos de *E. coli*. A partir de dados moleculares, pode-se obter melhor conhecimento da doença através da aplicação de genética molecular, visando definir o patótipo e o grau de virulência dos isolados (BARBIERI, 2010). Novas ferramentas de sequenciamento, expressão e identificação de fatores de virulência de APEC em modelos de infecção são uma oportunidade de melhorar conhecimento sobre mecanismos de virulência (DZIVA & STEVENS, 2008).

Cepas de APEC podem estar presentes na microbiota intestinal de aves saudáveis, podendo permanecer em um ambiente por um longo período, contaminando alimentos e a água, que servirão de via de disseminação da bactéria para as aves (EWERS et al., 2009). Ainda, cepas de APEC

distintas geneticamente podem produzir a mesma infecção, pois podem apresentar fatores de virulência que, apesar de diferentes, possuem a mesma função e atuam no mesmo sítio do hospedeiro (BARBIERI, 2010).

Genes de virulência e plasmídeos de resistência de *E. coli* provenientes de animais podem ser transmitidos a humanos e outras espécies por contato direto, pelo alimento ou ambiente. Bactérias podem colonizar o intestino do novo hospedeiro quando são ingeridas e passam pelo trato gastrointestinal. Conseqüentemente, estas cepas podem levar a infecções bacterianas com opções medicamentosas cada vez mais limitadas (AJIBOYE et al., 2009; HAMMERUM & HEUER, 2009).

2.5 Resistência bacteriana a antimicrobianos

O surgimento da resistência aos antimicrobianos mais comuns tem se revelado um problema crescente mundial (LOPES, 2009). A importância de substâncias antimicrobianas no aumento da resistência bacteriana está no seu papel selecionador de cepas resistentes por meio da pressão seletiva, resultado do seu emprego na clínica, indústria ou comércio (LIVERMORE, 2003).

Bactérias como *E. coli* podem ser transmitidas dos animais para o homem na ausência de seleção antibacteriana. Com a colonização gastrointestinal, pode ocorrer transferência de determinantes genéticos de resistência por cepas contaminantes (OZGUMUS et al, 2008).

Os conhecimentos atuais não são suficientes para prever ou para impedir a propagação da resistência aos antimicrobianos. Para desenvolver uma estratégia em longo prazo é essencial conhecer melhor os mecanismos subjacentes a estes fenômenos (SILVA, 2007).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem ser intrínsecos e extrínsecos (MARTINEZ, 2008). A resistência intrínseca é a resistência natural da bactéria contra um determinado grupo antibiótico. Entre os mecanismos de resistência intrínseca estão a barreira de permeabilidade, modificação dos locais alvo dos antibióticos ou ainda pela indução de genes reprimidos na presença de antibiótico (TENOVER, 2006).

Já os mecanismos de resistência extrínsecos são mecanismos que são adquiridos pela bactéria, principalmente por mutações cromossômicas e transferência de plasmídeos (TENOVER, 2006). As mutações cromossômicas são alterações na sequência de DNA dos cromossomos bacterianos, as quais podem resultar na síntese de proteínas alteradas, novas proteínas ou ainda alterações na quantidade de proteína produzida. Os plasmídeos são moléculas de DNA, extracromossomal com a capacidade de replicação autônoma. Os plasmídeos de resistência podem ser encontrados numa grande diversidade de bactérias, uma vez que é facilmente transmitido a bactérias, seja da mesma espécie ou não, através de métodos de conjugação e transformação (ALEKSHUN & LEVY, 2007).

Estas moléculas podem codificar diversas proteínas importantes na replicação, fatores de fertilidade, resistência a metais tóxicos, bacteriófagos e antibióticos, adesão celular, virulência entre outros (HARBOTTLE et al., 2006). Além dos plasmídeos, ainda podem ser transmitidos os transposons e integrons. Transposons são sequências de DNA linear que possuem a capacidade de se transferir de uma molécula de DNA para outra (MARTINEZ, 2008). Se diferem dos plasmídeos por não possuírem capacidade de replicação autônoma e por não necessitarem de grande homologia de modo a se inserirem numa sequência de DNA. Já os integrons assemelham-se aos transposons, mas não possuem sequências terminais repetidas nem codificam as proteínas necessárias para a sua transposição. Estes podem ser caracterizados pela presença de sequências específicas para o alvo de integração. Apresentam a capacidade de adquirir diversos genes para a resistência aos antibióticos e expressá-los através de promotores intrínsecos (MINDLIN et al, 2006; SENKA et al, 2008).

Existem quatro processos de transferência de genes de um microrganismo para outro, são eles, conjugação, transformação, transdução e transposição (QUINN et al, 2005). A conjugação é um processo pelo qual o DNA é transferido por contato celular, de um doador para receptor. Genes que codificam resistência a antibióticos encontram-se largamente distribuídos disseminando facilmente para diferentes espécies bacterianas. A transformação é um processo em que o DNA do doador é

integrado no cromossoma do receptor. Na transdução, a transferência genética é mediada por bacteriófagos e já na transposição a transferência é mediada por transposons, envolvendo tanto plasmídeos conjugativos como não conjugativos e também cromossomas (ALEKSHUN & LEVY, 2007).

Estudos recentes mostraram que a resistência bacteriana pode acontecer também em *E. coli* comensal de animais de vida livre que não passaram diretamente por antibioticoterapia (CIZEK et al. 2007; DOLEJSKA et al. 2007, 2008, 2009; LITERAK et al. 2007).

De acordo com GILLIVER et al. (1999), a determinação do perfil de resistência a antimicrobianos é de interesse tanto para a espécie em estudo, como para a saúde pública. Estudos recentes apontam um aumento exponencial na proporção de microrganismos resistentes, mostrando que nos últimos anos o problema se agrava com maior velocidade (WANNMACHER, 2004), seja devido à prescrição excessiva de antibióticos por parte de médicos, o uso indiscriminado pelo público e o emprego dessas drogas para uso veterinário (HARAKEH et al., 2006). O assunto tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto com cepas humanas quanto para as isoladas de animais (LEVY, 2002), no entanto são escassas as informações sobre resistência bacteriana em isolados de animais selvagens (GILLIVER et al., 1999).

Para se obter informações do perfil sanitário de aves que circundam regiões de criações comerciais avícola, foi realizada pesquisa de agentes patogênicos importantes para aves de fim comercial, além da pesquisa do perfil de resistência a antimicrobianos, com a finalidade de se analisar o perfil sanitário destas espécies sinantrópicas e se estabelecer estratégias preventivas.

REFERÊNCIAS

1. ABULREESH, H.H.; GOULDER, R.; SCOTT, G.W. Wild birds and human pathogens in the context of ringing and migration. **Ringling & Migration**, v. 23, p.193-200, 2007.
2. AJIBOYE, R. M.; SOLBERG, O. D., LEE, B. M., RAPHAEL, E.; DeBROY, C.; RILEY, L. W. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 365-371, 2009.
3. ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **Cell**, v. 128, p.1037-1050, 2007.
4. BARBIERI, N.L. Resistência a antibióticos, prevalência dos fatores associados à virulência tipagem filogenética e perfil filogenético de isolados de *Escherichia coli* patogênica aviária. **Dissertação** (mestrado), 2010, 113f.
5. BARNES, H.J. Miscellaneous and sporadic bacterial infections. In: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 11 ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, p.845-862, 2003.
6. BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; GLISSON, J.R.; FATLY, A.M.; MACDOUGALD; SWAYNE, L.R.D.E. **Diseases of Poultry**. Ames, EUA. JWA State University, p.631-656, 2004.
7. BENSKIN, C.M.H.; WILSON, K.; JONES, K.; HARTLEY, I.R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. **Biological Reviews**. v. 84, pp. 349–373, 2009.
8. BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 23 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984, 1234 p.
9. BOLSKE, G.; T. MORNER. Isolation of a *Mycoplasma* sp. from three buzzards (*Buteo* spp.). **Avian Diseases** 26:406-411. 1982.
10. BOZEMAN LH, KLEVEN SH, DAVIS RB. *Mycoplasma* challenge studies in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and chickens. **Avian Diseases** v. 28, p. 426-34, 1984.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Portaria Ministerial nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) no âmbito da DAS e cria o comitê consultivo do Programa de Sanidade Avícola. **Diário Oficial da União**. [online]. Brasília, 19 set. 1994, p. 29. Disponível

em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. Acesso em 29 de jun. 2009.

12. BRAWNER III, W.R.; HILL, G. E.; SUNDERMANN, C.A. Effects of coccidial and *Mycoplasmal* infections on carotenoid-based plumage pigmentation in male house finches. **The Auk** v. 117, n. 4, p. 952–963, 2000.
13. BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C. J.; VIDOTTO, M. C. Virulence Factors and Clonal Relationships among *Escherichia coli* strains Isolated from Broiler Chickens with Cellulitis. **Infection and Immunity**, v. 71, n.7, p.4175-4177, 2003.
14. BRITTINGHAM, M.C.; TEMPLE, S.A.; DUNCAN, R.M. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. **Journal of wildlife diseases**. v.24, p 299-307, 1988.
15. BROWN, N. H. H. Psittacine birds. In: TULLY, JR, T. N.; LAWTON, M. P. C.; DORRESTEIN, G. M. **Avian Medicine**. Oxfordo: Reed Educational and Professional Publishing Ltda, 2000.
16. CARRASCO, A.O.T., Avaliação da infectividade, transmissibilidade, estado de portador (reservatório) e da resposta imune humoral de pombos (*Columba livia*) submetidos à infecção experimental frente a estirpes do vírus da doença de Newcastle (VDN) de alta e baixa patogenicidade. **Tese** (doutorado) 123f, Universidade de São Paulo, 2009.
17. CARRASCO, A.O.T.; ISSAKOWICZA, A.C.; MAIS, M.T.G.F.; FATORETTO, L.A.; PANDOLFIC, J.R.C.; DA SILVA, L.C.; PINTO, A.A. Levantamento sorológico de *Mycoplasma spp*, *Salmonella sp.* e doença de Newcastle em pombos domésticos (*Columba livia*) de vida livre. **Unopar Ciência Biologia Saúde**, v.13, n.1, p.23-27, 2011.
18. CARVALHO, L.R.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R.; SILVA, M.C.F.; CORSINO, A.T.S.M.; LIMA, L.A.; REDONDO, R.A.F.; FERREIRA, PINTO, M.E.B.M. Dominant culturable bacterial microbiota in the digestive tract of the American black vulture (*Coragyps atratus* Beichstein 1793) and search for antagonistic substances. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.218-224, 2003.
19. CIZEK, A., DOLEJSKA, M., NOVOTNA, R., HAAS, D. AND VYSKOCIL, M. Survey of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and drug resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic. **Journal Applied Microbiology**, v.104, p. 852–860, 2007.
20. DAOUST, P.; PRESCOTT, J.F. Salmonellosis In: **Infectious Diseases of Wild birds**. THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B.;

- ATKINSON, C.T. Cap. 13, p. 270-288. Blackwell publishing: Iowa, 2007.
21. DEL HOYO, J., ELLIOTT, A.; CHRISTIE D.A. **Handbook of the Birds of the World**. v. 8. Broadbills to Tapaculos. Lynx Edicions, Barcelona. 845p. 2003.
22. DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 97-103, 2003.
23. DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v.30, p. 299-316, 1999.
24. DHONDT, A.A.; TESSAGLIA, D.L. ;SLOTHOWER, R.L. Epidemic *Mycoplasmal conjunctivitis* in house finches from north america. **Journal of Wildlife Diseases**, v.34, n.2, p. 265-280, 1998.
25. DHONDT A.A., DHONT, K.Y.; HAWLEY, D.M.; JANELLE, C.S. Experimental evidence for transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches by fomites. **Avian Pathology**, v.36, p. 205-208, 2007.
26. DOLEJSKA, M., CIZEK, A. AND LITERAK, I. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from black-headed gulls in the Czech Republic. **Journal Applied Microbiology**, v.103, p.11–19, 2007.
27. DOLEJSKA, M., SENK, D., CIZEK, A., RYBARIKOVA, J., SYCHRA, O. AND LITERAK, I. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. **Research Veterinary Science**, v.85, p.491–494, 2008.
28. DOLEJSKA, M., BIEROSOVA, B., KOHOUTOVA, L., LITERAK, I. AND CIZEK, A. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. **Journal Applied Microbiology**, v.106, p.1941–1950, 2009.
29. DOZOIS, C.M.; DHO-MOULIN, M.; BREE, A.; FAIRBROTHER, J.M.; CURTISS, R. Relationship between the *tsh* autotransporters and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. **Infection and Immunity**, v.68, n.7, p.4145-4154, 2000.
30. DUCKWORTH, R.A.; BADYAEV, A.V.; FARMER, K. L.; HILL, G.E.; ROBERTS, S.R. First case of *Mycoplasma gallisepticum* infection in the western range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). **The Auk**, v.120, n.2, p. 1–3, 2003.

31. ERDÉLYI, K. TENK, M.; DÀN, A. Mycoplasmosis Associated Perosis Type Skeletal Deformity in a Saker Falcon Nestling in Hungary. **Journal of Wildlife Diseases**. V.35, n.3, p. 586–590, 1999.
32. EWERS C., JANSSEN T., KIESSLING S., PHILIPP H.C., WIELER L.H..Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.91-101, 2004.
33. FARMER, K. L. ;HILL, G. E. ; ROBERTS, S. R. Suscetibility of wild songbirds to the house finch strain of *Mycoplasma gallisepticum*. **Journal of Wildlife Diseases**, v.41, n.2, p. 317–325, 2005.
34. FERREIRA, V.L. Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes do Estado de São Paulo. **Dissertação**. 79f, 2012.
35. FERREIRA; A. J. P.; KNOBL, T. *Colibacilose*. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. di; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. Z. **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, cap. 4, p.457-482, 2009.
36. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microorganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p. p.51-55, 1996.
37. FRIEND, M. Bacterial diseases. In: **Field manual of wildlife diseases: General field procedures and diseases of birds**. USGS – National Wildlife Health Center, University of Nebraska – Lincoln, 1999. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/zoonoticpub/12>> Acesso em: 4 nov 2012.
38. GANGOSO, L; GRANDE, J.M; LEMUS, J.A.; BLANCO, G.; GRANDE, J.; DONAZAR, J.A. Susceptibility to infection and Immune Response in Insular and Continental Populations of Egyptian Vulture: Implications for conservation. **Plos ONE**, V. 4, 2009.
39. GAST, R.F. Paratyphoid infections. In: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. 11 ed.Ames: Iowa University Press, p.583-599, 2003.
40. GIBBS, P.S.; MAURER, J.J.; NOLAN, L.K.; WOOLEY, E. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival. gene cluster (*iss*). **Avian Diseases**, v.47, n.2, p.370-379, 2003.
41. GILLIVER, M. A.; BENNETT, M.; BEGON, M.; HAZEL, S. M. Y.; HART, C. A. Antibiotic resistance found in wild rodents. **Nature**, p.401-233, 1999.

42. GOES, C. R.; GAZIRI, L. C.; VIDOTTO, M. C. Cloned genes of the aerobactin system of virulent avian *Escherichia coli* do not confer virulence to recombinant strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.26, n.3, p.261-275, 1993.
43. GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A.R.; MARQUES, M.V.R.; CARVALHAES, A.G.; MARIN, S.Y.; COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; RESENDE, J.S.; MARTINS, N.R.S. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Dead Captive Psittacines in Belo Horizonte, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.12, n.2, p.75 – 78, 2010.
44. GOPEE, N. V. ADESIYUN, A. A.; CAESAR, K. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. **Journal of Wildlife Disease**, v. 36, n. 2, p.284-293, 2000.
45. GOPHNA, U.; OELSCHLAEGER, T.A.; HACKER, J. & RON, E.Z. Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. **FEMS Microbiology Letter**, v.196, p.57-60; 2001.
46. GUANG-ZHI, H.; WEI-YI, T.; SHU-XUAN, D.; CHUAN-WEI, A. Real time quantitative detection for *enterococcus* in gastrointestinal tract of Pigeon after Orally infected by *Salmonella enteritidis*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. V.10, n. 15, pp. 1981-1984, 2011.
47. GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.; WEILL, F.X. Supplement 2003-2007 to the white-kauffmann. Le minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, n.47, v.161, p.26-29, 2010.
48. GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. (Org.) **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 267-308.
49. GUASTALLI, E.A.L. Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 84f., 2010.
50. HAAG-WACKERNAGEL, D.; MOCH, H. Health hazards posed by feral pigeons. **Journal of Infection**, v. 48, n. 4, p. 307-313, 2004.
51. HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MUHLDOERFER, I.; TSCHAPE, H. Pathogenicity island of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v.23, n.1, p.1089-1097, 1997.

52. HAMMERUM, A. M., HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 916- 921, abr., 2009.
53. HARAKEH, S.; YASSINE, H.; EL-FADEL, M. Antimicrobial resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. **Environmental pollution**, v. 143, n. 02, p. 269-277, 2006.
54. HARBOTTLE, H., THAKUR, S., ZHAO, S., WHITE, D. G. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, v.17, p.111-124, 2006.
55. HARTUP, B. K.; KOLLIAS, G. V. AND LEY, DAVID H. *Mycoplasmal conjunctivitis in songbirds from New York*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 36, p. 257–264, 2000.
56. HARTUP, B. K.; DHONDT, A.A.; SYDENSTRICKER, K. V.; HOCHACHKA, W. M. AND KOLLIAS, G.V. Host Range and dynamics of *Mycoplasmal conjunctivitis* among birds in north America. **Journal of Wildlife Diseases**, v.37,n.1, p. 72–81, 2001.
57. HARTUP, B.K.; STOTT-MESSICK, G. M.; LEY, D.H. Health Survey of House Finches (*Carpodacus mexicanus*) from Wisconsin. **Avian Diseases**, v.48, p. 84–90, 2004.
58. HIDASI, H.W.; HIDASI NETO, J.; MORAES, D.M.C.; LINHARES, G.F.C.; JAYME, V.S.; ANDRADE, M.A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, V. 44, N. 1, pp. 9-12, 2013.
59. HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. **Veterinary Microbiology**, 2nd Edition. Massachusetts: Wiley-Blackwell. 536 p. 2004.
60. HOEFER, H.L. Diseases of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R **Avian Medicine and Surgery**. B.; CLUBB, S.L.; DORESTEIN, G.M.; QUESENBERRY, K. (Eds.). Philadelphia: Saunders, p.419-453, 1997.
61. IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa n.º 141, 19 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 dez 2006.
62. IKUNO, A.A. GAMA, N.M.S.Q.; GUASTALLI; E.A.L. GUIMARÃES, M.B.; & FERREIRA, V.C.A. CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PROVENIENTES DE AVES SILVESTRES QUANTO A GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A

ANTIBIÓTICOS. **Anais XXXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado. 2008.

63. JANBEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli*(APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, n.5, p.371-378, 2001.
64. JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology and Infection**. Rev., v.4, p. 80–128, 1991.
65. JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P, KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v. 46, n.2, p. 342-352, 2002.
66. KLEVEN, S H. *Mycoplasma synoviae* infection. In **Diseases of Poultry**, H. J. Barnes, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald and D. E. Swayne (eds.). Blackwell Publishing, Ames, Iowa, p. 756–766. 2003.
67. LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 27-35, 2002.
68. LEVY, C. E. **Manual de Microbiologia clínica aplicada ao controle de infecção hospitalar**. Associação Paulista de estudos e controle de infecção hospitalar. 2 ed. 2002.
69. LEY, D.H.; SHAEFFER D.S.; DHONDT, AA. Further western spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection of house finches. **Journal of Wildlife Diseases**. V.42, p. 429-431, 2006.
70. LIERZ, M., R. SCHMIDT, L. BRUNNBERG, AND M. RUNGE. Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from free-ranging birds of prey in Germany. **Journal of Veterinary Medicine** v.47, p. 63–67. 2000.
71. LIERZ, M.; HAGEN, N.; HERNADEZ-DIVERS, S.J. AND HAFEZ, H.M. Occurrence of *Mycoplasmas* in free-ranging birds of prey in Germany. **Journal of Wildlife Diseases**, v.44, p. 845–850, 2008.
72. LIMA, L.A.; LIMA, C.D.L.C.; CARVALHO, L.R.; MARGUTTI-PINTO, M.E.B. Heteroantagonismo entre estirpes de *Enterobacter agglomerans* isoladas de urubu (*Coragyps atratus*) como produtoras e *Pseudomonas aeruginosa* como reveladoras. **Arquivos**

- Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.3, p. 595-599, 2011.
73. LITERAK, I., VANKO, R., DOLEJSKA, M., CIZEK, A. AND KARPISKOVA, R. Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. **Letters in Applied Microbiology**, 45, 616–621, 2007.
74. LIVERMORE, D. Bacterial resistance: origins, epidemiology and impact. **Clinical Infectious Disease**. V.36, n.1, p.11-23, 2003.
75. LOPES, L. F. L. *Salmonella* sp. Em répteis e aves silvestres no estado de São Paulo: Frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as conseqüências para o manejo em cativeiro e reintrodução. **Tese** (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.124f.
76. LOPES, H.V. Antibióticos, resistência e novos mecanismos de ação. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.11, n.2, p.67-68, 2009.
77. LORIA, G.R.; FERRANTELLI, E.; GIARDINA, G. et al. Isolation and Characterization of Unusual *Mycoplasma* spp. From Captive Eurasian Griffon (*Gyps fulvus*) in Sicily. **Journal of Wildlife Diseases**. v.44, n.1, p. 159–163, 2008.
78. MARTINEZ, J.L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 365-367, 2008.
79. MCPEAKE, S.J.W.; SMYTH, J.A.; BALL, H.J. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli*(APEC) Associated with colisepticemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n.3-4, p.245-253, 2005.
80. MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS, R.; BROWN, P.R. ARNE, P.; BREE,A.; DESARLES, C.; FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n.1, p.536-540, 2003.
81. METTIFOGO, E.; BUIM, R. M. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.; PIANTINO, A. J. **Patologia Aviária**. Baueri: Manoele, Cap. 9.1. p. 86-100 , 2009.
82. MINDLIN, S.; PETROVA, M.; BASS, I.; GORLENKO, Z. Origin, Evolution, and Migration of Drug Resistance Genes. **Russian Journal of Genetics**. v.42,n.11, p. 1495-1511, 2006.

83. NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L. Micoplasmoses. In: Berquieri Jr, A.; SILVA, E.N.; DI Fabio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M.A.F. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, p. 485-500, 2009.
84. NGELEKA, M.; KWAGA, J. K; WHITE, D. G; WHITTAM, T. S; RIDDELL, C; GOODHOPE, R; POTTER, A. A; ALLAN, B. *Escherichia colicellulitis* in broiler chickens: clonal relationship among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from disease birds. **Infection and Immunology**, v.64, p. 3118- 3126, 1996.
85. NOLAN, L.K.; GIDDINGS, C.W., HORNE, S.M., DOETKOTT, C., GIBBS, P.S., WOOLEY, R.E. & FOLEY, S.L. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of iss and the virulence of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, V. 46, n.2, pp. 386-392, 2002.
86. NOLAN, P. M. A.; SHARON R. ROBERTS, AND GEOFFREY E. HILL. Effects of *Mycoplasma gallisepticum* on Reproductive Success in House Finches. **Avian Diseases**, v. 48, p.879–885, 2004.
87. NUNES, V.F.P. Pombos Urbanos: o desafio de controle. **Biológico**. São Paulo. v. 65, n.1/2, p.89-92, 2003.
88. OAKS, J.L.; GILBERT, M.; VIRANI, M.Z.; WATSON, R.T.; METEYER, C.U. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. **Nature**, v. 427, p. 630-633, 2004.
89. OCANDO, D.C.O.; PIREIA, S.E.R.; AJJAM, E.; AUVERT, R.S. Caracterización protéica Del suero Del ave *Coragyps atratus* (Zamuro de cabeza negra) y algunos estudios inmunoserológicos. **Revista científica FCV de Luz**, v. 1, n.2, 1991.
90. OZGUMUS, O.B.; TOSUN, I.; AYDIN, F.; KILIC, A.O. Horizontal dissemination of TEM- and SHV-typr beta-lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clonical isolates of *Enterobacteriaceae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39 n.4, p. 636-643, 2008.
91. PILLAI, S. R. ; MAYS, A H. L. ; LEY, A D. H. ; LUTTRELL, B P. ; PANANGALA, C V. S.; FARMER, D. K. L. AND ROBERTS, S. R. A Molecular Variability of House Finch *Mycoplasma gallisepticum* Isolates as Revealed by Sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the pvpA Gene. **Avian Diseases**, v.47, p. 640–648, 2003.
92. POVEDA, J. B., J. GIEBEL, H. KIRCHHOFF, AND A.FERNANDEZ.. Isolation of *Mycoplasmas* from a buzzard, falcons and vultures. **Avian Pathology**. v.19, p.779–783, 1990.

93. POVEDA, J. B.; J. GIEBEL, J. FLOSSDORF, J. MEIER, AND H. KIRCHHOFF. *Mycoplasma buteonis* sp. nov., *Mycoplasma falconis* sp. nov., and *Mycoplasma magypis* sp. nov., three species from birds of prey. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p. 94–98, 1994.
94. PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**. v.62, n.4, p.1369-1380, 1994.
95. QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, N.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, E.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Editora Artmed, Porto Alegre. 2005. 512p.
96. RITCHIE, B. W.; HARRISON G. J.; HARRISON L. R. **Avian Medicine: principles and application**. Lake Worth, Wingers Publishing, 1384p, 1994.
97. ROCHA, A.C.G.P.; SILVA, A.B.; BRITO, B.G.; MORAES, H.L.S.; PONTES, A.P.; CÉ, M.C.; NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. **Avian Disease**, v.46, n.3, p.749-753, 2002.
98. RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**. v.151, p.2097- 2110, 2005.
99. RONDEAU, G; THIOLLAY, J.M. West African vulture decline. **Vulture News**. V. 51, p 13-33, 2004.
100. RUDER, M.G.; SANFORD, H.; FELDMAN, A.U. ARNO, W. MCRUER, D. Association of *Mycoplasma Coragypsi* and polyarthritis in a Black vulture (*Coragyps atratus*) in Virginia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n.3, pp 808-816, 2009.
101. SCHULLER, M. Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presente nas excretas de pombos domésticos (*Columba livia domestica*). 93f. **Dissertação** (Mestrado) Faculdade saúde pública Universidade pública Universidade de São Paulo, SP, 2003.
102. SCHULER, M. Pombos Urbanos – Um caso de saúde pública. **Revista Sociedade Brasileira de controle de contaminação**. Ed 58. 2012. Disponível em: http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2019/19Pombos.pdf Acesso em 12 de Dezembro de 2012.

103. SCHREMMER, C. et al.. Enteropathogenic *Escherichia coli* in Psittaciformes. **Avian Pathology**. v.28, p. 349-354,1999.
104. SENKA, D.; U KOVI.; KOS B. Antibiotic Resistance in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, V.46, n.1, p 11-21, 2008.
105. SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 4.ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001, 912 p.
106. SILVA, M.A.; MARVULO, M.F.V.; MOTA, R.A.; SILVA, J.C.R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeiaepidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v.30, n.7, p.573-580, 2010.
107. SILVA, I. Infecção hospitalar: resistência a antibióticos. **Dissertação** (Mestrado) Universidade de Aveiro. Departamento de biologia, 2007. 117f.
108. STATHOPOULOS, C.; PROVENCE, D.L.; CURTISS, R. Characterization of the avian pathogenic hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease type family of autotransports. **Infection and Immunity**, v.67, p.772-781, 1999.
109. SUSSMANN, M.; *Escherichia coli* and human disease. In: Sussman, M. **Escherichia coli mechanisms of virulence**. Cambridge, Reino Unido: University Press, p.3-48, 1997.
110. TENOVER, F.C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **American Journal of Medicine**, v.119, n. 6 , 2006.
111. TORO, H. ; HOERR, A F. J. ; FARMER, AB K. ; DYKSTRA, C C. C.; ROBERTS, A S. R.; AND PERDUE, M. A. Pigeon Paramyxovirus: Association with Common Avian Pathogens in Chickens and Serologic Survey in Wild Birds. **Avian Diseases**. V.49, p.92–98, 2005.
112. VAZQUEZ, B.; ESPERÓN, F.; NEVES, E.; LOPEZ, J.; BALLESTEROS, NC.; MUNOZ, M.J. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.52, n.45, 2010.
113. VIDOTTO, M. C.; CACAO; J. M.; GOES, C. R.; SANTOS, D. S. Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.24, n.7, p.649-675, 1991.

114. WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, Brasília, v. 1, n. 4, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/medicamentos/temas>> Acesso em Jan 2013.
115. WILLIAMS, E.S.; ARTOIS, M.; FISHER, J.; HAIGH, S.A. Emerging infectious in wildlife. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.1, n.1, p.139-157, 2002.
116. YAGIHASHI, T. , NUNOYA, T. AND TAJIMA, M. 'Pathogenicity for chickens of six strains of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from various birds', **Avian Pathology**, v.17 , p. 725 -729, 1988.
117. ZWART, P. Enfermedades infecciosas y parasitarias. In: SAMOUR, J. **Medicina Aviaria**. Barcelona: Elsevier, 2010. p. 346-358.

CAPÍTULO 2 - DETECÇÃO DE *Salmonella* sp. EM AVES SINANTRÓPICAS DA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIANIA-GO

RESUMO: Aves de vida livre são consideradas potenciais carreadores de agentes patogênicos para animais de produção. Com a finalidade de se observar a importância destas aves na cadeia epidemiológica da salmonelose aviária, 260 amostras biológicas de duas espécies com comportamento sinantrópico, pombos (*Columba livia*) e urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*) foram pesquisadas para a presença de *Salmonella* sp., com posterior sorotipagem das amostras positivas. Para tanto, foram adotados os métodos de bacteriologia convencional e PCR em tempo real (rPCR) para análise do material. Do total de 200 amostras obtidas dos pombos, 13% (26/200) foram positivas no exame bacteriológico. Na sorotipagem desses isolados realizada pelo laboratório FioCruz (RJ), 73% (19/26) foram identificadas como *Salmonella enterica* sorotipo Schwarzgrund, 23% (6/26) foram identificados como *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e 3,84% (1/26) foram identificadas como *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis. Na análise das amostras de pombos pela rPCR 27% (54/200) foram positivas para a detecção de *Salmonella* sp. Do total de 60 amostras obtidas dos urubus, nenhuma foi positiva no bacteriológico convencional, no entanto 8,3% (5/60) foram positivas no rPCR. Conclui-se que pombos domésticos e urubus de cabeça preta da região metropolitana de Goiânia são portadores de *Salmonella* sp.

Palavras-chave: bacteriologia, pombos, salmonelose, rPCR, urubus.

CHAPTER 2 - DETECTION OF *Salmonella enterica* IN SYNANTHROPIC BIRDS IN THE METROPOLITAN AREA OF GOIANIA-GO

Abstract: Free-living birds are considered a potential source of pathogens for livestock. In order to assess their importance in the epidemiological chain of avian salmonellosis, 260 biological samples were taken from two species with known synanthropic behaviour: a) Pigeon (*Columbia livia*) and b) Black-headed vulture (*Coragyps atratus*). Both were screened for the presence of *Salmonella enterica*, with subsequent serotyping of positive samples. To facilitate the above mentioned serotyping of the material we adopted the conventional bacteriological methods and rPCR analysis. During the bacteriological examination a total of 13%, 26 of the 200 samples from the pigeons were found positive. Of those isolated the serotyping 73% (19 of 26) were identified as *Salmonella enterica*, serotype *Typhimurium*; 3, 84% (1 of 26) was identified as *Salmonella enterica*, serotype *Enteritidis*. The results of the rPCR analysis showed 27% (54 of 200) as positive of *Salmonella enterica*. All 60 samples taken from the vultures, none showed up as positive during the conventional bacteriological exams, contrarily to the rPCR analysis, which detected 8.3% (5 of 60) as positive. In conclusion, pigeons and black-headed vulture from the metropolitan area of Goiânia are carriers of *Salmonella sp.*

Keywords: bacteriology, pigeons, salmonellosis, rPCR, vultures.

INTRODUÇÃO

A produção avícola nacional vem sendo responsável por grande parte dos ganhos econômicos do Brasil. O País ocupa hoje a terceira posição como produtor de frangos de corte e é o maior exportador, fornecendo-o para 142 países (BRASIL, 2012). Os cuidados com a qualidade são essenciais para a obtenção de um bom produto final, e por isso, o controle sanitário na avicultura industrial é realizado com rigorosas medidas de biossegurança. Uma dessas medidas preconiza evitar o contato de aves de vida livre com as aves de produção, com o fim de minimizar a transmissão de agentes, já que são consideradas potenciais carreadores de agentes infecciosos para a criação avícola (LUTTRELL & FISHER, 2007).

Em busca de alimento, aves sinantrópicas procuram áreas de produção animal e podem com isso contaminar animais de produção com patógenos alóctones (NUNES, 2003). Entre estas aves, estão vastamente distribuídos os pombos comuns (*Columba livia*), e também o urubu de cabeça preta ou urubu comum (*Coragyps atratus*) (SICK, 2001; DEL HOYO et al., 2003; SANTIAGO, 2006), ave que se alimenta de carcaças e outros materiais em decomposição, assim como detritos humanos, o que aponta sua possível importância para a disseminação de *Salmonella* e outros agentes patogênicos para o homem e outros animais (YORIO & GIACCARDI, 2002).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu através da Portaria Ministerial nº193 de 19 de setembro de 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) com o objetivo de garantir a qualidade dos produtos de origem avícola sanitariamente controlados, disponíveis nos mercados externo e interno. Além de outras medidas, o programa preconiza o monitoramento nos plantéis de reprodução para a certificação de núcleos e granjas como livres de *Salmonella enterica* sorotipo Gallinarum e de *Salmonella enterica* sorotipo Pullorum e livres ou controlados para *Salmonella enterica* sorotipos Enteritidis e Typhimurium (BRASIL, 1994).

A disseminação da *Salmonella* em aves de vida livre parece estar intimamente relacionada com a contaminação ambiental. O tratamento inadequado de esgotos ou de esterco, associado a grandes aglomerações, favorece o acúmulo e dispersão de salmonelas no ambiente. Isto, por sua vez, aumenta a probabilidade de animais de vida livre a serem expostos, o que os torna portadores intestinais e dispersantes desta bactéria (DOUST & PRESCOTT, 2007). Portanto, aves de vida livre tem sido alvo de diversas pesquisas em muitos países, com o enfoque na transmissibilidade de agentes para os animais de produção, com o objetivo de produzir alimentos seguros, pois esses agentes podem determinar quadros de toxinfecção no homem (LOPES, 2008).

Além dessa importância como possíveis veiculadores de *Salmonella* para aves de produção e para humanos, a introdução deste agente na população de espécies de vida livre pode vir a ser um grande problema ecológico, já que a enfermidade pode ser fatal para algumas espécies (CARVALHO, 2006; HERNANDEZ-DIVERS et al., 2006; PENNYCOTT et al., 2006).

Considerando a escassez de trabalhos desta enfermidade em aves sinantrópicas e seu potencial papel como portadores inaparentes, o presente estudo foi conduzido com o intuito de se verificar a presença de *Salmonella* com o uso das técnicas de bacteriologia convencional e rPCR, além de sorotipagem das amostras isoladas por laboratório de referência, de amostras biológicas de pombos comuns e urubus de cabeça preta capturados em áreas próximas a explorações comerciais avícolas da região metropolitana de Goiânia-GO.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves, nos Laboratórios de Bacteriologia e de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Goiás (CETAS/GO).

Animais e coleta das amostras

Foram avaliados 200 pombos (*Columbia livia*) e 60 urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*).

Os pombos foram capturados ao longo de um ano, de forma aleatória, com o apoio da equipe do Centro de Zoonoses da cidade de Aparecida de Goiânia, na região metropolitana de Goiânia, em um raio de até 50 km de empresas avícolas.

Na captura foram utilizadas cinco armadilhas de aço galvanizado modelo Argentina (Hebei Panfa Trade Co, Ltd), de 1,00 m³ (Figura 1). Estas armadilhas foram instaladas pela manhã permanecendo abertas durante todo o dia, sendo vistoriadas esporadicamente durante o dia, para retirada das aves capturadas e reabastecimento dos comedouros e bebedouros.



Figura 1. Armadilha de aço galvanizado modelo Argentina (Hebei Panfa Trade Co, Ltd) pronta para o uso.

Fonte: Arquivo Pessoal, 2011.

Os pombos foram retirados manualmente das armadilhas, com a utilização de equipamentos de proteção individual adequados: luvas, óculos de acrílico com proteção lateral, máscaras semifaciais com filtro de proteção P3 e acondicionados em gaiolas de transporte, em veículo de carroceria aberta até o laboratório, semanalmente.

Após a captura, as aves eram levadas ao Núcleo Experimental de Doenças de Aves, onde os pombos eram eutanasiados e foram colhidas amostras de conteúdo intestinal.

Os urubus usados neste experimento eram provenientes do Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS-GO), capturados por autoridades ambientais. Assim que eram recebidos pelo CETAS, os animais eram contidos manualmente e colhiam-se suabes cloacais. As amostras eram acondicionadas em caixas isotérmicas de isopor contendo gelo e transportadas imediatamente para o laboratório onde foram realizadas as análises bacteriológicas.

Esse estudo foi realizado com uma licença obtida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO), protocolo No.25795-1 e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Goiás, protocolo 080/11.

PESQUISA DE *Salmonella*

Bacteriologia convencional

Para o isolamento e identificação de *Salmonella* sp., as amostras foram submetidas à bacteriologia convencional, de acordo com GEORGIA POULTRY LABORATORY (1997).

Cerca de 2 g das excretas, ou suabes cloacais, foram inoculados em solução de água peptonada a 0,1% e incubados em estufa a 37 °C por 18 horas. Em seguida, 0,1 mL desta solução foi transferido para dois tubos, cada um contendo solução de Rappaport Vassilidis ou 1 mL de caldo de

selenito, os quais foram incubados a 37 °C por 12-24 horas. Após o enriquecimento seletivo, cada caldo foi plaqueado em três diferentes meios de cultivo: ágar XLT4 (Difco), ágar verde brilhante (Difco), e ágar Hecktoen(Difco), e todas as placas foram incubadas a 37 °C por 18h. De cada placa, três unidades formadoras de colônia com morfologia sugestiva de pertencer ao gênero *Salmonella* foram inoculadas em tubos contendo ágar TSI (*Triple Sugar Iron*) (Difco), os quais foram incubados a 37 °C por 18h. Os tubos de TSI com características morfológicas similares e sugestivas de *Salmonella* foram selecionados e submetidos a provas de produção de urease, prova de indol, de H₂S, prova do vermelho de metila, prova de motilidade, citrato de Simmons, do malonato e prova de lisina descarboxilase. As amostras consideradas positivas nos testes bioquímicos foram enviadas ao laboratório FIOCRUZ (RJ), onde foram sorotipadas.

Alíquotas do caldo de selenito de todas as amostras coletadas foram congeladas a -20 °C e posteriormente processadas pela PCR em tempo real (rPCR).

Técnica da PCR em tempo real

Extração do DNA genômico das amostras

Antes do procedimento de extração, as amostras congeladas em caldo de selenito foram submetidas a um novo enriquecimento bacteriano, posteriormente, o DNA das amostras foi extraído pelo método de tratamento térmico, de acordo com SANTOS et al. (2001).

Utilizaram-se 400 µL da amostra em tubo de polipropileno de 1,5 mL livre de DNA e RNA (Axygen), o tubo contendo a amostra foi centrifugado a 1956,2g por quatro minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e suspenso em 1 mL de TE (100µL Tris/HcL 1M + 20µL EDTA 0,5M + 9,880 µL H₂O) a mistura foi levada ao vórtex por 10 segundos e novamente centrifugada a 1956,2g por oito minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 100µL de TE. Prosseguiu-se uma homogeneização em vórtex por 10 segundos, seguida de aquecimento em placa a 95°C por 20

minutos. O sobrenadante foi então resfriado, aliquotado e armazenado a -20 °C em congelador para posterior utilização.

As realizações dos ensaios de rPCR para a detecção de *Salmonella* sp. foram realizados de acordo com CALVÓ et al. (2008).

Os eluatos obtidos a partir das amostras extraídas foram utilizados para realização de rPCR, empregando-se sistema TaqMan®. O volume adotado foi de 20 µL utilizando-se 4,6 µL de água milli-Q, 10µL de Master mix (1x), 2 µL de mix de IPC (10x), 0,4 µL de 50x IPC DNA, e 1 µL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores e sonda (iniciador na concentração de 30mM), acrescentando-se 2 µL de amostra teste de DNA. Como controle interno da reação em um dos poços da placa de 96 poços foi utilizado o IPC DNA com reagente bloqueador de IPC (*negative control blocked IPC*, Life®) e outro com o IPC DNA sem bloqueador. A amplificação foi realizada em termociclador StepOne Plus (*Applied Biosystems*) nas seguintes condições: pré PCR a 60°C por 30 segundos seguida de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto e 60°C por 30 segundos para extensão.

