

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

**PESQUISA DE *Salmonella* sp. E *Escherichia coli* COM DETERMINAÇÃO
DO PERFIL DE RESISTÊNCIA EM PSITACÍDEOS DE REVENDAS NA
REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA - GOIÁS**

Karine Louise Calaça

Orientador: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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:


Nome completo do autor: KARINE LOUISE CALAÇA

Título do trabalho: PESQUISA DE *Salmonella* sp. E *Escherichia coli* COM DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA EM PSITACÍDEOS DE REVENDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA - GOIÁS

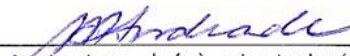
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 21 / 03 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

KARINE LOUISE CALAÇA

**PESQUISA DE *Salmonella* sp. E *Escherichia coli* COM DETERMINAÇÃO
DO PERFIL DE RESISTÊNCIA EM PSITACÍDEOS DE REVENDAS NA
REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA - GOIÁS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos

Orientador:

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade – EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme – EVZ/UFG

Pesquisadora Dra. Dunya Mara Cardoso Morais – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Calaça, Karine Louise

PESQUISA DE Salmonella sp. E Escherichia coli COM DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA EM PSITACÍDEOS DE REVENDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA - GOIÁS [manuscrito] / Karine Louise Calaça. - 2018.

xvi, 44 f.

Orientador: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade; co-orientadora Dra. Valéria de Sá Jayme; co-orientador Dr. Dunya Mara Cardoso Morais.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Aves silvestres. 2. Colibacilose. 3. PCR. 4. Salmonelose. I. Andrade, Maria Auxiliadora, orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade** lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

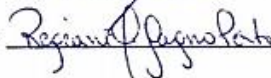
Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade



Profa. Dra. Marília Cristina Sola



Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Pôrto



Aos amores da minha vida que estão
sempre me dando apoio e suporte,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda minha trajetória e por todas conquistas e vitórias alcançadas. Aos meus pais Maria José Calaça e Edson Pereira Calaça, meu irmão Victor Palhares Calaça e ao Theodoro por todo suporte, amor e apoio ao longo da minha vida e em meus estudos. Sem vocês eu não estaria hoje onde estou.

Ao meu amor Diego Carvalho, por me apoiar e me aguentar mesmo nos momentos mais difíceis. Sem você e seu apoio tudo seria muito mais difícil.

Aos meus familiares, em especial minhas tias Maria Messias e Maria Madalena, por todo suporte nessa trajetória. Aos meus sogros Neta Carvalho, Balbino Laurindo e a Maria Aparecida Carvalho por estarem sempre compartilhando momentos comigo.

Aos meus amigos de uma vida Ana Flávia Alves, Kamylla de Paula, Patrícia Rodrigues, Jéssica Alves e Jéssica Mesquita. E aos amigos que a veterinária me deu Joice Simões, Manuella Cabral e Michel Lima.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade por me acolher como orientada, por todos ensinamentos, pela ajuda e apoio ao longo do meu mestrado. A todo pessoal do laboratório, em especial a Nazaré Lopes, Pedro Henrique Queiroz, Dayana Andrade, Mélaney Madrid, Amanda Teles, Winder Borges e Dunya Mara que contribuíram muito para o meu experimento e aprendizado. À minha amiga e companheira de coletas que a pós me deu Silvânia Andrade, obrigada por me fazer rir mesmo nos dias mais complicados. Às professoras Dra. Iolanda Nunes, Dra. Valéria de Sá Jayme e Dra. Adriana Marques, por toda ajuda, disposição e por contribuírem para meu aprendizado. As professoras Dra. Regiani Nascimento Gagno Pôrto e Dra. Marília Cristina Sola por aceitarem compor minha banca de defesa de dissertação.