Para detecção de *Salmonella* sp. foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores SAL1410f 5'-GGTCTGCTGTA CTCCACCTTCAG-3' e SAL1494r 5'-TTGGAGATCAGTACGCCGTTCT-3' e sonda SAL1441pr FAM-TTACGACGATATTCGTCCGGGTGAAGTG – TAMRA, desenvolvidos por CALVÓ et al. (2008).

Foram consideradas positivas as amostras em que as curvas de amplificação geradas ultrapassaram a linha de corte observadas no programa StepOne Software v2.1 (*Applied Biosystems*). O grau de confiança estabelecido para a análise da corrida foi de 95%.

Análise estatística

Para interpretação dos resultados obtidos, foi feita análise da frequência dos dados. Para o estudo de concordância entre os testes utilizou-se o coeficiente de Kappa (K) e a interpretação convencional dos valores K adotados foram: 0,00 - 0,20 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81 - 1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,0.

RESULTADOS

No exame bacteriológico convencional, das 200 amostras de fezes colhidas dos pombos domésticos, 13% (26/200) foram consideradas positivas para *Salmonella* sp. Os sorotipos foram identificados pelo laboratório FIOCRUZ (RJ), dos quais foram 73,07% (19/26) foram tipificados como *Salmonella enterica* sorotipo Schwarzengrund, 23,07% (6/26) identificadas como *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e 3,84% (1/26) foi identificada como *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de Sorotipos de *Salmonella entérica* identificados pelo laboratório FIOCRUZ (RJ) em 13% (26/200) das amostras de fezes colhidas de pombos domésticos. As amostras foram analisadas por meio de exame bacteriológico convencional.

Sorotipo	N	Porcentagem
Schwarzengrund	19	73,07%
Typhimurium	6	23,07%
Enteritidis	1	3,86%
Total	26	100%

Na análise pela rPCR, 27% (54/200) amostras de pombos foram consideradas positivas para *Salmonella* sp.(Figura 2)

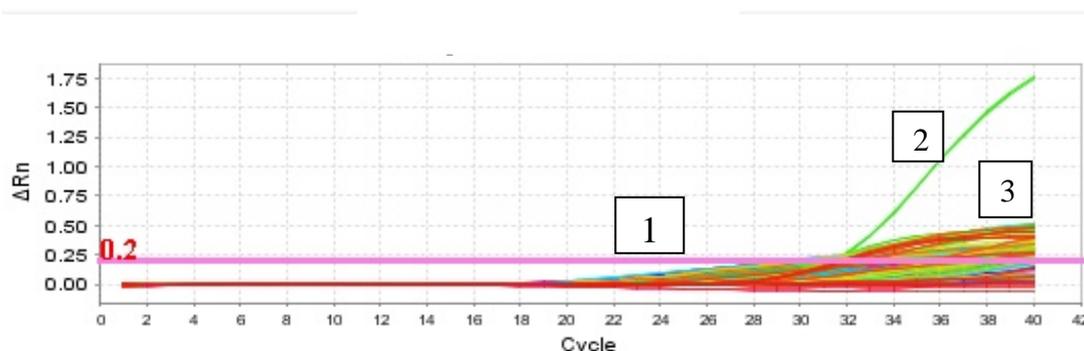


Figura2. Curvas de amplificação de DNA das amostras de pombos 1- Linha de corte threshold 2-Curva positiva para a detecção de *Salmonella* sp.no grau de confiança 95% 3 – Amostras negativas para a detecção de *Salmonella* sp. no grau de confiança de 95%.

Todas as 26 amostras provenientes dos pombos que foram positivas na bacteriologia convencional também foram positivas no rPCR.

Das 60 amostras colhidas dos urubus, nenhuma foi positiva no exame bacteriológico convencional para a pesquisa do agente. Já na análise pela rPCR das mesmas amostras colhidas de urubus, 8,3% (5/60) apresentaram resultados positivos (Figura 3)

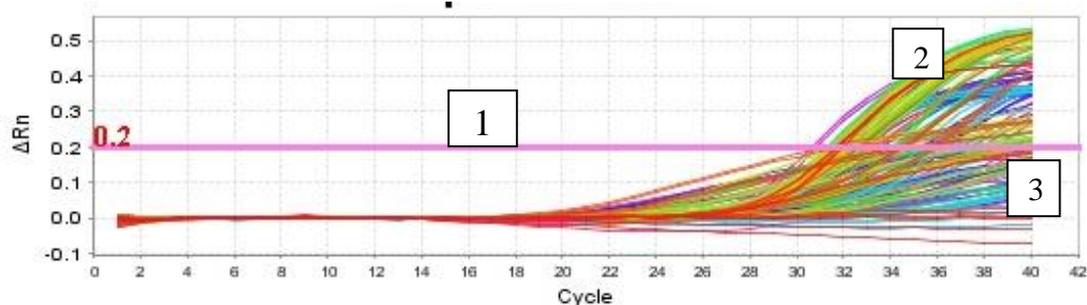


Figura 3. Curvas de amplificação de DNA das amostras de urubus 1- Linha de corte threshold 2-Curva positiva para a detecção de *Salmonella* sp.no grau de confiança 95% 3 – Amostras negativas para a detecção de *Salmonella* sp. no grau de confiança de 95%.

Os resultados obtidos nas duas análises laboratoriais estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos nos dois testes diagnósticos aos quais as amostras biológicas colhidas de pombos e urubus foram submetidas.

	Bacteriológico convencional		rPCR	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Pombos	26(13%)	174(87%)	54(27%)	146(73%)
Urubus	0	60(100%)	5(8,3%)	55(91,7%)

Na análise de concordância entre os dois métodos diagnósticos, para a análise das amostras obtidas dos pombos, a concordância ocorreu de forma moderada (0,40-0,59) (Tabela 3).

Tabela 3. Valores do índice de Kappa, seus intervalos de confiança de 95% e os valores de p para as categorias de teste 'positivo', 'negativo', e para o teste geral de Kappa. Foram considerados os resultados categóricos de dois testes: cultura bacteriológica e rPCR.

	Kappa	Intervalo de confiança de 95%	p
Positivo	0,576	Superior = 0,701 Inferior = 0,433	< 0,001
Negativo	0,576	Superior = 0,701 Inferior = -0,433	< 0,001
Geral	0,576	Superior = 0,701 Inferior: 0,45	< 0,001

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram observados uma alta frequência de *Salmonella* sp. em pombos domésticos. Nos resultados obtidos na rPCR, 100% das amostras positivas nesta análise concordaram com os resultados obtidos na cultura bacteriana.

A cultura bacteriana é o teste *gold standard* para a detecção de *Salmonella* sp. nas fezes dos animais, no entanto, para o processamento das amostras por essa técnica é necessário um prazo aproximado de uma semana. No rPCR as amostras são processadas em um prazo aproximado de 24h, incluindo-se o período de enriquecimento bacteriano. As técnicas moleculares vêm sendo usadas com sucesso na detecção de *Salmonella*, inclusive dos sorotipos específicos (DILMAGHANI et al., 2011). Estudos com alimentos contaminados com este agente mostraram bons resultados, com alta concordância entre os métodos bacteriológicos e PCR (MALORNY et al, 2009), No presente estudo a técnica da PCR em tempo real se mostrou adequada, sendo uma alternativa quando são necessários rápidos resultados, se mostrando apropriado como método complementar na detecção de *Salmonella* sp., resultados similares aos relatados por TEMELLI et al.(2010) e SOMMER et al. (2012).

Nas duas espécies aviárias analisadas no estudo, os resultados positivos foram mais frequentes na análise pela rPCR em relação aos resultados obtidos pela bacteriologia convencional. Resultados negativos na cultura bacteriana pode estar correlacionado com um alto número de células de *Salmonella* não cultiváveis ou mortas, ao número de células na amostra, crescimento de outras colônias bacterianas na cultura (ERIKSSON & ASPAN, 2007) ou ainda meios de enriquecimento bacteriano usados podem diminuir a sensibilidade da técnica bacteriológica, o que pode justificar a maior positividade na técnica molecular (ANDRADE et al., 2010).

Constatou-se que os sorotipos identificados, nesta pesquisa são pertencentes à espécie *Salmonella enterica*, os quais não são sorotipos específicos, ou seja, não são adaptados à uma única espécie animal. Eles

podem afetar diferentes espécies como aves, peixes e mamíferos. As aves de vida livre que vivem próximas aos humanos, devido ao aumento dos níveis de contaminação do meio ambiente, aparentemente são mais susceptíveis que outras aves a se infectarem e se manterem como carreadores intestinais desta bactéria (DILMAGHANI et al., 2011). Dependendo de fatores relacionados com o sorotipo bacteriano, espécie hospedeira, condições ambientais e grau de exposição do animal à *Salmonella*, podem se desenvolver em um hospedeiro assintomático ou animal doente por enterite, septicemia aguda ou infecção crônica multifocal (DOUST & PRESCOTT, 2007).

Trabalho similar foi conduzido por AKBARMEHR (2010) no Iran, onde foram pesquisadas amostras de avestruzes, pombos e frangos de corte. Nas amostras analisadas pelo métodos bacteriológicos, o pesquisador observou uma alta ocorrência desse agente em pombos, em relação às outras espécies pesquisadas, ou seja em 15,5% dos pombos foram positivos para *Salmonella enterica*, resultado próximo ao encontrado no presente estudo, reforçando a importância desta espécie aviária na epidemiologia da salmonelose.

O sorotipo mais encontrado nas amostras dos pombos capturados do presente estudo foi *Salmonella enterica* sorotipo Schwarzengrund, sorotipo pouco documentado no Brasil. Este agente é responsável por toxinfecção alimentar humana e aparenta ter grande importância para a criação de animais de produção. Em países asiáticos esse sorotipo se mostrou como um dos principais contaminantes de produtos alimentícios, incluindo-se carne de frango, constituindo um sério problema sanitário nesses países (KHOO, 2009; CHEN et al., 2010). Além disso, AARESTRUP et al. (2007) relataram que este sorotipo possui pouca especificidade quanto à possibilidade de infectar os animais e a possível dispersão de *Salmonella enterica* sorotipo Schwarzengrund em alimentos para humanos, reforça a sua importância na saúde pública.

Dentre os isolados de *Salmonella sp.*, (23%), seis amostras foram identificadas como *Salmonella enterica* do sorotipo Typhimurium. A detecção deste sorotipo em pombos já foi descrita na literatura por diversos autores. PEDERSEN et al. (2006) realizaram estudo com pombos

capturados em locais de criação de gado de leite e também em centros urbanos. Somente as aves capturadas nas áreas de produção foram detectadas como positivas para *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *S. enterica* sorotipo Montevideo, com o total de 1% de 277 aves consideradas positivas. Segundo DOUST & PRESCOTT (2007), existe uma correlação entre a prevalência de *Salmonella* no trato intestinal de várias espécies de aves silvestres e a sua proximidade com pessoas e animais de produção. Essas aves com frequência se aproveitam da proximidade de humanos e animais domésticos para a obtenção de alimento, e com isso se contaminam. Esta forma de exposição raramente envolve manifestações clínicas da doença, e a eliminação da bactéria pelas fezes na maioria dos casos é de curta duração.

De forma semelhante, MARCIANO (2004) detectou *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium em 8% dos órgãos e de fezes de pombos. Também ADESIYIUM et al. (1998) realizaram o isolamento deste sorotipo em uma amostra obtida de pombos correios, também da espécie *Columba livia*, na Espanha.

Pesquisadores da Croácia isolaram *S. enterica* sorotipo Typhimurium em 17 de 107 amostras examinadas em pombos, obtendo um percentual de 15,3% de positividade no isolamento deste agente de excretas no exame bacteriológico (VUCEMILO et al. 2003).

Na Bélgica, PASMANS et al. (2004) também realizaram o isolamento deste sorotipo em pombos, com a frequência de 3,3% de aves consideradas positivas, resultado semelhante ao encontrado aqui, com 3% (6/200) de amostras positivas para *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium. Os resultados obtidos neste estudo indicam os pombos como disseminadores de *Salmonella enterica* do sorotipo Typhimurium.

Das amostras isoladas de *Salmonella* sp., uma foi sorotipada como *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis, resultado que concorda com os obtidos em trabalho conduzido por SOUSA et al. (2010), que amostras biológicas de várias espécies de aves silvestres foram submetidas a exames sorológicos e bacteriológicos para a detecção de *Salmonella*. Assim como foi detectado no presente trabalho, *Salmonella enterica*

sorotipo Enteritidis foi isolada por bacteriologia convencional de uma amostra de columbiforme.

Pelo grande contato dos pombos domésticos com resíduos, esses animais se tornam mais suscetíveis à infecção pela *Salmonella*, e se tornam hospedeiros acidentais deste agente (TIZARD, 2004; ČÍŽEK et al., 2007)

Na Noruega foi realizada pesquisa usando a mesma técnica da bacteriológica convencional, em suabes cloacais, as quais apresentaram resultados negativos (LILLEHAUG et al., 2005). A discordância entre resultados obtidos na Noruega e do presente trabalho podem ser explicados pela característica da excreção da *Salmonella*, que ocorre de forma intermitente. Ainda, as condições climáticas do referido país e também pelo estilo de vida da população quanto à destinação de resíduos também podem ter influenciado para o resultado negativo, uma vez que são bem distintas das condições locais da região do presente estudo.

Na análise bacteriológica das amostras de suabes cloacais obtidos de urubus, nenhuma amostra foi considerada positiva para *Salmonella enterica*. Mesmo tendo sido pesquisado em menor número de amostras, estes resultados concordam com o que é relatado pela literatura, que os urubus apresentam naturalmente uma menor suscetibilidade aos patógenos. Neste sentido, ao longo dos anos muitas hipóteses foram sugeridas, como a relação com as condições físicoquímicas e fisiológicas do sistema gastrointestinal destes animais, o estabelecimento evolutivo de uma absorção específica deste sistema, ou hipótese da presença de uma microbiota mais complexa ao longo do sistema digestivo. Com isso, postula-se que existe uma microbiota no sistema gastrointestinal dessas aves que competem com agentes patogênicos, diminuindo, portanto, o risco de disseminação destes (OCANDO et al., 1991; CARVALHO et al., 2003; SILVA et al., 2010). Este fato provavelmente se justifica, porque nenhuma das amostras foi positiva no exame bacteriológico convencional e cinco delas foram positivas pela rPCR. A positividade em rPCR se explica provavelmente pela alta sensibilidade da técnica, já que esta técnica é capaz de detectar o microrganismo mesmo que sua presença seja em quantidades mínimas (MALORNY et al., 2004). Também, é possível que o microrganismo não tenha sido capaz de se reproduzir no intestino destas

aves, visto que a microbiota competitiva é capaz de inibir sua multiplicação (CARVALHO et al., 2003), portanto não foi detectável no método bacteriológico convencional.

Além disso, no estudo, as amostras obtidas dos pombos domésticos consistiam em conteúdo intestinal e as amostras colhidas dos urubus eram suabes cloacais. Em estudo comparativo de amostras biológicas relatado por TEMELLI et al (2010), para a detecção de *Salmonella* sp. por cultura bacteriana e rPCR o uso de conteúdo intestinal gera resultados mais confiáveis em relação às amostras de suabe cloacal, como os que foram usados para o processamento das amostras obtidas dos urubus. O frescor das fezes no momento da análise e nível de umidade podem levar a detecção de resultados falso negativos. Além disso, nas fezes estão presentes grandes quantidades de enzimas DNazes e proteases, e polisacarídeos que podem ser fatores inibitórios para a PCR (MALORNY et al, 2005), no entanto, a fase de pré enriquecimento, como a realizada no presente estudo, inibe a ação destes agentes, diminuindo estes efeitos negativos na reação (SOMMER et al, 2012).

SILVA et al. (2010) ao estudarem a relação dos hábitos alimentares de urubus observaram que existe relação direta da disseminação dos agentes com a saúde ambiental, podendo inclusive esta ave ser um bioindicador da saúde ambiental. No entanto, maiores estudos com essa espécie aviária são necessários para se confirmar o seu real papel na epidemiologia da salmonelose.

A maior densidade de animais sinantrópicos pode levar a um aumento das aves comerciais infectadas por *Salmonella* (LAPUZ et al.,2012). Animais portadores são de grande importância como fonte de infecção, já que podem excretar as bactérias de forma intermitente pelas fezes por meses ou até anos (HALES & HALES, 2003), levando a contaminação dos ambientes. Devido às dificuldades no controle de agentes patogênicos na produção avícola, medidas sanitárias adequadas nas instalações vem sendo alvo de cada vez mais estudos, dada a importância destes meios para a manutenção dos patógenos no ambiente.

CONCLUSÕES

Salmonella entérica dos sorotipos Schwarzengrund, Enteritidis e Typhimurium viáveis estão presentes na microbiota de pombos domésticos da região metropolitana de Goiânia. *Salmonella* sp. foi detectada em urubus de cabeça preta da região metropolitana de Goiânia.

REFERÊNCIAS

1. AARESTRUP, F.M.; HENDRIKSEN, R.S.; LOCKETT, J.; GAY, K.; TEATES, K.; MCDERMOTT, P.F.; WHITE, D.G.; HASMAN, H.; SORENSEN, G.; BANGTRAKULNONTH, A.; PORNREONGWONG, S.; PULSIKARN, C.; ANGULO, F.J.; GERNERSMIDT, P. International Spread of Multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in Food Products. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, 2007.
2. AKBARMEHR, J. Isolation of *Salmonella* spp. from poultry (ostrich, pigeon, and chicken) and detection of their *hilA* gene by PCR method. **African Journal of Microbiology Research** v. 4, n. 24, p. 2678-2681, 2010.
3. ANDRADE, R.B.; GEMELLI, L.P.; DALL ONDER, L.P.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A.A.L.; BRITO, B.G. Metodos diagnosticos para os patógenos alimentares *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, 2010.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Defesa Animal. Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Portaria Ministerial nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) no âmbito da DAS e cria o comitê consultivo do Programa de Sanidade Avícola. **Diário Oficial da União**. [online]. Brasília, 19 set. 1994, p. 29. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. Acesso em 29 de jun. 2012.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aves. 2012. Disponível em: <HTTP://WWW.agricultura.gov.br/animal/espécies/aves>. Acesso em: 12 de dezembro de 2012.
6. CALVÓ, L.; MARTINEZ-PLANELLAS, A.; PARDOS-BOSH, J.; GARCIA-GIL, L.J. A New Real-Time PCR Assay for the Specific Detection of *Salmonella* spp. Targeting the *bipA* Gene. **Food Analytical Methods**, 1, p. 236-242, 2008.
7. CARVALHO V.M. Colibacilose e salmonelose, p.742-750. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.
8. CARVALHO, L.R.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R.; SILVA, M.C.F.; CORSINO, A.T.S.M.; LIMA, L.A.; REDONDO, R.A.F.; FERREIRA, PINTO, M.E.B.M. Dominant culturable bacterial microbiota in the

- digestive tract of the American black vulture (*Coragyps atratus* Beichstein 1793) and search for antagonistic substances. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p.218-224, 2003.
9. CHEN, M.H.; WANG, S.W.; HWANG, W.Z.; TSAI, Y.C.; HSIH, Y.C.; CHIOU, C.S., TSEN, H.Y. Contamination of *Salmonella* Schwarzengrund cells in chicken meat from traditional marketplaces in Taiwan and comparison of their antibiograms with those of the human isolates. **Poultry Science**. V. 89, p. 359–365, 2010.
 10. ČÍŽEK, A.; DOLEJSKÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, . R.; DĚDIČOVÁ, D.; LITERÁK, I. Wild black-headed gulls (*Larus ridibundus*) as an environmental reservoir of *Salmonella* strains resistant to antimicrobial drugs. **European Journal of Wildlife Research** V. 53, pp. 55–60, 2007.
 11. DEL HOYO, J., A. ELLIOTT AND D.A. CHRISTIE .**Handbook of the Birds of the World**. v. 8. Broadbills to Tapaculos. Barcelona: Lynx Edicions, 845p.2003.
 12. DILMAGHANI, M.; AHMADI, M; ZAHRAEI-SALEHI, T.; TALEBI, T. Detection of *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium from avians using Multiplex-PCR. **Veterinary Research Forum**, v.2, n.3, p.157-165, 2011.
 13. DOUST, P.; PRESCOTT, J.F. Salmonellosis, in: **Infections Diseases of Wild Bids**, cap.13, p. 270-288, Iowa: Blackwell publishing, 2007.
 14. ERIKSSON, E.; ASPAN, A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. **BMC Veterinary Research**, v.3, n.21, 2007.
 15. GEORGIA POULTRY LABORATORY. **Monitoring and detection of *Salmonellain* poultry and poultry environments**. Oakwood: Georgia Poultry Laboratory, 1997.293p. [Workshop]. GEORGIA POULTRY LABORATORY, 1997.
 16. HALES, R.C.; HALES, M.A. *Salmonella*: Market opportunities for the animal health industry. **Animal Pharm Reports**. New York: PJB Publications. 2003.
 17. HERNANDEZ-DIVERS S.M., VILLEGAS P., PRIETO F., UNDA J.C., STEDMAN N., RITCHIE B., CARROLL R. & HERNANDEZ-DIVERS S.J. A survey of selected avian pathogens of backyard poultry in Northwestern Ecuador. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v.20, p.147-158, 2006.

18. KHOO, C. H., CHEAH, Y. K., LEE, L. H., SIM, J. H., SALLEH, N. A., SIDIK, S. M., RADU, S. and SUKARDI, S., Virulotyping of *Salmonella* enterica subsp. enterica isolated from indigenous vegetables and poultry meat in Malaysia using multiplex-PCR. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 441-457, 2009.
19. LAPUZ, R.R.S.; UMALI, D, D.V.; SUZUKI, T.; SHIROTA, K.; KATOH, H. Comparison of the prevalence of *Salmonella* infection in layer hens from commercial layer farms with high and low rodent densities. **Avian Diseases**, v. 56, p. 29-34, 2012.
20. LILLEHAUG, A.; MONCEYRON JONASSEN, C.; BERGSJO, B.; HOFSHAGEN, M.; THARALDSEN, J.; NESSE, L.L.; HANDDELAND, K. Screening of feral Pigeon (*Columba livia*), Mallard (*Anas platyrhynchos*) and Grayland Goose (*Anser anser*) Populations for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Avian Influenza Virus and Avian Paramyxovirus. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 46, n.4, 2005.
21. LOPES, L. F. L. *Salmonella* sp. Em répteis e aves silvestres no estado de São Paulo: Frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as conseqüências para o manejo em cativeiro e reintrodução. **Tese** (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.124 f.
22. LUTTRELL, P.; FISCHER, J.R. Mycoplasmosis. In: Thomas, N.J.; Hunter, D. B.; Atkinson, C.T. **Infectious Disease of Wild Birds**. Iowa: Blackwell publishing., 2007. Cap. 16, p.317-330.
23. MARCIANO, J.A. Pesquisa de *Salmonella* spp. Cryptococcus neoformans e anticorpos anti toxoplasma gondii em pombos urbanos (*Columba livia*) no município de Jaboticabal – SP. 65f. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de ciências Agrarias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2004.
24. MALORNY, B.; PACCASSONI, E.; FACH, P.; BUNGE, C.; MARTIN, A.; HELMUTH, R. Diagnostic Real-Time PCR for detection of *Salmonella* in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.12, p. 7046-7052, 2004.
25. NUNES, V.F.P. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Revista do instituto Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1, p 89-92, 2003.
26. OCANDO, D.C.O.; PIRELA, S.E.R.; AJJAM, E.; AUVERTY, R.S. Caracterizacion protéica Del suero Del ave *Coragyps atratus* (Zamuro de cabeza negra) y algunos estúdios inmunoserologicos. **Revista Científica FCV de LUZ**, Maracaibo v. 1, n.2, 1991.

27. PASMANS, F.; IMMERSEEL, F.V.; HERMANS, K.; HEYDRICKX, M.; COLLARD, J.; DUCATELLE, R.; HAESNBROUCK, F. Assesment of virulence of pigeon isolates of *Salmonella* enteric subsp. Enteric serovar Typhimurium Variant Copenhagen for humans. **Journal of Clinical Microbiology**, p.2000-2002, v. 42, n.5, 2004.
28. PEDERSEN, K.; CLARK, L.; ANDELT, W.F.; SALMAN, M.D. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* enteric in rock pigeons captured in fort Collins Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v.42, n.1, pp 46-55, 2006.
29. PENNYCOTT, T.W.; PARK, A.; MATHER, H.A. Isolation of different serovars os *Salmonella* enteric from wildbirds in Great Britain between 1995 and 2003. **Veterinary Records**. 158: 817-820, 2006.
30. RADU, S.M.; SUKARDI, S.; S. Virulotyping of *Salmonella enterica* subsp. enterica isolated from indigenou vegetables and poultry meat in Malaysia using multiplex-PCR. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 441–457, 2009.
31. REFSUM, T.; VIKOREM, T.; HANDELAND, K.; KAPPERUD, G.; HOLSTAD, G. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella*Typhimurium infection in passerine birds in Norway. **Journal of Wildlife Diseases**, v.39, pp. 64-72, 2003.
32. SANTIAGO, R. G. Urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) **Guia Interativo de Aves Urbanas**, 06 dez. 2006. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/lte/giau/visualizarMaterial.php?idMaterial=364>. Acesso em: 13 jun. 2010.
33. SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PONTES, A.P.; (1), Aldemir RIBEIRO, A.R.; SALLE, C.T.P.& LOPES, R.F.L. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) FOR THE DETECTION OF *Salmonella* IN ARTIFICIALLY INOCULATED CHICKEN MEAT. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**. 43 (5):247-250, Setembro-Outubro.2001.
34. SILVA, M.A.; MARVULO, M.F.V.; MOTA, R.A.; SILVA, J.C.R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeiaepidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v.30, n.7, p.573-580, 2010.
35. SICK, Helmut. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001. 912p.
36. SOMMER, D.; ENDERLEIN, D.; ANTAKLI, A.; SCHONENBRUCHER, H.; SLAGHUIS, J.; REDMANN, T.; LIERZ, M. *Salmonella* detection in poultry samples. **Tierärztliche Praxis GroBtiere**, v.6, p. 383-389, 2012.

37. SOUSA, E.; WERTHER, K.; BERQUIERI JUNIOR, A. Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens and *Salmonella* spp. In wild birds captured near poultry facilities. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n1, p. 219-223, 2010.
38. TEMELLI, S.; KAHYA, S.; EYIGOR, A.; CARLI, K.T. Incidence of *Salmonella* Enteritidis in Chicken layer flocks in Turkey: Results by Real-time polymerase chain reaction and international organization culture methods. **Poultry Science**, v.89, p. 1406-1410, 2010.
39. TIZARD, I. Salmonellosis in wild birds. **Seminars in avian and exotic pet medicine**, v.13, n.2, pp.50-66, 2004.
40. VUCEMILO, M.; VLAHOVIC, K.; DOVC, A.; MUZINIC, J.; PAVLAK, M.; JERSIK, J.; ZUIPANCIC, Z. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium*, and avian *Paramyxovirus* type 1 (PMV-1) in pigeons from different regions in Croatia. **Zeitschrift Fur Jagdwissenschaft**, V.49, p. 303-313, 2003.
41. YORIO, P.; GIACCARDI, M. Urban and fishery waste tips as food sources for birds in northern coastal Patagonia, Argentina. **Ornitologia Neotropical**, 13: 283-292, 2002.

CAPÍTULO 3: *Mycoplasma gallisepticum* E *M. synoviae* EM POMBOS COMUNS (*Columba livia*) E URUBUS DE CABEÇA PRETA (*Coragyps atratus*) NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA

RESUMO: Informações relativas à ocorrência de agentes patogênicos em animais de vida livre são essenciais para o estabelecimento de medidas

adequadas de biossegurança para a produção animal. Para tanto, amostras biológicas de 260 aves de vida livre de hábitos sinantrópicos, 200 pombos (*Columba livia*) e 60 urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*) foram pesquisados para a presença de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* pela técnicas de soroaglutinação rápida em placa (SAR) e detecção direta pela PCR em tempo real (rPCR). Das amostras colhidas dos pombos, 7,5% (15/200) foram reativas no teste sorológico, sendo 4,5% (9/200) positivas para a detecção de anticorpos anti-*M. gallisepticum* e 3% (6/200) para anti-*M. synoviae*. No método da rPCR, 2,5% (5/200) das amostras dos pombos foram positivas para detecção de *M. gallisepticum* e nenhuma amostra positiva para *M. synoviae*. Das amostras colhidas dos urubus, todas foram negativas em ambos os testes em que foram submetidas. Os resultados mostram a importância do pombo comum como portador de *M. gallisepticum*.

Palavras-chave: aves sinantrópicas, micoplasmose, rPCR, sorologia.

CHAPTER 3: *Mycoplasma gallisepticum* AND *M. synoviae* IN PIGEONS (*Columba livia*) AND BLACK HEAD BUZZARDS (*Coragyps atratus*) IN THE METROPOLITAN REGION OF GOIANIA

SUMMARY: Information concerning the occurrence of pathogens in free-living animals are essential for the establishment of appropriate biosecurity measures for animal production. To this end, biological samples from 260 synanthropic birds, 200 pigeons (*Columba livia*) and 60 black head

buzzards (*Coragyps atratus*) were screened for the presence of antibodies against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma Synoviae* with techniques for rapid plate agglutination (SAR) and direct detection of these agents by real-time PCR (rPCR). The samples taken from birds, 7.5% (15/200) were reactive in serological testing, and 4.5% (9/200) were positive for the detection of anti-*M. gallisepticum* and 3% (6/200) to anti-*M. Synoviae*. In the method of rPCR, 2.5% (5/200) of samples of the pigeons were positive for detection of *M. gallisepticum* and none were positive for *M. synoviae*. Of the samples taken from the vultures, none were positive in both tests in which they were submitted. The results show the importance of the common pigeon as a transmitter of *M. gallisepticum*.

Keywords: Mycoplasmosis, rPCR, pigeons, vultures, serology.

INTRODUÇÃO

As micoplasmoses são enfermidades causadas por *Mycoplasma*, agentes bacterianos amplamente distribuídos entre os seres vivos e que podem causar enfermidades de caráter agudo ou crônico (LUTTRELL & FISCHER, 2007).

Para a avicultura comercial, *Mycoplasma gallisepticum* é a espécie de maior importância econômica, seguida de *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. meleagridis*. A micoplasmose gera significativas perdas econômicas atribuídas à queda na produção e na qualidade dos ovos, má eclodibilidade, queda na eficiência alimentar, altas taxas de mortalidade e condenação de carcaças, além de altos custos das medicações. No Brasil, estima-se que anualmente 30 mil toneladas de carne de frango são perdidas na fase final de produção, por problemas respiratórios, o que leva a um prejuízo de cerca de 30 milhões de dólares (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009).

Mycoplasma pode ser transmitido horizontalmente de ave para ave por meio de aerossóis, por contato direto com outras aves ou contato indireto por pessoas, animais, ração, água e fômites e ainda verticalmente, pela via transovariana. As variadas formas de transmissão do agente dificultam sua erradicação e implicam na adoção de medidas de controle constantes, onerosas e nem sempre efetivas (PEREIRA & SILVA, 2005).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu através da Portaria Ministerial nº193 de 19 de setembro de 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) com o objetivo de garantir a qualidade dos produtos de origem avícola sanitariamente controlados. Este programa prevê normas de controle e/ou erradicação da micoplasmose e outras enfermidades que causam impacto para a avicultura (BRASIL, 1994).

Entre outras medidas, o Programa preconiza o monitoramento nos planteis de reprodução para a certificação de núcleos e granjas avícolas para a micoplasmose aviária. Seu agente perpetua-se na natureza infectando aves domésticas e de vida livre, notadamente na ausência de manifestação clínica, e dissemina-se na população de aves (BERCHIERI JÚNIOR, 2009).

De acordo com WILLIAMS et al. (2002), a detecção de *Mycoplasma* nos animais silvestres é crescente e muitas dos relatos são associados à enfermidades clínicas. A detecção de micoplasmas em aves silvestres já é relatada desde a década de 1950, quando foi reportado o isolamento de *Mycoplasma* spp. do saco aéreo de um periquito acometido por doença

respiratória (ADLER, 1957). Desde então, devido ao grande impacto da enfermidade para a avicultura comercial, aves de vida livre foram apontadas como possíveis transmissoras da enfermidade em plantéis comerciais avícolas. Os estudos relativos a essa doença para aves comerciais tem sido amplamente desenvolvidos, no entanto, aves de vida livre, que são possíveis elos da cadeia epidemiológica, são pouco estudadas (MACWHIRTER, 2010), sendo que a preocupação com a importância clínica deste agente nessas populações é recente e está relacionada principalmente aos impactos ecológicos causados pelo patógeno nessas populações aviárias (DORRESTEIN, 2010).

Desde a descoberta dos microrganismos da classe dos *Mollicutes*, várias foram as técnicas de diagnóstico propostas (PAKPYNIO et al, 2006). Visto suas particularidades, estes microrganismos são dificilmente cultivados por bacteriologia convencional, portanto, são necessários outros métodos para a detecção do agente. Os métodos de detecção indireta, tais como a Sorologia Rápida em Placa (SAR) é usada com sucesso como método de triagem, no entanto, existem alguns inconvenientes, tais como reações cruzadas, que limitam o seu uso (NASCIMENTO & PEREIRA, 2009). Para a confirmação da presença de *Mycoplasma*, técnicas moleculares vem sendo propostas e usadas com sucesso. As análises pela reação em cadeia da polimerase (PCR) desenvolvidas para ampliar DNA de vários micoplasmas, têm tido grande impacto no diagnóstico das micoplasmoses (NASCIMENTO et al., 1991; LAUERMAN et al., 1994). Estes métodos permitem detectar micoplasmas com grande sensibilidade e também alta especificidade sem a necessidade de cultivo do organismo (NASCIMENTO et al., 1993).

Seja pela importância destas aves como possíveis reservatórios dos agentes ou também pelo possível acometimento destes animais por este microrganismo que pode levar a um impacto ecológico nas populações de vida livre, se propôs este estudo visando analisar a presença de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em pombos e urubus provenientes de áreas próximas a explorações comerciais avícolas da região metropolitana de Goiânia, uma vez que tais agentes são de difícil controle na cadeia produtiva avícola. Também, o estudo objetivou a análise do método de

diagnóstico pela rPCR para a detecção destes agentes na população destas duas espécies aviárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Goiás (CETAS/GO).

Animais e coleta das amostras

Foram utilizados 200 pombos (*Columbia livia*) e 60 urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*). Os pombos foram capturados com o apoio da equipe do Centro de Zoonoses da cidade de Aparecida de Goiânia. As aves foram capturadas de forma aleatória de regiões em um raio de até 50 km de empresas avícolas.

Na captura foram utilizadas cinco armadilhas de aço galvanizado modelo Argentina (Hebei Panfa Trade Co, Ltd), de 1,00 m³. Estas armadilhas foram instaladas pela manhã permanecendo abertas durante todo o dia, sendo vistoriadas esporadicamente durante o dia, para retirada das aves capturadas e reabastecimento dos comedouros e bebedouros.

Os pombos foram retirados manualmente das armadilhas, com a utilização de equipamentos de proteção individual adequados: luvas, óculos de acrílico com proteção lateral, máscaras semi-faciais com filtro de proteção P3 e acondicionados em gaiolas de transporte, em veículo de carroceria aberta até o laboratório, semanalmente.

Após a captura, as aves eram levadas ao Núcleo Experimental de Doenças de Aves, onde eram colhidas amostras de sangue para a obtenção do soro, posteriormente os pombos eram eutanasiados e era colhida uma porção de aproximadamente três cm da traqueia, que era congelada para posterior processamento.

Os urubus usados no experimento eram provenientes do Centro de Triagem de animais selvagens (CETAS-GO). As aves eram levadas por autoridades ambientais, que realizavam sua captura quando necessária. Dos animais recebidos pelo CETAS, eram coletadas amostras de sangue por punção da veia ulnar ou metatársica e suabes traqueais através da fricção da parede da mucosa traqueal. As amostras eram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas imediatamente para o laboratório.

Este estudo foi realizado após licença obtida junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO),

protocolo N^o 25795-1 e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Goiás, protocolo 080/11.

Metodologia da sorologia para *Mycoplasma* spp.

A detecção dos anticorpos anti-*Mycoplasma synoviae* e anti-*Mycoplasma gallisepticum*, realizada nas amostras do soro recém colhidas, foi feita pelo método de Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR) empregando-se kit comercial (Synovitest® e Myco-Galli Teste®, Biovet, São Paulo). Para a análise das amostras foi utilizada uma placa de vidro subdividida em 30 quadrados de 2,5 x 2,5cm. Em cada quadrado foram colocados aproximadamente 50 µL de soro e 50 µL de antígeno. Em seguida, o conteúdo foi homogenizado em movimentos circulares por aproximadamente cinco segundos. Após dois minutos, foi feita a leitura, se observando a formação ou não de grumos. A amostra foi considerada positiva quando houve a formação de grumos característicos de forma uniforme.

Metodologia PCR em Tempo Real

Antes de se iniciar o procedimento de extração do DNA, os fragmentos de traqueia e os suabes traqueais colhidos dos animais capturados foram colocados individualmente em tubos de polipropileno em que foi adicionado 1ml de água milli-Q e posteriormente agitado em vórtex por 30 segundos.

A extração do DNA das amostras foi realizada de acordo com o proposto por LAUERMAN (1998). Foram adicionados 400 µL de água milli-Qem 600 µL da amostra contida em tubo de polipropileno de 1,5mL livre de DNA e RNA (Axygen), o material foi agitado em vórtex por 60 segundos. Posteriormente, o tubo foi levado em placa aquecedora a 100 °C por 20 segundos e após este período foi incubado em gelo e mantido no refrigerador por 20 minutos. Após o descanso da amostra em ambiente refrigerado procedeu-se centrifugação a 15.000 RPM por cinco minutos. O

material foi então aliquotado e armazenado a - 20°C em refrigerador para posterior utilização.

Os eluatos obtidos a partir das amostras extraídas foram utilizados para realização de rPCR utilizando-se sistema TaqMan®. O volume adotado foi de 20 µL utilizando-se 4,6 µL de água milli-Q, 10µL de Master mix (1x), 2 µL de mix de IPC (10x), 0,4 µL de 50x IPC DNA, e 1 µL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores e sonda alvo (0,3µL de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 30mM e 0,4 µL na concentração de 10mM da sonda alvo), acrescentando-se 2 µL de DNA. Como controle negativo em um dos poços da placa de 96 poços foi utilizado o reagente bloqueador de IPC (*negative control blocked IPC*, Life®). A amplificação foi realizada em termociclador StepOne Plus (*Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Foster City, EUA*) com as seguintes condições: pré PCR a 60°C por 30 segundos seguida de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por um minuto e 60°C por 30 segundos para extensão (SPRYNGIN et al, 2010).

Para detecção de *Mycoplasma spp.* foi utilizada uma reação duplex com os oligonucleotídeos iniciadores mgc2-F 5'-GCTGGGTTGATTGTTGTTTCTT-3' e mgc2-R 5'-TCTTCACGTTCTTGGATCATCAT-3' e sonda mgc2-probe 5'-aCTCTT(G/C)GGTTTAGGGATTGGGATTCCG-3', para obtenção de um fragmento de 94 pb, para detecção de *M. gallisepticum* (SPRYNG et al.,2010). Os oligonucleotídeos iniciadores vIhA-F 5'-CCAGGAGGTGGTACAGTTGAC-3' e vIhA-R 5'-TTAATGCTTCTTTAACT(G/A)AATCTGA-3' e sonda vIhA-probe FAM- 5'-CTGCTAAAACAG AAGCTAAAAC(C/T)GCTAT-3' ,foram empregados para a detecção de *M. synoviae* para a obtenção de um fragmento de 102 pb (SPRYNGIN et al., 2010).

Foram consideradas positivas as amostras em que as curvas de amplificação geradas ultrapassaram a linha de corte observadas no programa StepOne Software v2.1 (*Applied Biosystems*) e apresentaram uma curva de dissociação semelhante ao controle positivo de cada teste

avaliado. O grau de confiança estabelecido para a análise da corrida foi de 95%.

Análise estatística

Para interpretação dos resultados obtidos, foi feita análise da frequência dos dados.