Agradeço aos proprietários dos estabelecimentos comerciais por abrirem suas portas e contribuírem durante as coletas em minha pesquisa. Aos animais por sua participação. A AGRODEFESA por estar sempre à disposição, fornecendo material e condições para a realização da minha pesquisa. À CAPES pela bolsa concedida em todo período de mestrado. A EVZ e a UFG por serem como uma segunda casa para mim, me dando muito orgulho de fazer parte de seu corpo discente e a todos professores que contribuíram nesta etapa da minha vida.

A todos citados e a outros que de certa forma fizeram parte de tudo isso e me ajudaram, o meu muito obrigada de coração.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. <i>Escherichia coli</i>	2
2.2. Resistência bacteriana	4
2.3. <i>Salmonella</i> sp.	6
REFERÊNCIAS	7
CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> COM DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENES DE VIRULÊNCIA EM PSITACÍDEOS DE REVENDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA – GOIÁS.....	12
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Local.....	15
2.2. Coletas das amostras.....	16
2.3. Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	17
2.4. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	18
2.5. Técnica de PCR.....	19
2.6. Análise estatística.....	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 3 - PESQUISA DE <i>Salmonella</i> sp. EM AMOSTRAS DE GAIOLAS DE PSITACÍDEOS DE REVENDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA – GOIÁS.....	32
RESUMO	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1. Local.....	35
2.2. Coletas das amostras.....	35

2.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i>	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
ANEXO A	42
ANEXO B	44

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO 2**

FIGURA 1 – Resultados de testes de suscetibilidade de cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras provenientes de gaiolas de psitacídeos de revendas da região metropolitana de Goiânia - GO, frente aos antimicrobianos testados	22
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 – Número de lojas de vendas de aves por município, da região metropolitana de Goiânia - Goiás, em que foram realizadas coletas das amostras de gaiolas de psitacídeos.....	16
TABELA 2 – Número de gaiolas selecionadas aleatoriamente de acordo com a quantidade total por estabelecimento.....	16
TABELA 3 – Relação entre quantidade de aves por gaiola e espécies identificadas durante as coletas nas vendas na região metropolitana de Goiânia - GO.....	17
TABELA 4 – Distribuição dos padrões de resistência aos 10 antimicrobianos testados em cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas em amostras provenientes de gaiolas de psitacídeos em casas de vendas da região metropolitana de Goiânia - GO.....	23
TABELA 5 – Distribuição dos genes <i>iss</i> , <i>tsh</i> , <i>papC</i> , <i>traT</i> e <i>eae</i> em cepas de <i>Escherichia coli</i> isolados de psitacídeos de vendas da região metropolitana de Goiânia - Goiás.....	25

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – Número de lojas de vendas de aves por município, da região metropolitana de Goiânia - Goiás, em que foram realizadas coletas de amostras de gaiolas de psitacídeos.....	35
TABELA 2 – Número de gaiolas selecionadas aleatoriamente de acordo com a quantidade total por estabelecimento.....	36
TABELA 3 – Relação entre espécies identificadas e quantidade de gaiolas em que foram coletadas amostras de excretas, ração e suabes de bebedouro nas vendas da região metropolitana de Goiânia - GO.....	36

LISTA DE QUADROS**CAPÍTULO 2**

QUADRO 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados para detecção de genes de virulência de <i>Escherichia coli</i> pela técnica de PCR.....	19
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGRODEFESA	Agência Goiana de Defesa Agropecuária
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica para aves
BHI	<i>Brain Heart infusion</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CS	Caldo selenito cistina
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
NMEC	<i>Escherichia coli</i> de meningite neonatal
PCR	Reação de cadeia em polimerase
REDEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica para coelhos
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de shigatoxina
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TGI	Trato gastro intestinal
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
V	Volt
VB	Ágar Verde Brillhante

RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido no intuito de investigar a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., determinar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e detectar genes de virulência dos isolados de *Escherichia coli*. Para o estudo foram selecionados, por conveniência, 50 estabelecimentos em Goiânia e municípios da região metropolitana, nos quais foram coletadas 141 amostras de excretas, 141 de ração nos comedouros, e 141 de suabes de bebedouro dos psitacídeos mantidos em gaiolas para revenda. As amostras foram submetidas a bacteriologia convencional e PCR onde *Escherichia coli* foi identificada em 9,7% (41/423) das amostras, sendo 12% (17/141) em excretas, 8,5% (12/141) na ração e 8,5% (12/141) nos suabes de bebedouro. Na determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Escherichia coli* isoladas, obteve-se resistência a ciprofloxacina em 4,9% (2/41), gentamicina 17% (7/41), doxiciclina 34,1% (14/41), florfenicol 34,1% (14/41), trimetropin 39% (16/41), tetraciclina 41,5% (17/41), enrofloxacina 43,9% (18/41), amoxicilina 48,8% (20/41), neomicina 61% (25/41) e sulfonamida 90,2% (37/41). O gene *iss* foi detectado em três isolados, o *tsh* em três, o *papC* em dois e os genes *traT* e *eae* não foram detectados. Não foi isolada *Salmonella* sp. nas amostras. Diante de tais resultados, conclui-se que os isolados de *Escherichia coli* apresentam resistência aos antimicrobianos mais utilizados e existe a possibilidade dessas aves serem carreadoras de cepas patogênicas.

Palavras-chave: aves silvestres, colibacilose, PCR, salmonelose.

ABSTRACT

The current study was developed to investigate the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp., to determine the antimicrobial susceptibility profile and to detect virulence genes of *Escherichia coli* isolates. For the study, 50 establishments were selected in Goiânia and municipalities in the metropolitan region, in which 141 samples of excreta were collected, 141 of feed, and 141 drinkers' swabs of psittacine kept in cages for resale. Samples were submitted to conventional bacteriology and PCR and *Escherichia coli* was identified in 9.7% (41/423) of the samples, 12% (17/141) in excreta, 8.5% (12/141) in the feed and 8.5% (12/141) in the drinkers' swabs. In the determination of antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* samples isolated, was found resistance to ciprofloxacin 4.9% (2/41), gentamicin 17% (7/41), doxycycline 34.1% (14/41), florfenicol 34.1% (14/41), trimethoprim 39% (16/41), tetracycline 41.5% (17/41), enrofloxacin 43.9% (18/41), amoxicillin 48.8% (20/41), neomycin 61% (25/41) and sulfonamide 90.2% (37/41). The *iss* gene was detected in three isolates, *tsh* in three, *papC* in two and the *traT* and *eae* genes were not detected. *Salmonella* sp. was not isolated in the samples. It concludes that *Escherichia coli* isolates show resistance to the most commonly used antimicrobials and the possibility exists that these birds are carriers of pathogenic strains.

Keywords: colibacillosis, PCR, salmonellosis, wild birds.

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Psitacídeos são aves pertencentes a família *Psittacidae*, conhecidas por serem sociáveis, inteligentes, terem uma coloração exuberante e por sua capacidade em imitar sons. São animais facilmente identificáveis, principalmente pelo formato arredondado do bico e dos pés (zigodáctilos). Estão distribuídas em todo o mundo e 85 das 375 espécies reconhecidas são originárias do Brasil¹.

Dentre as espécies nativas do Brasil estão arara azul grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*), arara canindé (*Ara ararauna*), periquito rei (*Eupsittula aurea*), periquito rico (*Brotogeris tirica*), maitaca verde (*Pionus maximiliani*) e papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*)². Além das aves nativas, também são comercializadas no país aves oriundas de diferentes nacionalidades, como as calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) e periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) da Austrália, e diferentes espécies de agapornis da África³.

Nas últimas décadas, o aumento da comercialização e criação de animais de companhia (*pets*) tem gerado uma maior procura de aves silvestres e exóticas e, dentre estas, destacam-se os psitacídeos¹. Este aumento também pode ser atribuído à normatização e legalização da comercialização de animais silvestres provenientes de criadouros, através da criação de portarias específicas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)⁴.