RESULTADOS

Das amostras de sangue colhidas dos pombos, 7,5% (15/200) foram reagentes no teste de Soroaglutinação Rápida em placa (SAR), sendo 4,5% (9/200) das amostras reagentes para anticorpos anti- *M. gallisepticum* e 3% (6/200) para anticorpos anti-*M. synoviae* (Tabela 1), 1%(2/200) foram positivas em ambos os testes de SAR.

Pelo método de rPCR, 2,5% (5/200) das amostras de traqueia foram positivas para de *M. gallisepticum* (Tabela1).

Das amostras colhidas dos urubus, nenhuma foi positiva para a detecção pela rPCR e pela SAR.

Tabela 1: Resultados obtidos nos dois testes diagnósticos aos quais as amostras biológicas colhidas de pombos e urubus foram submetidas.

	Sorologia (SAR)		rPCR	
	<i>M. gallisepticum</i>	<i>M. synoviae</i>	<i>M. gallisepticum</i>	<i>M. synoviae</i>
Pombos	4,5% (9/200)	3% (6/200)	2,5% (5/200)	0
Urubus	0	0	0	0

DISCUSSÃO

Das 200 amostras de soro obtidas de pombos, 4,5% (9/200) foram positivas para a detecção de anticorpos anti- *M. gallisepticum* e 3% (6/200) para anticorpos anti-*M. synoviae* quando foram analisadas pela técnica de SAR. Deve se ressaltar que a técnica de SAR é amplamente utilizada para a pesquisa de anticorpos anti-*Mycoplasma* em avicultura, podendo ser

usado também em aves silvestres (FERREIRA, 2012). No entanto o uso nestas populações é pouco documentado uma vez que o interesse por pesquisas destes agentes nas populações aviárias não comerciais é recente.

No presente estudo, as amostras reagentes de pombos representaram 4,5% para *M. gallisepticum* utilizando a técnica SAR e 2,5% das amostras positivas pela técnica confirmatória rPCR. Vários elementos podem ter influenciado no resultado na técnica sorológica, entre eles o fato de que a sorologia pesquisa apenas a presença do anticorpo contra o determinado agente, já no método de rPCR a pesquisa é do agente de forma direta. Além disso, outros elementos podem influenciar nos resultados obtidos nestes métodos, tais como tipo de amostra coletada, os primers escolhidos ou mesmo interferências no momento da coleta.

A análise laboratorial sorológica para a detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma* são, de modo geral, testes que podem ser realizados em um curto período de tempo, seja o teste de SAR, como o usado no presente estudo, ou mesmo outros testes, como inibição de hemaglutinação ou teste de imunoensaio (ELISA) (KLEVEN, 1998). No entanto, foi constatado que testes sorológicos possuem alguns inconvenientes, entre eles, o fato de que a seroconversão ocorre após a infecção, sendo que um mínimo de uma semana após a infecção é necessária antes que anticorpos sejam detectados pela técnica de SAR. Para a detecção por inibição de hemaglutinação, três semanas são necessárias (GEORGIANES et al., 2001). Além disso, foi relatado por alguns autores reações não específicas causadas por reações cruzadas com outros patógenos e ainda, sensibilidade relativamente baixa de alguns testes sorológicos (KLEVEN et al., 1996; KEMPF et al., 1997).

A baixa especificidade da SAR é responsável pela falta de segurança no diagnóstico final das micoplasmoses, principalmente quando é empregada isoladamente (MENDONÇA et al., 2003). Falsos positivos podem ser atribuídos à presença de globulinas ou algum outro componente do soro no meio de crescimento usado na cultura de micoplasma para produção de antígeno para o teste SAR em placas. Deve ser considerado ainda que há variabilidade entre as partidas dos antígenos e entre os

procedimentos dos testes, além de haver possibilidade de reação positiva em soros contaminados, como destacado por BUCHALA, (2003) e MENDONÇA et al. (2003). Por isso, o teste de SAR é recomendado como teste de triagem, e deve ser sempre associado à outro método laboratorial.

Não deve também ser excluída a possibilidade de ter ocorrido uma reação cruzada com anticorpos que foram produzidos por contato com outras espécies de *Mycoplasma* que possam contaminar essa espécie aviária (LORIA et al., 2005; HARLIN & WADE, 2009). De acordo com KLEVEN (2003), três espécies de *Mycoplasma* foram isoladas de pombos domésticos, que aparentemente são específicas para esse grupo aviário: *M. columborale*, *M. columbinum* e *M. columbinasale*, que foram isolados de suabe de traqueia de pombos clinicamente normais e também de animais que apresentavam doença respiratória. Portanto, a possível presença destes agentes pode levar a reações cruzadas no teste de SAR.

FERREIRA (2012) realizou pesquisa sorológica pelo método de SAR em amostras de pombos no estado de São Paulo, obtendo 3,3% das aves positivas para *M. synoviae* e 2,5% positivas para *M. gallisepticum*. Como prova confirmatória neste estudo utilizou-se a técnica de inibição da hemaglutinação, obtendo-se resultados negativos para todas as amostras. Os resultados obtidos foram similares aos de FERREIRA (2012), no entanto, houve maior proporção de *M. gallisepticum* (4,5%) em relação a *M. synoviae* (3%), assim como as amostras positivas para *M. synoviae* à sorologia foram negativas no teste confirmatório de rPCR, o que pode levantar a hipótese de ter ocorrido alguma reação cruzada na SAR, que levou ao resultado falso positivo.

TSAI & LEE (2006) realizaram estudo sorológico para *M. synoviae* em pombos-correios em Taiwan, e obtiveram 1,8% de soros reagentes, e para *M. gallisepticum* 1,3% de soros positivos. Os pombos-correio são aves da espécie *Columba livia*, assim como os pombos comuns aqui analisados, no entanto, são aves mantidas como *pet* em ambientes com disponibilidade de água, abrigo e comida na maioria dos casos. Mesmo assim, os resultados obtidos no presente se assemelham com os resultados das sorologias destes autores.

Fragmentos de traqueia de pombos e suabes traqueais dos urubus foram analisados para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* através da técnica da rPCR. Neste método laboratorial, 2,5% (5/200) das amostras dos pombos foram positivas para *M. gallisepticum*. O material biológico para a análise pela rPCR das duas espécies aviárias foram coletados de diferentes formas. O material coletado dos pombos foi o fragmento de traqueia e nos urubus a coleta foi realizada por suabe traqueal. Em trabalho comparativo entre os tipos de amostras coletadas para a detecção de *Mycoplasma* realizado por BARROS (2011) não se constatou diferença estatística significativa entre os resultados obtidos na análise dos diferentes materiais biológicos, portanto, o diferente tipo de material biológico não justificaria a menor ocorrência deste agente nas amostras colhidas dos urubus.

Outros trabalhos brasileiros já buscaram informações acerca de informações sanitárias em aves de vida livre e sua importância como transmissoras de agentes infecciosos para aves de produção (SOUSA et al, 2010; HURTADO et al. 2011; FERREIRA, 2012). Em pesquisa em que se utilizaram também técnicas moleculares para a detecção de *Mycoplasma*, HURTADO et al (2011) não detectaram o agente em nenhuma amostra pesquisada, resultado diferente ao encontrado no presente estudo e denota a importância de maiores estudos acerca da importância epidemiológica destas aves para a manutenção da Micoplasmose no ambiente de produção.

A detecção de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* usando técnicas moleculares vem sendo relatado com sucesso (TAYFUN & AYIGOR, 2003; GARCIA et al, 2005; MEKKES & FEBERWEE, 2005; CALLISON et al, 2006; GRODIO et al, 2008 ; HURTADO et al, 2011). Características biológicas deste agente trazem muitas dificuldades no seu diagnóstico direto, principalmente relativas à fragilidade deste microrganismo fora do hospedeiro. Com o uso de métodos moleculares, não existe a necessidade de um microrganismo viável para que ocorra a detecção do mesmo, fato que possibilita um melhor uso destas técnicas em relação aos métodos de cultivo bacteriano. No presente estudo, apesar do método estatístico empregado indicar que não houve concordância entre as duas técnicas usadas, os resultados positivos detectados pela rPCR para a detecção de

M. gallisepticum foram, entre as cinco detectadas nas amostras obtidas dos pombos, quatro também foram positivas também no método de SAR, o que mostrou um bom uso na combinação das duas técnicas, devendo as mesmas serem usadas em conjunto, de forma a auxiliar ao diagnóstico desta enfermidade.

Estudos indicam que os pombos são suscetíveis a esse microrganismo, e podem manter o estado de portador, como ocorre com os frango. Assim, postulam-se que tenham importância na transmissão do agente mecânicamente, pois mesmo após serem infectados, eles só excretam o agente por um pequeno período (GHARAIBEH & HAILAT, 2011). Em experimento conduzido por FIORENTIN & JAENISH (1994), pombas-rola foram isoladas junto com frangos SPF que foram infectados com *M. synoviae*. Como resultado, os frangos apresentaram sorologia positiva pelos métodos de SAR e HI, e no método direto de isolamento, o patógeno só foi detectado das amostras obtidas dos frangos. Já em experimento usando cepa de *M. gallisepticum*, uma amostra desta foi inoculada em pombos, pardais e também em frangos livre do agente. As aves foram analisadas sobre o desenvolvimento de sintomatologia clínica. Sinais respiratórios brandos e soroconversão foram detectados em frangos de corte, e o isolamento do agente foi realizado de amostras da traqueia e de sacos aéreos. No entanto, os pombos e os pardais, não apresentaram sintomatologia clínica e nem sorologia positiva para detecção anticorpos contra este agente. O isolamento foi possível até o sétimo dia após a inoculação, nas duas espécies.

LORIA et al. (2005) descreveram caso clínico em que pombos (*Columba livia*) de uma criação que apresentavam sintomatologia respiratória com lesão ocular, e tiveram suspeita clínica de micoplasmose. No diagnóstico laboratorial, *M. columborale*, foi o agente encontrado. Além disso, foi confirmado a negatividade da ocorrência de *M. gallisepticum*. Estes resultados apontam para a importância do desenvolvimento de pesquisas com relação à patogenicidade de amostras comumente encontradas em pombos para aves de produção, pois cepas de *M. gallisepticum* foram documentadas como causadoras de doença clínica em várias espécies aviárias, inclusive com hipóteses de mutação genética

adaptativa (PILLAI et al., 2003; CHERRY et al., 2006). Contudo, não é improvável que cepas diferentes provenientes de aves de vida livre possam vir a causar doenças em aves comerciais.

Nas amostras obtidas dos urubus, os resultados, na SAR e no rPCR foram negativos para a detecção de anticorpos e dos agentes *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Entretanto, outras espécies de *Mycoplasma* já foram detectadas em urubus. Em trabalho conduzido por RUDER et al., (2009) foi identificada a espécie *M. corogypsi* como agente responsável por poliartrite em urubus (*Coragyps atratus*). Outros micoplasmas também foram isolados de rapinantes, como *M. glycyphilum*, *M. falconis*, *M. gateae*, *M. buteonis* e *M. vulturi* (BOLSKE & MORNER, 1982; POVEDA et al., 1990, 1994; ERDÉLYI, et al., 1999; LIERZ et al., 2000; OAKS et al., 2004). Mesmo assim, a importância da micoplasmose para a saúde de urubus não está bem documentada. Dada a ausência de sinais clínicos na maior parte dos casos, foi sugerido que micoplasmas em aves necrófagas ocorrem na maior parte das vezes como comensais e em pequena frequência de forma patogênica (LIERZ et al., 2008).

Deve-se ressaltar que não existem trabalhos suficientes sobre a importância de urubus na cadeia epidemiológica de micoplasmoses de importância para a produção aviária. Diante deste fato, mesmo a condição negativa observada neste estudo justifica a pesquisa realizada para estes agentes, cujos resultados obtidos reforçam a hipótese do urubu de cabeça preta não se constituir em um possível carreador destes agentes.

Além da importância econômica da micoplasmose em aves domésticas, a micoplasmose também vem mostrando grande importância ecológica na população de aves de vida livre. No ano de 1994 e 1995, nos Estados Unidos, foi descrita uma epizootia de conjuntivite em tentilhões que foi associada à infecção por *M. gallisepticum* que se disseminou no leste e oeste do País (DHONDT, et al, 1998; DUCKWORTH et al., 2003; LEY et al, 2006). Estima-se que no surto documentado, cerca de dez milhões de tentilhões tenham morrido (NOLAN et al, 1998). Existem evidências de que o *M. gallisepticum* se tornou endêmico na população de tentilhões da região leste, embora a prevalência da enfermidade tenha

diminuído, sugerindo que houve uma adaptação da bactéria em relação ao hospedeiro (LEY et al, 2006).

Após a detecção de *M. gallisepticum* nos tentilhões foi sugerido que as agregações de aves em comedouros coletivos seja uma causa importante da epidemia de conjuntivite por *Mycoplasmaspp*, pois as aves doentes podem depositar gotículas com patógenos nos comedouros e, então, promover a transmissão do agente de forma indireta (HARTUP et al., 2004). Pombos domésticos habitam ambientes abertos, juntamente com outras espécies aviárias de vida livre. O íntimo contato entre estes animais pode determinar em risco sanitário para as outras aves silvestres.

Portanto, a constante vigilância deste agente quanto à sua distribuição no meio ambiente é uma necessidade para que se evite a dispersão de micoplasmas entre os ecossistemas. Além disso, o estudo dos métodos de diagnóstico já usados em aves de produção para uso em aves silvestre viabiliza pesquisas da dispersão deste agente, podendo ser um importante instrumento no controle da micoplasmose.

CONCLUSÕES

Os pombos domésticos são portadores e possíveis disseminadores de *Mycoplasma gallisepticum* na região metropolitana de Goiânia.

Os urubus não representaram risco evidente para a veiculação de *Mycoplasma gallisepticum* ou *M. synoviae* na região metropolitana de Goiânia.

Referências

1. ADLER, H.E. Isolation of a pleuropneumonia like organism from the airsac of a parakeet. **Journal of American Veterinarians Association**, v.130, p.408-409, 1957.

2. BERCHIERI JUNIOR, A. Doenças de transmissão vertical. In: DI FABIO, J. ROSSINI, L.I. **Doença das Aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas, p.485-496, 2009.
3. BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria da Defesa Agropecuária, Departamento de Defesa Animal. Brasília, DF. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**, 1994.
4. BOLSKE, G.; T. MORNER. Isolation of a *Mycoplasma* sp. from three buzzards (*Buteo spp.*). **Avian Diseases** v.26, p. 406–411. 1982.
5. BUCHALA, F.G. *Levantamento sorológico de Salmonella e Mycoplasma em aves domésticas de criatórios de explorações não tecnificadas “fundo de quintal” no Estado de São Paulo*. 2003. 67f. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.
6. CALLISON, S.A.; RIBLET, S.M.; SUN, S.; IKUTA, N.; HILT, D.; LEITING, V.; KLEVEN, S.H. D. L. SUAREZ, and M. GARCÍA Development and Validation of a Real-Time Taqman® Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Naturally Infected Birds. **Avian Diseases**, v. 50, n. 4, p. 537-544, 2006.
7. CHERRY, J. J., LEY, D. H. & ALTIZER, S. Genotypic analyses of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from songbirds by random amplification of polymorphic DNA and amplified-fragment length polymorphism. **Journal of Wildlife Diseases** v.42, p.421–428, 2006.
8. DHONDT, A.A.; TESSAGLIA, D.L. ;SLOTHOWER, R.L. Epidemic *Mycoplasma conjunctivitis* in house finches from north america. **Journal of Wildlife Diseases**, v.34, n.2, p. 265-280, 1998.
9. DORRESTEIN, G.M. Passeriformes. In: **Clinica de aves**, TULLY JR, T.N. DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K.2ª Ed. Cap.8 p. 150-185. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
10. DUCKWORTH, R.A.; BADYAEV, A.V.; FARMER, K. L.; HILL, G.E.; ROBERTS, S.R. First case of *Mycoplasma gallisepticum* infection in the western range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). **The Auk**, v.120, n.2, p. 1–3, 2003.
11. ERDÈ LYI, K. TENK, M.; DÀN, A. Mycoplasmosis Associated Perosis Type Skeletal Deformity in a Saker Falcon Nestling in Hungary. **Journal of Wildlife Diseases**. v.35, n.3, p. 586–590, 1999.

12. FERREIRA, V.L. Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes do Estado de São Paulo. **Dissertação**. 79f, 2012.
13. FIORENTIN, L.; JAENISH, F. R. Tentativa de infecção experimental da pomba-rola (*Colimkina picui*) com *Mycoplasma synoviae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 573-575, 1994.
14. GARCIA, M., N. IKUTA, S. LEVISOHN and S.H. KLEVEN, Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. **Avian Diseases**, v.49, p.125-32, 2005.
15. GEORGIADES, G., IORDANIDIS, P. & KOUMBATI M. Cases of swollen head syndrome in broiler chickens in Greece. **Avian Diseases**, v.45, p.745- 750, 2001.
16. GHARAIBEH, S.; HAILAT, A. *Mycoplasma gallisepticum* experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows and pigeons. **Avian Pathology**, v. 40, n. 4, p. 349-354, 2011.
17. GRODIO, J.L.; DHONT, K.V.; O'CONNELL, P.H.; SCHAT, K.A. Detection and quantification of *Mycoplasma gallisepticum* genome load in conjunctival samples of experimentally infected house finches (*Carpodacus mexicanus*) using realtime polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v.37, n.4, p.385-391, 2008.
18. HARLIN, R.; WADE, L. Bacterial and parasitic diseases of Columbiformes. **The veterinary clinics of North America, Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 453-473, 2009.
19. HARTUP, B.K.; STOTT-MESSICK, G. M.; LEY, D.H. Health Survey of House Finches (*Carpodacus mexicanus*) from Wisconsin. **Avian Diseases**, v.48, p. 84–90, 2004.
20. HURTADO, R. F.; GUIMARÃES, M. B.; BELLO, C. P.; FERREIRA, A. J. P. Surveillance of Paramyxovirus type 1, Avian influenza virus and *Mycoplasma gallisepticum* in freeranging birds caught near commercial poultry farms in São Paulo State, Brazil. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WILDLIFE DISEASE ASSOCIATION, 60; 2011, Québec. **Anais...** Québec, Canada: Wildlife Disease Association, 2011. p. 113.
21. KEMPF, I., GESBERT, F. & GUITTET, M. Experimental infection of chickens with an atypical *Mycoplasma gallisepticum* strain: comparison of diagnostic methods. **Research in Veterinary Science**, 63, 211-213, 1997.

22. KLEVEN, S.H., JORDAN, F.T.W. & BRADBURY, J.M. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). In R. Reichard. **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**. Paris: Office International des Epizooties, p. 512-521, 1996.
23. KLEVEN, S.H. Other *Mycoplasmal* infections. In **Diseases of Poultry**, 11th Ed., Y.M. Saif (ed.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, IA, U.S.A., pp. 772–773, 2003.
24. LAUERMAN, L.H.; HOERR, F.J.; SHARPTON, S.; SHAH, M.; VANSANTEN, V.L. Development and application of a Polymerase Chain Reaction Assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, v.37, p.827–834. 1994.
25. LAUERMAN, L.H. **Nucleic acid Amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Washington: Library of congress cataloging in publication data. 152p.1998.
26. LEY, D.H.; SHAEFFER D.S.; DHONDT, AA. Further western spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection of house finches. **Journal of Wildlife Diseases**. v.42, p. 429-431, 2006.
27. LORIA, G. R.; TAMBURELLO, A.; LIGA, F.; LAWES, J.; NICHOLAS, R. A. J. Isolation of *Mycoplasmas* from pigeons suffering eye lesions and respiratory disease. **Veterinary Record**, v. 19, p. 664-665, 2005.
28. LIERZ, M., R. SCHMIDT, L. BRUNNBERG, AND M. RUNGE. Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from free-ranging birds of prey in Germany. **Journal of Veterinary Medicine** v.47, p. 63–67. 2000.
29. LIERZ, M.; OBON, E. ;SCHINK, .B.; CARBONELL, F. AND HAFEZ, H. M. The Role of *Mycoplasmas* in a Conservation Project of the Lesser Kestrel (*Falco naumanni*). **Avian Diseases**. v. 52, p.641–645, 2008.
30. LUTTRELL, P.; FISCHER, J.R. Mycoplasmosis In: THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B.; ATKINSON, C.T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. Iowa: Blackwell Publishing Professional p. 317-331, 2007.
31. MACWHIRTER, P. A evolução das espécies aviárias. In: TULLY JR, T.N. DORRESTEIN, G.M.; JONES **Clinica de Aves**, A.K.2^a Ed. Cap.1 p. 1-21. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
32. MEKKES, D.R.; FEBERWEE, A. Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Pathology**, v.34, n.4, p. 348-354, 2005.
33. MENDONÇA, G.A.; PÓLO, P.A.; NASCIMENTO, E.R.; LIGNON, G.B. A prova de SAR em galinhas poedeiras infectadas por

- micoplasmoses e salmoneloses. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, p.116, 2003. Suplemento 5. Trabalho apresentado na CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas. **Anais...** 2003.
34. NASCIMENTO, E.R., R. YAMAMOTO, K.R. HERRICK AND R.C.TAIT. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian. Diseases**, v.35, p. 62-69. 1991.
35. NASCIMENTO, E.R.; YAMAMOTO, R.; KHAN, M.I. *Mycoplasma gallisepticum* F–vaccine strain-specific Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v.37, p. 2023–211.1993.
36. NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: DI FABIO, J. ROSSINI, L.I. **Doença das Aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas, p.485-496, 2009.
37. NOLAN PM, HILL GE, STOEHR AM Sex, size, and plumage redness predict house finch survival in an epidemic. **Proceedings of the Royal Society**, London, Series B, v. 265, p.961–965, 1998.
38. OAKS, J., M. S. L. DONAHOE, F. R. RURANGIRWA, B. A. RIDEOUT, M. GILBERT, AND M. Z. VIRANI.. Identification of a novel *Mycoplasma* species from an Oriental white-backed vulture (*Gyp bengalensis*). **Journal of Clinical Microbiology**. V.42, p. 5909–5912, 2004.
39. PAKPINYO S., PITAYACHAMRAT P., SACCAVADIT S., SANTASWANG T., TAWATSIN T. & SASIPREEYAJAN J.– Laboratory diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection in experimental layer chicken receiving MG vaccines and MG organisms. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.36, p.29-37, 2006.
40. PEREIRA, M.S. & SILVA, P.L. Prevalência de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em galinhas “caipiras” no município de Uberlândia- MG. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas - São Paulo, n.7. Suplemento, p.204-204, 2005.
41. PILLAI, S. R. ; MAYS, A H. L. ; LEY, A D. H. ; LUTTRELL, B P. ; PANANGALA, C V. S.; FARMER, D. K. L. AND ROBERTS, S. R. A Molecular Variability of House Finch *Mycoplasma gallisepticum* Isolates as Revealed by Sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the pvpA Gene. **Avian Diseases**, v.47, p. 640–648, 2003.
42. POVEDA, J. B.; J. GIEBEL, J. FLOSSDORF, J. MEIER, AND H. KIRCHHOFF. *Mycoplasma buteonis* sp. nov., *Mycoplasma falconis* sp. nov., and *Mycoplasma magypis* sp. nov., three species from

- birds of prey. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p. 94–98, 1994.
43. RUDER, M.G.; SANFORD, H.; FELDMAN, A.U. ARNO, W. MCRUER, D. Association of *Mycoplasma* Coragypsi and polyarthritis in a Black vulture (*Coragyps atratus*) in Virginia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n.3, pp 808-816, 2009.
 44. SOUSA, E.; WERTHER, K.; BERQUIERI JUNIOR, A. Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens and *Salmonella* spp. In wild birds captured near poultry facilities. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n1, p. 219-223, 2010.
 45. SPRYGIN, A.V.; ANDREYCHUK, D.B.; KOLOTILOV, A.N.; VOLKOV, M.S.; RUNINA, I.A.; MUDRAK, N.S.; BORISOV, A.V.; IRZA, V.N.; DRYGIN, V.V.; PEREVOZCHICKOVA, N.A. Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. **Avian Pathology**, v. 39, n.2, p.99-109, 2010.
 46. TAYFUN; C; EYIGOR, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Trachea. **Avian Diseases**: v. 47, n. 3, p. 712-717, 2003.
 47. TSAI, H.J.; LEE, C.Y. Serological survey of Racing pigeons for selected pathogens in Taiwan. *Acta veterinaria Hungarica*, v.54, n.2, p. 179-189, 2006.
 48. WILLIAMS, E.S.; ARTOIS, M.; FISHER, J.; HAIGH, S.A. Emerging infectious in wildlife. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v.1, n.1, p.139-157, 2002.

CAPITULO 4 – DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* E PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS DE AVES SINANTRÓPICAS

RESUMO: O presente trabalho objetivou a detecção de *Escherichia coli* em fezes de aves sinantrópicas e determinar o estado de carreador de *E. coli* patogênica para aves (APEC) e fenótipos de resistência a antimicrobianos. Por isso, foi realizado estudo com 200 pombos (*Columba livia*) e 60 urubus (*Coragyps atratus*) em que foi isolado por bacteriologia convencional a *E. coli* das excretas e detectado pela PCR os genes de virulência *papC*, *tsh*, *iss* e *iuc*. Como resultado, para amostras de pombos se obteve 11,23% (20/178) para *iuc*, 2,24% (4/178) *papC*, 11,79% (21/179) *tsh* e 6, 17% (11/178) para *iss* . Para urubus 8,16% (4/49) *iuc* , 14,28% (7, 49) *tsh* , 6,12%(3/49) *iss*, e nenhuma positiva para *papC*. Além disso, os isolados de *E. coli* foram submetidos a teste de perfil de resistência à antibióticos em que se obteve: sulfametazina 68,53% (122/178), ampicilina 73,03% (130/178), ciprofloxacina 22,47% (40/178), apramicina 32,02% (57/178),

sulfametropin 61,79% (110/178), enrofloxacin 39,88% (71/178), tetraciclina 66,85% (119/178), sulfonamida 69,1% (123/172), neomicina 33,14% (59/178), doxaciiclina 37,64% (67/178), oxitetraiclina 28,65% (51/178), gentamicina 23,59% (42/178), ceftiofur 44,38% (79/178), amoxicilina + ácido clavulânico 51,68% (92/178) de resistência nas amostras isoladas de pombos, e em amostras isoladas de urubus: sulfametazina 73,46 (36/49), ampicilina 79,59% (39/49), ciprofloxacina 24,48% 12/49, apramicina 18,36% (9/49), Sulfametropin 61,22% (30/49), enrofloxacin 14,28% (7/49), tetraciclina 55,10% (27/49), sulfonamida 65,30% (32/49), neomicina 24,48% (12/49), doxaciiclina 22,44% (11/49), neomicina 18,36% (9/49), oxitetraiclina 22,44% (11/49), gentamicina 20,40% (10/49), ceftiofur 24,48% (12/49), amoxicilina + ácido clavulânico 63,26% (63,26%) de resistência. Os resultados sugerem que pombos e urubus são reservatórios de cepas patogênicas de *E. coli* e apontam ainda a possibilidade destas aves constituírem em suporte de transferência de fenótipos de *E.coli* resistentes aos antimicrobianos.

Palavras chave: APEC, antibióticos, colibacilose, pombos, urubus

CHAPTER 4 - DETECTION OF VIRULENCE GENES OF *Escherichia coli* AND RESISTENT PROFILE FROM SYNANTHROPIC BIRDS

SUMMARY: Due to the proximity of synanthropic birds to areas of animal production, we conducted a study with 200 pigeons (*Columba livia*) and 60 vultures (*Coragyps atratus*) which was isolated by conventional bacteriology *E. coli* from feces detected by PCR and virulence genes *papC*, *tsh*, *iss* and *iuc*. As a result, samples for pigeons was obtained 11.23% (20/178) for *iuc*, 2.24% (4/178) *papC*, 11.79% (21/179) *tsh* and 6, 17% (11 / 178) for *iss*. For vultures 8.16% (4/49) *iuc*, 14.28% (7, 49) *tsh*, 6.12% (3/49) *iss*, and no positive *papC*. Moreover, isolates of *E. coli* were tested for their resistance to antibiotics that are obtained: sulfamethazine 68.53% (122/178), ampicillin 73.03% (130/178), ciprofloxacin 22.47% (40/178), apramycin 32.02% (57/178), Sulfametropin 61.79% (110/178), enrofloxacin (mg) 39.88% (71/178), tetracycline 66.85% (119/178), sulfonamide 69.1 % (123/172), neomycin 33.14% (59/178), doxycycline 37.64% (67/178), oxytetracycline 28.65% (51/178), gentamicin 23.59% (42/178) , ceftiofur 44.38% (79/178), amoxicillin + ac. clavulanic 51.68% (92/178) of resistance in strains isolated

from pigeons, and in isolated samples of vultures: sulfamethazine 73.46 (36/49), ampicillin 79.59% (39/49), ciprofloxacin 24.48 % 12/49, apramycin 18.36% (9/49), Sulfametropin 61.22% (30/49), enrofloxacin 14.28% (7/49) 55.10% tetracycline (27/49), sulfonamide 65.30% (32/49), neomycin 24.48% (12/49), doxycycline 22.44% (11/49), neomycin 18.36% (9/49), oxytetracycline 22.44% (11 / 49), gentamicin 20, 40% (10/49), ceftiofur 24.48% (12/49), amoxicillin + ac. clavulanic 63.26% (63.26%) of resistance. The results suggest that pigeons and vultures are potential backers of pathogenic strains of *E. coli* for commercial production of animals and also indicate the possibility of these birds constitute support for transfer of resistant phenotypes of *E. coli* microbiota to other animals and to humans.

Keywords: APEC, antibiotics, pigeons, colibacillosis, vultures

INTRODUÇÃO

A produção avícola nacional vem sendo responsável por grande parte dos ganhos econômicos do Brasil. O País ocupa hoje a terceira posição como produtor de frangos de corte e é o maior exportador deste produto, fornecendo-o para 142 países (BRASIL, 2011). Os cuidados com a qualidade devem ser essenciais para a obtenção de um bom produto final. O controle sanitário na avicultura industrial é realizado através de rigorosas medidas de biossegurança (GONÇALVES, 2005).

A intensa multiplicação de animais sinantrópicos em áreas urbanizadas, assim também como em áreas de produção animal, vem trazendo grande preocupação sanitária (NUNES, 2003). Dentre as aves de

comportamento sinantrópico, as mais comumente encontradas são os pombos domésticos (*Columba livia*) e urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*). Estas aves são consideradas um grave problema ambiental de grande importância sanitária, por serem potenciais veiculadores de doenças para humanos e animais (SICK, 2001; YORIO & GIACCARDI, 2002; DEL HOYO et al., 2003; SANTIAGO, 2006).

Dentre os agentes possivelmente transmitidos por aves sinantrópicas de importância para avicultura está *Escherichia coli* patogênica para aves. *E. coli* é uma bactéria Gram negativa, encontrada na microbiota comensal do trato intestinal das aves e de outros animais, sendo amplamente distribuída na natureza (HOLT et al., 1994). Por muito tempo, não foi considerada importante na patogenia das infecções aviárias, no entanto, ao longo dos anos, este microrganismo se mostrou importante na sanidade desses animais, fazendo-se necessária a diferenciação entre as amostras patogênicas e não patogênicas (SCHREMMER et al., 1999; HIRSH, 2004).

Atualmente, *E. coli* é considerado o agente patogênico de maior importância para a produção comercial avícola em todo o mundo (GUASTALLI, 2010) sendo estabelecida como um grande problema da avicultura industrial moderna, devido aos prejuízos econômicos causados (FERREIRA & KNOBL, 2000).

As linhagens patogênicas de *E. coli* são divididas de acordo com o quadro clínico apresentado pelos indivíduos afetados e com os mecanismos de patogenicidade. Para estas aves, a linhagem de importância econômica é *E. coli* patogênica para aves (APEC) (BRITO, 2000). Apresentam mecanismos de virulência considerados multifatoriais. Os mais frequentemente relacionados são os mecanismos de resistência sérica (iss), de adesão (*pap* e *fela*), presença de aerobactina (*iuc*), produção de colicina (*cva*), flagelos antígenos capsulares (*kps*) e hemaglutinina temperatura-sensível (*tsh*) (LA RAGIONE & WOODWARD, 2002; ROCHA et al., 2002; EWERS et al., 2004).

A microbiota de aves de vida livre não é bem documentada, no entanto a descrição dos genes de virulência em *E. coli* não patogênica, assim como do meio ambiente pode ser usada para indicar o potencial

risco que linhagens patogênicas sejam carregadas por essas aves (IKUNO et al, 2008).

Além da problemática descrita, cepas de *E. coli* podem apresentar resistência bacteriana e serem introduzidos na cadeia produtiva. Tal condição constitui em um grave problema do mundo moderno, já que limita a utilização de drogas antimicrobianas em casos de surtos (GUASTALLI, 2010). Plasmídeos de resistência podem ser transmitidos de cepas de diferentes espécies animais, o que pode agravar ainda mais esse problema ambiental (IKUNO et al., 2008). No entanto, são escassas as informações sobre resistência bacteriana em isolados de animais de vida livre (GILLIVER et al., 1999).

Com a proximidade das aves de vida livre que possuem hábitos sinantrópicos com as áreas de produção animal, além da grande mobilidade destes animais, é importante buscar informações sanitárias, assim como seu possível papel na epidemiologia das enfermidades. Também, o uso indiscriminado de antimicrobianos na avicultura comercial tem levado ao desenvolvimento de resistência nesse ramo. O reconhecimento da patogenicidade de isolados, bem como o perfil de sensibilidade às drogas antimicrobianas pode diminuir o uso de drogas de largo espectro para o tratamento dos animais, o que auxilia na diminuição de *E. coli* resistentes nas aves e no seu ambiente.

Portanto, objetivou-se com o presente trabalho averiguar a presença de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* de importância para a produção aviária (APEC) em pombos e urubus, bem como determinar o perfil de resistência dos isolados encontrados nestes animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi desenvolvido no Núcleo Experimental de Doenças de Aves e nos Laboratórios de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e no Centro de Triagem de Animais Silvestres de Goiás (CETAS/GO).

Animais e coleta das amostras

Foram utilizados 200 pombos (*Columbia livia*) e 60 urubus de cabeça preta (*Coragyps atratus*).

Os pombos foram capturados, de forma aleatória, com o apoio da equipe do centro de zoonoses da cidade de Aparecida de Goiânia, na região metropolitana de Goiânia, em um raio de até 50 km de empresas avícolas.

Na captura foram utilizadas cinco armadilhas de aço galvanizado modelo argentina, de 1,00 m³. Estas armadilhas foram instaladas pela manhã permanecendo abertas durante todo o dia, sendo vistoriadas várias vezes ao dia para retirada das aves capturadas e reabastecimento dos comedouros e bebedouros.

Os pombos foram retirados manualmente das armadilhas, com a utilização de equipamento de proteção individual adequados: luvas, óculos de acrílico com proteção lateral, máscaras semi-faciais com filtro de proteção P3, e acondicionados em gaiolas de transporte.

Após a captura, as aves eram levadas ao Núcleo Experimental de doenças de aves, onde eram eutanasiadas e colhidas amostras de conteúdo intestinal.

Os urubus usados no experimento eram provenientes do Centro de Triagem de Animais Selvagens (CETAS-GO). As aves eram levadas por autoridades ambientais, que realizavam captura destes quando necessária. Para a coleta das excretas, as aves eram transferidas para uma gaiola forrada, com papel alumínio, onde permaneceram por aproximadamente uma hora. Após esse tempo, cerca de um grama de excretas era colhido e imediatamente acondicionadas em recipiente esterilizado contendo 2 mL de água peptonada a 0,1% e imediatamente transportadas ao laboratório em embalagem isotérmica, tipo isopor com gelo reciclável, onde foram processadas.

Esse estudo foi realizado com uma licença obtida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO), protocolo N^o.25795-1 e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Goiás, protocolo 080/11.

Pesquisa de *Escherichia coli*

No laboratório, o conteúdo dos recipientes foi fracionado em duas alíquotas aproximadamente iguais. Uma das frações foi inoculada em caldo selenito cistina e outra caldo cérebro coração (BHI) os quais foram incubados a 37 °C por 18 - 24h.

Em sequência, alíquotas dos caldos foram estriadas para os ágar MacConkey e verde brilhante de acordo com o proposto por KONEMAN et al. (2001) e incubados a 37°C por 18h. De cada meio seletivo foram transferidas três unidades formadoras de colônias com características morfológicas similares para tubos contendo o ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37 °C por 24h.

Após esse período, de acordo com as características de crescimento bacteriano no TSI, procedeu-se a seleção de três tubos com características similares e determinou-se o perfil fenotípico por meio dos seguintes testes: produção de urease, de indol, de H₂S, prova do vermelho de metila, prova de motilidade, utilização de glicose, lactose, citrato de Simmons, do malonato. As amostras positivas foram submetidas a teste de sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCL, 2002).

Os isolados foram estocados em caldo BHI com glicerol a 15% e mantidos a -20°C para posterior extração do DNA bacteriano e realização da PCR para detectar os genes de virulência *iss, iuc, tsh* e *papC*.

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Após o isolamento das *E. coli*, as amostras foram submetidas ao teste de sensibilidade frente aos seguintes antibióticos: sulfametazina, enrofloxacina (5µg), tetraciclina (30µg), sulfonamida (300µg), ciprofloxacino (10mcg), amoxicilina + ácido clavulânico (3mcg), ampicilina (10µg), ceftiofur (30µg), gentamicina(10µg), oxitetraciclina(30µg), neomicina (30µg), doxaciclina(30mcg), apramicina (15µg).

Com uma agulha de níquel-cromo, transferiram-se cinco unidades formadoras de colônia com características morfológicas semelhantes para 5

mL de caldo Casoy. Incubou-se o caldo inoculado até atingir a turvação de 0,5 na escala MacFarland. Então um suabe foi umedecido no caldo, pressionando contra as paredes do tubo para remover o excesso e esfregado em várias direções sobre a superfície da placa de petri contendo o ágar Mueller-Hinton, até obter uma camada uniforme e homogênea do inóculo. Aguardava-se em torno de 15 minutos para ocorrer a difusão do caldo com o inóculo no ágar e então depositavam-se os discos de antimicrobianos sobre a superfície inoculada com o auxílio de uma pinça. Os discos eram pressionados para uma melhor aderência ao meio e mantidos a uma distância de aproximadamente 3 cm um do outro. Depois de serem colocados os discos, as placas eram incubadas na posição invertida por 18 horas a temperatura de 35-37°C. Após esse período, procedia-se a leitura dos halos de inibição com o auxílio de uma régua e os resultados eram interpretados de acordo com uma tabela (tabela padrão interpretativo zonahalos de inibição recomendados pelo Cefar-diagnósticos) considerando a concentração do disco.

Extração do DNA para PCR

Para extração do DNA, 1mL da suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI por 24h a 37°C foi coletado e centrifugado por cinco minutos a 13634,4g. O sobrenadante foi descartado, e 800µL de água miliQ foram adicionados. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado, e 80µL de água miliQ foi adicionada. Após essa etapa, as amostras foram submetidas à temperatura de 96°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e mantido congelado em tubos de polipropileno a -20°C até o momento da análise (SILVA et al., 2011).

Para realização da PCR foi estabelecido o volume de 50µL para o *mix* de reação, composto por 35,75 µL de água milli-Q (*DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen*), 5 µL de Tampão para PCR 10X (*PCR buffer*

10x *Invitrogen*), 2,0 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50 mM (*Invitrogen*); 1µL de dNTP 10 mM (*Amersham Biosciences*); 0,5 µl (10 pM) do iniciador sense, 0, 5 µL (10 pM) do iniciador anti-sense, 0,25 µl de Taq 5 U/µL (*Invitrogen*) e 5 µL do eluato de DNA genômico da amostra em todas as reações realizadas(SILVA et al., 2011).

Para as reações dos diferentes genes de virulência foram empregados pares de oligonucleotídeos para “*iuc*” segundo YAMAMOTO et al., (1995), “*iss*” segundo HORNE et al., (2000), “*pap C*” segundo JANSEN et al. (2001) e “*tsh*” segundo MAURER et al. (1998). As sequências estão disponibilizadas no Quadro 1.