O comércio de aves silvestres em lojas agropecuárias na região metropolitana de Goiânia é expressivo e existem cerca de 120 casas de revenda de aves vivas cadastradas na Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA)⁵. Embora sejam cadastradas e registradas, não existe um controle satisfatório quanto as condições higiênico-sanitárias desses estabelecimentos e de bem-estar das aves comercializadas.

Os proprietários das lojas agropecuárias recebem aves de diversos criatórios, as quais são alojadas em gaiolas sem uma avaliação prévia ou período de quarentena, passando a compartilhar ambientes com outras espécies de animais. Este fato possibilita a disseminação de patógenos entre os animais recém adquiridos e os já existentes nos estabelecimentos^{2,6}. Tais fatores somados a maior proximidade e contato com o homem potencializam um risco zoonótico que estas aves podem representar⁷.

Chiacchio et al.⁷ relataram que a microbiota entérica dos psitacídeos é formada predominantemente por bactérias Gram-positivas, no entanto, infecções causadas por bactérias Gram-negativas podem ocorrer. Os distúrbios gastrointestinais gerados por bactérias Gram-negativas componentes da microbiota podem ser atribuídas principalmente a *E. coli* e *Salmonella* sp., que podem causar doença clínica em aves imunossuprimidas ou estressadas¹.

De acordo com Ewers et al.⁸, cepas patogênicas de *E. coli* podem estar presentes na microbiota intestinal de aves saudáveis, sendo disseminadas no ambiente e permanecendo viáveis durante longos períodos, contaminando água e alimentos que servem de veículos do patógeno para outros animais e para o homem.

Além disso, o convívio dessas aves com outras espécies de animais e seres humanos pode propiciar a troca de microrganismos contendo genes de resistência aos antimicrobianos. Tal fator é de extrema importância, uma vez que os antimicrobianos são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária e seu uso abusivo e incorreto tem gerado altos níveis de resistência que tem acarretado limitações às opções de tratamento em doenças infecciosas bacterianas, representando uma ameaça à saúde pública^{9,10}.

Não existem registros ou medidas de certificação de origem dessas aves e nem sempre elas são manejadas e alojadas de forma correta, podendo ocorrer nas lojas uma superlotação de animais, falta de higiene nas gaiolas e no ambiente e condições de estresse. Tais fatores podem contribuir para o desenvolvimento de patógenos e transmissão de infecções por *E. coli* e *Salmonella*. Como não foram encontrados registros envolvendo tais microrganismos e a suscetibilidade destes patógenos em psitacídeos alojados em estabelecimentos comerciais, propôs-se este trabalho com o objetivo de pesquisar *E. coli* e *Salmonella* sp. em amostras de gaiola de psitacídeos localizadas em estabelecimentos de revenda e determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Escherichia coli*

A colibacilose aviária é uma doença distribuída em todo o mundo e capaz de gerar danos em todas as espécies de aves. É causada pela *Escherichia coli*, um bastonete Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, não esporulado, anaeróbio facultativo, com metabolismo respiratório e fermentativo¹¹.

Assim como em algumas espécies de aves, a presença de *E. coli* no trato digestório de psitacídeos é considerada indesejável, já que uma vez presentes, cepas patogênicas podem

adquirir e expressar uma combinação de fatores genéticos, tais como plasmídeos, transposons e ilhas de patogenicidade, tornando assim altamente adaptadas, capazes de gerar diversas doenças¹².

De modo geral, a infecção por *E. coli* em aves é considerada secundária a outros agentes patogênicos, sendo a manifestação da doença predominantemente extraintestinal¹³. No entanto, isolados de *E. coli* podem ser classificados em três grandes grupos, que variam de acordo com as características genéticas e comportamento clínico, sendo eles o grupo de cepas comensais intestinais, cepas patogênicas entéricas e de cepas patogênicas extraintestinais¹⁴.