Quadro1. Iniciadores selecionados para a amplificação de genes de virulência de *E. coli*

Gene alvo	Sequências	Autor	Tamanho do amplicon
<i>luc</i>	5´-TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T-3´ 5´-AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G-3´	YAMAMOTO et al., 1995	602pb
<i>iss</i>	5´-GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC-3´ 5´-CGC CTC GGG GTG GAT AA-3´	HORNE et al., 2000	750pb
<i>papC</i>	5´-TGA TAT CAC GCA GTC AGT AGC-3´ 5´-CCG GCC ATA TTC ACA TAA C-3´	JANSEN et al., 2001	501pb
<i>Tsh</i>	5´-GGG AAA TGA CCT GAA TGC TGG-3´ 5´-CCG CTC ATC AGT CAG TAC CAC-3´	MAURER et al., 1998	400pb

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (*Mastercycler Personal, Eppendorf*) programado para um ciclo inicial (*hot sart*) de 94 °C por dois min., seguido de 35 ciclos repetidos de 94 °C por 30 seg., temperatura de anelamento (Ta) por 30 seg. e 72 °C por 1 min. A programação era finalizada com 2 min. a 72 °C para maximizar o processo de extensão.

Como controles positivos para as reações da PCR, foram utilizadas amostras de DNA genômico de referência para *E. coli* cedida pela professora Dr^a Terezinha Knöbl do Laboratório de Ornitopatologia da Universidade de São Paulo.

As amostras foram:

- EC T27 - Sorogrupo O78, positiva para os genes papEF, crl,tsh, neuS, iss e iucD
- EC T33 - Sorogrupo O8, positiva para os genes fim BH, papEF, crl, neuS, iss e iucD
- EC T14 - Sorogrupo O2, positiva para os genes crl, csgA, tsh, neuS, iss e iucD
- EC T36 - Sorogrupo O143, positiva para os genes fimBH, crl, csgA, tsh, iss e iucD
- EC.T48 - Sorogrupo O78, positiva para os genes fim BH,crl,tsh, neuS, iss e iucD

Análise estatística

Para interpretação dos resultados obtidos, foi feita análise da frequência dos dados.

RESULTADOS

Detectou-se *E. coli* em 89% (178/200) das 200 amostras de conteúdo intestinal de pombos e em 81,6% (49/60) detectadas das 60 amostras de excretas colhidas de urubus.

Na PCR para a detecção dos genes de virulência *papC*, *tsh*, *iss* e *iuc* foram obtidos como resultados para amostras de pombos: 11,23% (20/178) para *iuc*, 2,24% (4/178) *papC*, 11,79% (21/178) *tsh*(Figura 1) e 6,17% (11/178) para *iss*(Figura 2). Para urubus: 8,16% (4/49) *iuc*, 14,28% (7/49) *tsh*, 6,12% (3/49) *iss*, e nenhuma positiva para *papC*. A distribuição dos resultados estão dispostos no Quadro 2.

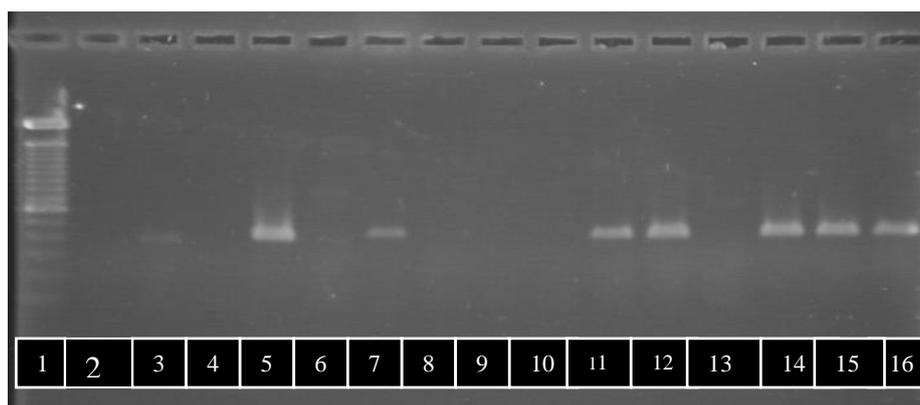


Figura 1: Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de primers: CPF/CPR. Para detecção do gene *tsh.1* - marcador de 100 pb; 2 – Controle negativo; 3-Produto de PCR com 400 pb, 4-Amostra Negativa; 5-Produto de PCR com 400 pb, 6- Amostra negativa; 7- Produto de PCR com 400 pb; 8- amostra negativa; 9 - Amostra negativa; 10-Amostra negativa; 11- Produto de PCR com 400 pb; 12-Produto de PCR com 400 pb, 13-Amostra negativa; 14- Produto de PCR com 400 pb; 15-Produto de PCR com 400 pb; 16 – Controle positivo.

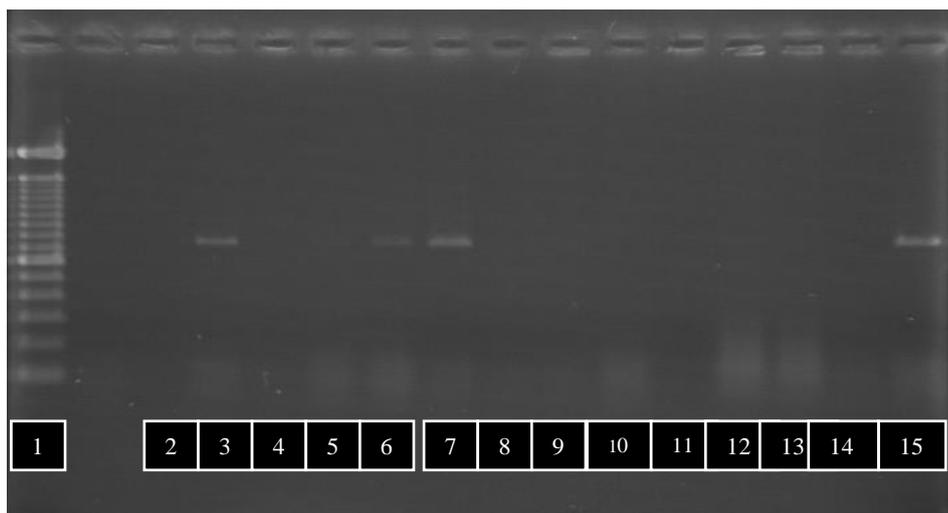


Figura 2: Eletroforese referente ao ensaio de PCR com o par de primers: CPF/CPR. Para detecção do gene *iss*. 1 - marcador de 100 pb; 2 – Controle negativo; 3- Amostra negativa, 4- Produto de PCR com 750 pb; 5- Amostra Negativa, 6- Amostra negativa; 7- Produto de PCR com 750 pb; 8- Produto de PCR com 750 pb; 9 - Amostra negativa; 10- Amostra negativa, 11- Amostra negativa; 12- Amostra negativa; 13- Amostra negativa; 14- Amostra negativa; 15 – Controle positivo.

Quadro 2. Iniciadores selecionados para a amplificação de genes de virulência de *E. coli*

	luc, tsh, iss, PapC	iss e iuc	tsh e iss	Negativos
Pombos	1	5	7	21 (11,79%)
Urubus	0	1	0	4(8,16%)

Um dos isolados dos pombos foi positivo para os quatro genes de virulência pesquisados. Cinco amostras de pombos e uma de urubu foram positivas tanto para os genes *iss* como *iuc*. Duas amostras dos isolados de pombos foram positivas para *tsh* e *iss*. Sete amostras de isolados dos pombos foram positivas para associação de genes *tsh* e *iuc*. Em uma das amostras isoladas dos pombos e em uma das amostras isoladas dos urubus foi detectada a associação dos genes *tsh*, *iuc* e *iss*. Ainda, 11,79% (21/178) amostras de pombos e 8,16% (4/49) de urubus foram negativas para todos os genes pesquisados.

Na determinação do perfil de sensibilidade (Figura 2) das 178 amostras isoladas de fezes de pombos, se obteve: sulfametazina 68,53%

(122/178), ampicilina 73,03% (130/178), ciprofloxacina 22,47% (40/178), apramicina 32,02% (57/178), sulfametropin 61,79% (110/178), enrofloxacina (µg) 39,88% (71/178), tetraciclina 66,85% (119/178), sulfonamida 69,1% (123/172), neomicina 33,14% (59/178), doxaciclina 37,64% (67/178), oxitetraciclina 28,65% (51/178), gentamicina 23,59% (42/178), ceftiofur 44,38% (79/178), amoxicilina + ácido clavulânico 51,68% (92/178) de resistência.

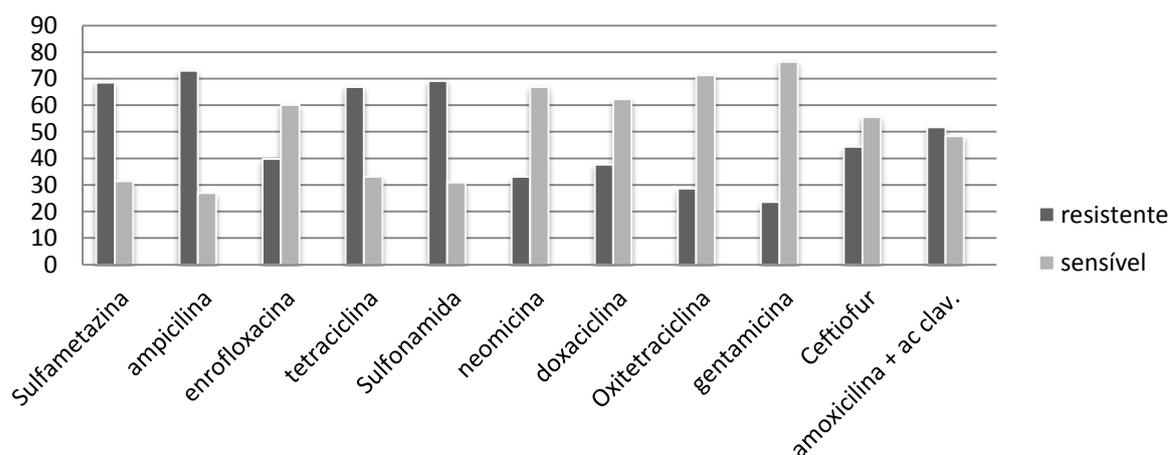


Figura 2. Percentual de sensibilidade e resistência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de pombos frente aos diversos antimicrobianos

Nos isolados das excretas dos urubus, na determinação do perfil de sensibilidade (Figura 3), se obteve: sulfametazina 73,46 (36/49), ampicilina 79,59% (39/49), ciprofloxacina 24,48% 12/49, apramicina 18,36% (9/49), sulfametropin 61,22% (30/49), enrofloxacina 14,28% (7/49), tetraciclina 55,10% (27/49), sulfonamida 65,30% (32/49), neomicina 24,48% (12/49), doxaciclina 22,44% (11/49), neomicina 18,36% (9/49), oxitetraciclina 22,44% (11/49), gentamicina 20, 40% (10/49), ceftiofur 24,48% (12/49), amoxicilina + ácido clavulânico 63,26% (63,26%) de resistência.

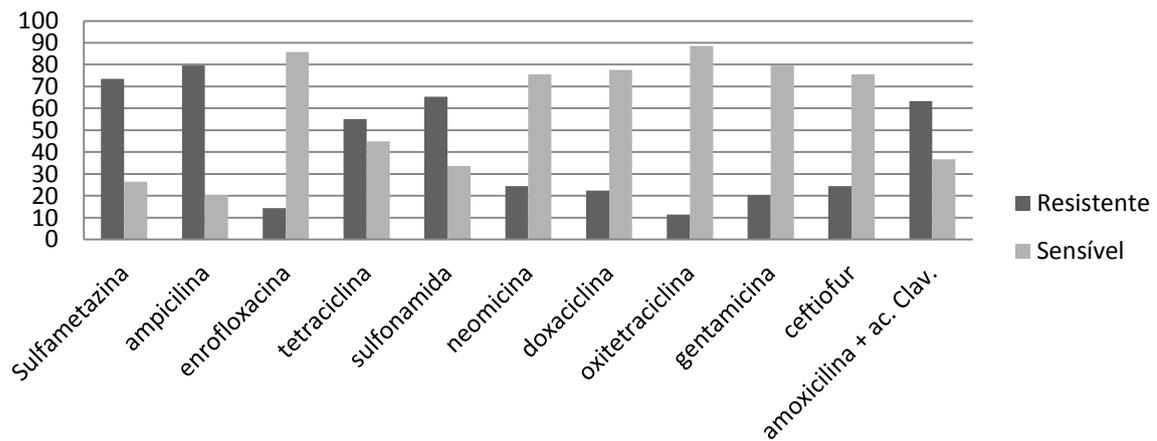


Figura 3. Percentual de sensibilidade e resistência de amostras de *Escherichia. coli* isoladas de urubus frente aos diversos antimicrobianos

DISCUSSÃO

A identificação de genes de virulência de *E. coli* em animais próximos à produção animal é de grande importância para se verificar o risco que este contato representa para os animais de produção.

Deve se considerar que novas combinações emergentes são possíveis e a identificação de genes de virulência de *E. coli* não patogênica pode ser usada como indicador do risco potencial que tais reservatórios de linhagens patogênicas representam e para identificar surtos de *E. coli* patogênicas em aves de interesse comercial (IKUNO et al., 2006).

Os genes de virulência pesquisados no presente estudo foram encontrados nos isolados de *E. coli* de pombos, e de urubus, sendo que nos isolados provenientes dos urubus, apenas o gene *papC* não foi detectado. Além disso, cinco tipos de associações entre estes genes foram detectadas. Mesmo com esse resultado, a detecção dos genes de virulência não necessariamente determinam que essas amostras são patogênicas. Muitas vezes, a associação destes genes é o que determina a maior ou menor patogenicidade das amostras. Por outro lado, alguns genes de virulência parecem ser detectados apenas em animais clinicamente acometidos, o que sugere que estão relacionados com a maior patogenicidade da cepa. Exemplo disso foi relatado por SKYBERG et al. (2003) em que pesquisaram a letalidade de cepas de *E. coli* para embriões. No estudo os autores relataram que as cepas que apresentavam mais de dois fatores de virulência causavam maiores danos ao embrião, até mesmo quando eram isoladas de aves saudáveis.

A maioria das cepas de APEC é responsável por doenças extraintestinais, muitas vezes acometendo o sistema respiratório, com o foco inicial da infecção no epitélio traqueal (VIDOTTO et al. 1997). No entanto, as amostras de *E. coli* no presente estudo foram isoladas do conteúdo intestinal dos pombos e excretas de urubus, o que pode ter diminuído a frequência de amostras patogênicas entre os isolados.

Na detecção do gene *iuc*, 11,23% (20/178) das amostras provenientes de pombos foram positivas e 8,16% (4/49) de urubus. Este gene codifica a aerobactina, um sideróforo de origem bacteriana que é

encontrada em grande parte das cepas de *E. coli* mais virulentas e juntamente com a alfa-hemolisina (gene *hlyA* causando lise das hemáceas) agem como um mecanismo para a aquisição de ferro em meios com baixa concentração deste íon (SUSSMAN, 1997). A capacidade do patógeno invadir e se multiplicar é influenciada pela disponibilidade de ferro, elemento essencial para o seu crescimento. Apesar de o ferro ser encontrado em grande quantidade nos tecidos e fluidos corporais, esse elemento permanece ligado a glicoproteínas. A bactéria, por suavez, possui sistemas especiais que capta o ferro via sideróforos. Genes que codificam proteínas envolvidas na aquisição de ferro foram encontrados com alta frequência em linhagens de APEC (GOPHNA et al., 2001; JANBEN et al., 2001), e em plasmídeos que também codificam a resistência a certos antimicrobianos (VIDOTTO et al., 1991; GOES et al., 1993).

DHO-MOULIM & FAIRBROTHER (1999) relataram uma maior possibilidade de cepas patogênicas possuírem e expressarem o sistema aerobactina-aquisição de ferro, apesar de cepas não patogênicas também poderem ter esse gene codificador de aerobactina, porém com menor frequência. Em psitacídeos clinicamente acometidos, SAIDENBERG (2008) observou uma ocorrência de 12% do gene nos isolados de aves clinicamente acometidas, embora se tratarem de espécies aviárias diferentes, a frequência foi semelhante ao encontrado nos pombos aparentemente saudáveis.

Para a detecção do gene de virulência *tsh*, 11,79%(21/178) amostras de pombos foram positivas e 14,28% (7/49) foram positivas em amostras de urubus. O gene *tsh* codifica a produção de uma proteína auto-transportadora que parece ter similaridade a uma subclasse da família de proteases do tipo IgA, estando envolvida em mecanismos de aderência ao trato respiratório de aves de produção (DOZOIST et al., 2000). Estudos mostraram que o gene *tsh* se encontra com maior frequência em casos de maior letalidade (DOZOIST et al., 2000; JANSSEN et al., 2001). Estudo em aves de produção com sintomatologia respiratória detectou um percentual de 55,7% do gene *tsh* nas amostras isoladas, o que denota a importância deste gene para a patogenicidade das amostras. Em pesquisa em psitacídeos, SAIDENBERG (2008) relatou a presença do gene em 8,6%

em aves clinicamente acometidas, no entanto em aves assintomáticas o gene foi detectado em apenas 1% das amostras, o que denota sua importância na patogenicidade da amostra.

O gene *iss*, foi detectado em 6,17% (11/178) amostras de pombos e 6,12% (3/49) amostras de urubus. A função do gene *iss* está relacionada à resistência sérica em casos de APEC (MELLATA et al., 2003). A presença do gene *iss* por si não é o suficiente para se identificar o patotipo APEC, já que esses genes podem ser encontrados em aves assintomáticas (SILVEIRA et al. 1994; FANTINATTI et al. 1994), no entanto, este gene pode ser considerado um marcador de virulência, já que comparado a outros fatores, o gene *iss* é citado como o mais frequente em cepas de aves clinicamente acometidas (GIBBS et al. 2003, SAIDENBERG, 2008; ROCHA et al. 2008). Em trabalhos comparativos entre aves sintomáticas e assintomáticas, a presença do gene *iss* nas aves com manifestações relacionadas à colibacilose o gene *iss* é mais prevalente (NOLAN et al. 2002; MCPEAKE et al. 2005). Esse gene aumenta a resistência das cepas aos efeitos líticos do soro, e além disso, pode aumentar a resistência destas cepas à diversos antibióticos (JOHNSON et al., 2002; YANG et al., 2004). Em frangos de corte clinicamente acometidos, DELICATO et al. (2003) detectaram 38,5% de positivos para gene *iss* em isolados traqueais e de fígado.

Em trabalho conduzido por ROCHA et al (2008) também em aves de produção com acometimento respiratório, o gene *iss* foi detectado em 73,8% das amostras, o que mostra a importância deste gene para a patogenicidade da cepa. Em psitacídeos clinicamente acometidos, SAIDENBERG (2008) relatou o gene *iss* como o mais detectado entre os genes de APEC pesquisados em aves clinicamente acometidas, cerca de 51,7% em aves sintomáticas e 23,2% foi detectado em aves assintomáticas. Em trabalhos com aves assintomáticas, ABREU et al. (2010) relataram a presença do gene isoladas de traqueia de codornas em 55% das amostras estudadas. CORREA (2012) encontrou 93,3% de amostras positivas para esse gene de isolados de órgãos e 92,3% de positividade em amostras de suabes de traqueia de frangos. IKUNO et al.

(2008) avaliaram 57 isolados de *E. coli* provenientes de aves silvestres submetidas à quarentena e encontraram 26,6% de positivos para gene *iss*.

Para o gene *iss*, foi detectado 6,17% (11/178) amostras positivas em pombos e 6,12% (3/49) amostras positivas em urubus. As aves pesquisadas estavam aparentemente saudáveis no momento da captura, o que pode justificar a baixa porcentagem relativa com os resultados dos outros autores.

Uma menor frequência entre os genes de virulência pesquisados foi percebido na detecção para *papC*, em que foi encontrado 2,24% (4/178) em pombos e nenhuma amostra foi positiva para esse gene nas amostras de urubus. Esse gene de virulência se relaciona com a fímbria P, que proporciona a capacidade de aderir a órgãos internos (JANSSEN et al., 2001). Alguns trabalhos correlacionam a presença do gene *papC* e doença clínica nas aves (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005, SAIDENBERG, 2008). KNOBL et al. (2004) observaram em amostras isoladas de frangos com sintomatologia positiva para colibacilose um percentual de 16% para a detecção de *papC*. Em trabalho com psitacídeos com colibacilose, este gene estava em 30% das amostras isoladas (KNOBL et al., 2008). Ainda em psitacídeos, SAIDENBERG (2008) identificou o gene *papC* em 3,4%, sendo detectada apenas em aves sintomáticas. Em aves de produção foram detectados por ROCHA et al. (2008) 24,3% deste gene em aves com sintomatologia clínica respiratória. Os estudos citados sugerem que o gene *papC* é um importante marcador da patogenicidade da amostras, as amostras do presente estudo foram isoladas de conteúdo intestinal e as amostras de APEC acometem na maioria dos casos de forma extraintestinal, o que pode justificar a baixa detecção desse gene.