Em psitacídeos, a colonização por *E. coli* está diretamente ligada a fatores de estresse, má nutrição, falta de higiene, problemas ambientais e de manejo¹⁵. Nestes animais os distúrbios clínicos mais frequentes incluem pneumonia, sinusite e doenças entéricas, sendo comuns casos de sepse¹⁶. Estas aves se infectam pela ingestão de água e alimentos contaminados com a bactéria, ou mediante a inalação de partículas de poeira contaminadas. Ao ser excretada nas fezes e secreções, *E. coli* pode sobreviver em ambientes secos por longos períodos, aumentando assim a chance de disseminação do patógeno e infecção de novos hospedeiros¹⁷.

Portanto, a patogenia da doença gerada por *E. coli* está diretamente ligada aos mecanismos de virulência que o microrganismo apresenta, que podem ser combinados de diferentes formas, tornando a bactéria capaz de causar doença no hospedeiro¹⁸. Desse modo, a gravidade do quadro clínico depende do potencial de virulência do agente causador, que por sua vez é determinado pelo conjunto de genes localizado nas ilhas de patogenicidade¹⁹.

E. coli pode ser classificada em sorotipos através dos antígenos somático (O), capsular (K), flagelar (H) e *pili* (F)²⁰ e também em patótipos, que variam de acordo com os genes responsáveis pela expressão de fatores de virulência e com os aspectos clínicos patológicos²¹.

Os patótipos mais importantes em animais e no homem são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* produtora de shigatoxina (STEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC)²².

Dentre os patótipos, APEC é considerada uma das principais causadoras de morbidade e letalidade em aves silvestres e domésticas²³. Os mecanismos de virulência da APEC são considerados multifatoriais. Os genes envolvidos nesses mecanismos mais frequentemente encontrados em APEC são: *iss* e *traT* (mecanismos de resistência sérica), *pap*

e *fela* (mecanismos de adesão), *iuc* (presença de aerobactina) e *tsh* (hemaglutinina temperatura-sensível)^{8,22,24}. Além desses, existem mais de 30 genes de virulência relatados em diferentes cepas de *E. coli* potencialmente patogênicas²⁵.

Acredita-se que a maioria dos sorogrupos de *E. coli* não apresenta nenhum gene de virulência, no entanto, durante o processo evolutivo, algumas cepas adquirem diferentes combinações de genes, tornando-as patogênicas²². O gene *iss* é responsável por promover o aumento da resistência aos efeitos prejudiciais do soro, gerando maior taxa de sobrevivência do agente no hospedeiro²⁶. O gene *traT* é responsável por codificar, através de plasmídeos conjugativos a proteína de superfície *Trat*, que desempenha a função de resistência sérica, gerando efeitos bactericidas do sistema complemento e à fagocitose. O fator de virulência *tsh* é responsável pela síntese de proteínas termo-sensíveis que possuem capacidade hemaglutinante e auxiliam nos estágios iniciais de infecções em aves²². O gene *papC* é responsável por codificar a fímbria P, uma das adesinas mais frequentes em cepas de *E. coli*²⁷.

Tais genes estão localizados em plasmídeos ou em cromossomos, que podem ser identificados para a determinação dos fatores de virulência. No cromossomo estão organizados em grandes fragmentos de DNA e são denominadas ilhas de patogenicidade²⁸.

Aves silvestres, assim como as demais espécies de aves, também podem ser afetadas pelo patótipo EPEC. Este patótipo pode ser caracterizado pela presença do gene *eae*, que é responsável por codificar uma proteína denominada intimina, utilizada durante o processo de adesão à mucosa intestinal²⁹.