Poucos são os estudos que relacionam os genes de virulência expressos na APEC em pombos domésticos, no entanto, estudos destas aves para a detecção dos genes de virulência de *E. coli* de interesse zoonóticos são mais frequentemente encontrados. Pesquisas apontaram que pombos são importantes para a veiculação de genes de virulência dos patótipos *E. coli* produtora de Shiga (STEC) (SCHMIDT et al., 2000; CIZEK et al., 2000; MORABITO et al., 2001; PEDERSEN et al., 2006; SILVA et al.,

2009) e *E. Coli* enteropatogenica (EPEC) (KOBAYASHI et al., 2002; SILVA et al.,2009; SANCHES & KNOBL, 2012).

Além da determinação dos genes de virulência citados, foi realizada a determinação do perfil de resistência dos isolados. Estudos recentes mostraram que a resistência bacteriana pode acontecer também em *E. coli* comensal de animais de vida livre que não foram submetidos a antibioticoterapia (CIZEK et al. 2007; DOLEJSKA et al. 2007, 2008, 2009; LITERAK et al. 2007). Muitas vezes a resistência de capas bacterianas contra antimicrobianos podem estar associadas a alguns genes de virulência (JOHNSON et al.,2002; YANG et al., 2004).

Foi observado elevada frequência de resistência aos antimicrobianos nas duas espécies estudadas. Todas as amostras isoladas de pombos e urubus apresentaram resistência a ao menos um dos antibióticos testados, com resistência múltipla aos antibióticos na maioria dos isolados. De acordo com GILLIVER et al. (1999), a determinação do perfil de resistência a antimicrobianos é de interesse tanto para a espécie em estudo, como para a saúde pública. Estudos recentes apontam um aumento exponencial na proporção de microrganismos resistentes, mostrando que nos últimos anos o problema se agrava com maior velocidade, seja devido à prescrição excessiva de antibióticos por parte de médicos, o uso indiscriminado pelo público e o emprego dessas drogas para uso veterinário (HARAKEH et al., 2006). O assunto tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto com cepas humanas quanto para as isoladas de animais (LEVY, 2002).

DE HERDT et al (1993) observaram em isolados de pombos um total de 60% das amostras testadas resistentes à tetraciclina, resultado que se assemelha ao encontrado no presente estudo. KIMPE et al. (2002) observaram 42% das amostras resistentes à ampicilina. No presente estudo, a resistência à ampicilina foi um pouco mais alta, mas também marcante como no estudo anterior. Ainda, os mesmos autores observaram resistência de 65% à oxitetraciclina, 33% trimetropim e 13% à enrofloxacina, resultados com algumas diferenças do presente estudo, no entanto, foi constatado pelos mesmos autores, altos níveis de resistência bacteriana nas amostras dos animais.

SILVA et al. (2009) realizaram estudo com 100 amostras de fezes de pombos domésticos e testaram quanto à sensibilidade à antimicrobianos. Das amostras testadas 62,1% foram sensíveis a todos os antimicrobianos, resultado que diverge com Os resultados aqui obtidos, no qual se obteve resistência à pelo menos dois antimicrobianos.

RADIMERSKY et al. (2010) detectaram em pombos plasmídeos de resistência para estreptomicina, tetraciclina, sulfonamidas e ciprofloxacina.e concluíram que o pombo pode ser considerado uma espécie de risco quanto a dispersão do desenvolvimento de resistência bacteriana.

Na Espanha, foi realizado estudo com urubus do Velho Mundo das espécies *Gyps fulvus*, *Aegypius monachus* e *Neophron percnopterus*. Foi encontrada uma alta concentração de resíduos antibióticos no plasma destes animais, notadamente nos ninhegos. Enrofloxacin e ciprofloxacina foram encontrados em amostras de fígado nos animais que estavam mortos. O estudo evidenciou uma associação direta resíduos de antibióticos e doença severa nessas espécies (LEMUS et al., 2008). A ingestão de antibióticos junto à carne de animais de produção então consumida por esses predadores pode levar a uma falência renal e hepática e, além disso, promover um grande aumento da resistência bacteriana nessas espécies.

Isolados de *E. coli* de animais e humanos possuem muitos genes em comum. Visto isso, autores sugerem que quando cepas diferentes entram em contato, existe a possibilidade de trocas genéticas entre as mesmas, e conseqüentemente, a probabilidade de surgimento de um patógeno emergente (KUHNER et al., 2000). Alterações na resistência ou a aquisição de fatores de virulência associados na *E. coli* comensal podem servir como um alerta para aparecimento de resistência em bactérias com potencial patogênico.

CONCLUSÕES

Pombos domésticos e urubus de cabeça preta são reservatórios de genes de virulência característicos de *Escherichia coli* patogênicas para aves (APEC).

As cepas de *E. coli* isoladas de pombos e urubus mostraram alto perfil de resistência aos antimicrobianos, podendo constituir em suporte de transferência de fenótipos de *E.coli* resistentes.

REFERÊNCIAS

1. ABREU, D. L. DA C.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. LÉO DE A.; ALVES, F. M. X.; ALMEIDA, J. F. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *ISS* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n.5, p.406-410, 2010.
2. BRASIL. Ministério Público Federal. **Ação civil pública** 5000412-67.2010.404.7008/PR.2011. Disponível em <<http://s.conjur.com.br/dl/sentencajusticafederalparanamulta.pdf>>. Acesso em: 02 Dezembro 2012.
3. BRITO, B.G. Fatores de virulencia de *Escherichia coli* de origem aviária. **Anais II simpósio de sanidade avícola**, Santa Maria, 2000.
4. CIZEK, A., DOLEJSKA, M., NOVOTNA, R., HAAS, D. AND VYSKOCIL, M. Survey of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and drug resistant coliform bacteria from in-line milk filters on dairy farms in the Czech Republic. **Journal Applied Microbiology** 104, 852–860, 2007.
5. CORREA, I.M.O. Enterobacterias e fatores de virulencia em cepas de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria. 55f. 2012.
6. DEL HOYO, J., ELLIOTT, A.; CHRISTIE D.A. **Handbook of the Birds of the World**. Vol. 8. Broadbills to Tapaculos. Lynx Edicions, Barcelona. 845p. 2003.
7. DE HERDT, P.; VAN GINNEKEN, C.; HAESEBROUK, F.; DEVRIESE, L.A. DUCATELLE, R. *Escherichia coli* infections in pigeons: Characteristics of the disease and its etiological agent. In: **Proceedings of the Tagungen Vogelkrankheiten**, p. 211-214, 1993.
8. DELICATO, E.R.; BRITO, B.G.; GAZIRI, L.C.J.; VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 97-103, 2003.
9. DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary research**, v.30, p. 299-316, 1999.
10. DOZOIST, C. M.; DHO-MOULIN, M.; BREE, A.; FAIRBROTHER, J. M.; DESAUTELS, C.; CURTISS, R. Relationship between the autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the genetic region. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4145-4154, 2000.

11. EWERS C., JANSSEN T., KIESSLING S., PHILIPP H.C., WIELER L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.91-101, 2004.
12. FANTINATTI F., SILVEIRA W.D. & DE CASTRO A.F.P. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v.41, n.1, pp.75-86.1994.
13. FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JR., A.; MACARI, M. **Doença das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 30-41.
14. GIBBS P.S., MAURER J.J., NOLAN L.K. & WOOLEY E. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* traits complement resistance, colicin V production, and presence of increased serum survival gene cluster (iss). **Avian Diseases**, v.47, n.2, pp. 370-379, 2003.
15. GILLIVER, M. A.; BENNETT, M.; BEGON, M.; HAZEL, S. M. Y.; HART, C. A. Antibiotic resistance found in wild rodents. **Nature**, p.401-233, 1999.
16. GOES, C. R.; GAZIRI, L. C.; VIDOTTO, M. C. Cloned genes of the aerobactin system of virulent avian *Escherichia coli* do not confer virulence to recombinant strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.26, n.3, p.261-275, 1993.
17. GONÇALVES, P. M. R. *Escherichia coli* com detecção do gene iss por PCR, micoplasmas e Salmonelas na qualidade sanitária de frangos de corte ao abate. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal Fluminense. 84p. 2005.
18. GOPHNA, U.; OELSCHLAEGER, T.A.; HACKER, J. & RON, E.Z. Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. **FEMS Microbiology Letter**, v.196, p.57-60; 2001.
19. GUASTALLI, E.A.L. Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 84f., 2010.
20. HARAKEH, S.; YASSINE, H.; EL-FADEL, M. Antimicrobial resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. **Environmental Pollution**, v. 143, n. 02, p. 269-277, 2006.

21. HIRSH, D. C.; MACLACHLAN, N. J.; WALKER, R. L. **Veterinary Microbiology**, 2nd Edition. Massachusetts: Wiley-Blackwell. 536 p. 2004.
22. HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p
23. HORNE, S.M.; MCDONOUGH, J.P.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 44, pp.179-184, 2000.
24. IKUNO, A.A.; GUASTALLI, E.A.L.; BUIM, M.R.; GAMA, N.M.S.Q.; FRANÇA, S.B.; ALONSO, A.C.; FUJIKURA, L.M.; FERREIRA, V.C.A. Genes de virulência associados em *Escherichia coli* (APEC) isoladas de poedeiras comerciais do meio ambiente e de água de dessedentação de granjas de postura de ovos. **Biológico**, São Paulo, v.68-72, 2006.
25. IKUNO, A.A. GAMA, N.M.S.Q.; GUASTALLI, E.A.L. GUIMARÃES, M.B.; & FERREIRA, V.C.A. CARACTERÍSTICAS DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PROVENIENTES DE AVES SILVESTRES QUANTO A GENES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS. **Anais XXXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado. 2008.
26. JANSSEN, T.; SCHWARZ, C.; PREIKSCHAT, P.; VOSS, M.; PHILIPP, H-C.; WIELER, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli*(APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 5, p. 371-378, 2001.
27. JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W.; HORNE, S.M.; GIBBS, P.S.; WOOLEY, R.E.; SKYBERG, J.; OLAH, P, KERCHER, R.; SHERWOOD, J.S.; FOLEY, S.L.; NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v.46, n.2, p.342–352, 2002.
28. KIMPE, A.; DECOSTERE, A.; MARTEL, A.; HAESENBROUCK, F.; DEVRIESE, L.A. Prevalence of antimicrobial resistance among pigeon isolates of streptococcus gallolyticus, *Escherichia coli* and *Salmonella enteric* serotype Typhimurium. **Avian Pathology**, v. 31, p. 393-397, 2002.
29. KNOBL, T.; GODOY, S.N.; MATUSHIMA, E.R.; GUIMARÃES, M.B.; FERREIRA, A.J. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. **Brazilian Journal of veterinary research animal science**, São Paulo, v.45, p.54-60, 2008.

30. KOBAYASHI, H.; POHJANIVITA, T.; PELKONEN, S. Prevalence and characteristics of intimin and Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* from Gulls, pigeons and broilers in Finland. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, n.11, p. 1071-1073, 2002.
31. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M., SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, p. 494, 919-920, 2001.
32. KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. **Microbiology Reviews**. V.24, p. 107-117, 2000.
33. LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**, v.73, n. 1, p. 27-35, 2002.
34. LEMUS, J.A.; BLANCO, G.; GRANDE, J.; ARROYO, B.; GARCIA-MONTIJANO, M.; MARTINE, F. Antibiotics threaten wildlife: Circulation quinolone residues and disease in Avian Scavengers. **Plos One**, Issue 1, 2008.
35. LEVY, C. E. **Manual de Microbiologia clínica aplicada ao controle de infecção hospitalar**. Associação Paulista de estudos e controle de infecção hospitalar. 2 ed. 2002.
36. MAURER J.J., BROWN, T.P.; STEFFENS, W.L.; THAYER, S.G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesions, curli, and the temperature sensitive hemagglutinin tsh among avian *E. coli*. **Avian Coli**, v. 42, pp. 106-118, 1998.
37. MCPEAKE S.J.W., SMYTH J.A. & BALL H.H. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from health birds. **Veterinary Microbiology**, v.110, n.3, p. 245-253, 2005.
38. MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS, R.; BROWN, P.R. ARNE, P.; BREE, A.; DESARLES, C.; FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n.1, p.536-540, 2003.
39. MORABITO, S.; DELL'OMO, G.; AGRIMI, U.; SHIMIDT, H.; KARCH, H.; CHEASTY, T.; CAPRIOLI, A. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. **Veterinary Microbiology**, v.82, p. 275-283, 2001.

40. NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Bacterial from Animal**. 2002. p.1234.
41. NOLAN L.K., GIDDINGS C.W., HORNE S.M., DOETKOTT C., GIBBS P.S., WOOLEY R.E. & FOLEY S.L. Complement resistance, as determined by viable count and flow cytometric methods, and its association with the presence of iss and the virulence of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, V.46, n.2, pp.386-392, 2002.
42. NUNES, V.F.P. Pombos Urbanos: o desafio de controle. **Biológico**. São Paulo. V. 65, n.1/2, p.89-92, 2003.
43. PEDERSEN, K.; CLARK, L.; ANDELT, W.F.; SALMAN, M.D. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* enteric in rock pigeons captured in fort Collins, Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v.42,n.1, pp. 46–55, 2006.
44. RADIMERSKY, T.; FROLKOVA, P.; JANOSZOWSKA, D.; DOLEJSKA, M.; SVEC, P.; ROUBALOVA, E.; CIKOVA, P.; CIZEC, A.; LITERAK, I. Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. **Journal of Applied Microbiology**. V. 109, n.5, p. 1687-1695, 2010.
45. ROCHA, A.C.G.P.; SILVA, A.B.; BRITO, B.G.; MORAES, H.L.S.; PONTES, A.P.; CÉ, M.C.; NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. **Avian Disease**, v.46, n.3, p.749-753, 2002.
46. ROCHA A.C.G.P., ROCHA S.L.S., LIMA-ROSA C.A.V., SOUZA G.F., MORAES H.L.S., SALLE F.O., MORAES L.B. & SALLE C.T.P. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.28,n.3, p. 183-186, 2008.
47. RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C. et al. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**. v.36, p.241-256, 2005.
48. SAIDENBERG, A.B.S. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas. São Paulo. 2008. **Dissertação** (mestrado) Universidade de São Paulo (USP). 91 p.
49. SANTIAGO, R. G. Urubu-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) **Guia Interativo de Aves Urbanas**, 06 dez. 2006. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/lte/giau/visualizarMaterial.php?idMaterial=364>. Acesso em: 13 jun. 2012.

50. SANCHES, L.A.; KNOBL, T. Detecção molecular de *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) em aves do Estado de São Paulo. **Anais XV Congresso Associação Brasileira de Animais Selvagens**, p. 205-207, 2012.
51. SCHREMMER, C. Enteropathogenic *Escherichia coli* in Psittaciformes. **Avian Pathology**. v.28, p. 349-354, 1999.
52. SCHMIDT, H.; SCHEEF, J.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; WIELER, L.H.; KARCH, H. A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from Pigeons. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1205-1208, 2000.
53. SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 4.ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001, 912 p.
54. SILVA, L.V.; NICOLI, J.R.; NASCIMENTO, T.C.; DINIZ, C.G. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains recovered from urban pigeons (*Columba livia*) in Brazil and their antimicrobial susceptibility patterns. **Current Microbiology**, v.59, p. 302-308, 2009.
55. SILVEIRA, W.D., FANTINATTI, F.; DE CASTRO, A.F. P. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.1, p.9-14, 1994.
56. SKYBERG, J.A.; HORNE, S.M.; GIDDINGS, C.W.; WOOLEY, R.E.; GIBBS, P.S.; NOLAN, L. Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with multiplex polymerase chain reaction. **Avian Disease**, v. 47, n.4, p. 1441-1447, 2003.
57. SUSSMANN, M.; *Escherichia coli* and human disease. In: Sussman, M. **Escherichia coli Mechanisms of Virulence**. Cambridge, Reino Unido: University Press, 1997. p.3-48.
58. VIDOTTO M.C., NAVARRO H.R. & GAZIRI L.C.J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**. V.59, n.1, pp.79-87. 1997.
59. YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and medical microbiology**, v. 12, p.85-90, 1995.
60. YANG, H.; CHEN, S.; WHITE, D.G.; ZHAO, S.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R.; MENG, J. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p.3483-3489, 2004.

61. YORIO, P.; GIACCARDI, M. Urban and fishery waste tips as food sources for birds in northern coastal Patagonia, Argentina. **Ornitologia Neotropical**, 13: 283-292, 2002.

CAPÍTULO 5 -CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados epidemiológicos indicam que os animais de vida livre são potenciais transmissores, diretos ou indiretos, de agentes infecciosos ao homem e aos animais domésticos e de cativeiro. A aproximação dos animais de vida livre a hospedeiros incomuns ao seu *hábitat* contribui para o aumento de microrganismos capazes de causar doenças novas ou pouco frequentes em humanos e outros animais. O estudo dos animais sinantrópicos é de grande interesse na medicina veterinária principalmente quando são considerados reservatórios de patógenos. Infecções transmitidas por animais sinantrópicos ao homem e animais domésticos são de grande importância a saúde pública e também na agropecuária.

Neste estudo foi observado que pombos domésticos e urubus de cabeça preta podem excretar cepas de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas para aves, assim como possivelmente transferir genes de resistência a antimicrobianos para humanos e outros animais. Constatou-se que pombos atuam como reservatórios de *Salmonella enterica* do sorotipo Typhimurium, Swazergrund e Enteritidis, de *Mycoplasma gallisepticum*, o que pode representar um importante problema para a avicultura comercial. A eliminação contínua destes microrganismos pelas citadas aves pode representar um importante problema para pessoas e outros animais que tenham contato com as excretas ou ambiente contaminado pelas mesmas, podendo causar sérias conseqüências sanitárias.

Muitas são as suposições e preconceitos quando tratamos de aves sinantrópicas. Urubus são animais por muito tempo estigmatizados, no entanto, possuem um papel ecológico muito importante e hoje com o declínio de algumas populações orientais, se levantou a preocupação quanto à preservação destes animais. O presente estudo revelou que estes animais podem não ser importantes na cadeia epidemiológica de muitas das enfermidades em que supostamente participariam.

Os pombos domésticos são animais que são considerados, inclusive pela legislação brasileira, como uma praga urbana. É uma ave que se reproduziu e se adaptou muito bem ao ambiente humano, sendo hoje uma

figura representativa do ambiente antropizado. Existem grandes populações de pombos domésticos em parques, escolas, asilos, granjas, empresas de ensacamento de grãos entre outros ambientes, em busca desse alimento, além de água e abrigo. Trata-se de um animal de difícil controle e que estudos vem confirmando cada vez mais sua participação na cadeia epidemiológica de várias enfermidades, se estabelecendo em uma preocupação sanitária por potencial de transmissibilidade de agentes para o homem, para outras aves e animais. No presente estudo, percebeu-se a importância desta espécie aviária na cadeia epidemiológica de todos os agentes analisados, condição de potencial impacto para a avicultura comercial.

Outro ponto importante na prevenção destes agentes se trata da prevenção da contaminação ambiental. Cada vez mais se comprova a relação entre a contaminação ambiental com a veiculação de agentes patogênicos por aves de vida livre. A contaminação das águas e destinação inadequada de lixo leva a uma situação cada vez mais preocupante, visto que populações animais se contaminam com estes agentes, veiculando agentes infecciosos mesmo sem doença clínica. Com isso, sem o controle da contaminação do meio ambiente, dificilmente haverá um controle efetivo do agente na região. Medidas de destinação adequada de dejetos e resíduos devem fazer parte dos planos de manejo das criações avícolas.

O uso de telas e outras barreiras físicas, correta estocagem do alimento, destinação adequada de resíduos devem fazer parte da rotina do produtor avícola, com o fim de manter as aves comerciais o mais distante possível das aves e outros animais sinantrópicos. A vigilância epidemiológica e medidas de biossegurança que envolvem aves de vida livre que têm contato com aviários comerciais e domésticos devem ser uma preocupação sanitária constante, pela possibilidade da transmissão destas enfermidades nas granjas.

Por final, pouco se sabe sobre o real papel de aves sinantrópicas para a saúde humana, animal e ambiental ainda não foi bem estabelecido. Pela sua presença constante nos ambientes, são necessários mais estudos sobre esses animais.