Apesar de algumas cepas de *E. coli* serem mais patogênicas do que outras, vários fatores devem ser considerados para determinar o potencial da *E. coli* para doença em psitacídeos de cativeiro. Aves silvestres podem adquirir cepas de EPEC pelo contato com humanos e animais domésticos, tornando-se fontes de infecção zoonóticas²¹. Tal fato gera uma crescente preocupação com o potencial risco gerado pelo contato com essas aves e com a possibilidade de transmissão de *E. coli* patogênica.

2.2. Resistência bacteriana

As bactérias podem ser classificadas como sensíveis ou resistentes frente aos antimicrobianos. Dentre os tipos de resistência aponta-se a resistência natural, que corresponde a uma característica já existente em determinada espécie bacteriana, e a resistência adquirida, pela aquisição de resistência de uma bactéria sensível^{30,31}.

O rápido crescimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos gerou uma grande preocupação com relação à saúde humana e veterinária. Mundialmente, a utilização de

antimicrobianos é comum para o tratamento de doenças infecciosas em animais de produção, em animais de companhia e como moduladores de crescimento. Estudos revelam que a utilização de antimicrobianos em animais contribuiu para o desenvolvimento da resistência bacteriana em humanos, uma vez que diversas classes de antibióticos utilizadas em animais também são usadas na linha humana³². Nas aves, os principais grupos de antimicrobianos utilizados são sulfonamidas, tetraciclina, polipeptídeos, lincosamidas, cefalosporinas e quinolonas³³.

Nos anos de 1990, após a introdução do uso das fluorquinolonas em medicina veterinária, estudos evidenciaram o aumento da resistência a esta classe de antimicrobianos em *Salmonella* isoladas de seres humanos. Constatou-se que este microrganismo apresentava similaridade genética a amostras isoladas de animais. Também foram isoladas *E. coli* resistentes a fluorquinolona em crianças que nunca haviam recebido este antimicrobiano e que tinham contato direto com animais. Tais fatos evidenciaram a questão da interação com os animais como possível fonte dessa resistência³⁴.

Diversos fatores podem contribuir para a ocorrência ou disseminação da resistência bacteriana. Eles podem estar relacionados tanto ao hospedeiro quanto à pressão seletiva gerada pelos antibióticos³⁵. A elevada atividade metabólica e reprodutiva bacteriana, associada a mecanismos de troca de material genético, contribuem para que os microrganismos desenvolvam, ao decorrer do tempo, formas de resistência intrínsecas à estrutura física celular, relacionadas a mutações ou à transferência de genes de resistência a outras bactérias³⁶.

Podem ocorrer desde mudanças na permeabilidade da membrana celular, que impedem a entrada do antibiótico na célula, ou fazem com que o antibiótico seja bombeado para fora da célula, até transferência de material genético, no qual as bactérias adquirem a capacidade de degradar e/ou inativar o antibiótico. Nas mutações genéticas, as bactérias sofrem uma mutação que altera o alvo de um antibiótico de maneira que ele não consiga agir nela³⁷. Com isso, uma cepa bacteriana pode se tornar resistente a determinado antibiótico mesmo sem ter contato prévio com a droga³¹.

Apesar de haver tais mecanismos que levam a manifestação natural de resistência bacteriana frente aos antimicrobianos, a provável fonte que dá origem a todo esse processo em aves de cativeiro, está relacionada ao contato direto com os tratadores, que são responsáveis pelo manejo das aves, o qual favorece a troca de microrganismos que contêm genes de resistência. Outra provável fonte de resistência nessas aves está relacionada a uma possível exposição prévia a antimicrobianos para um tratamento profilático³⁸.

A falta de recursos para diagnóstico laboratorial ou a não utilização destes mesmo quando disponíveis, somados à prescrição de antimicrobianos sem sua devida necessidade, além de subdosagens ou interrupções de tratamentos antes do período recomendado, agravam e contribuem para o aparecimento de bactérias resistentes e multirresistentes³⁹. Tais situações são frequentemente observadas principalmente com relação a animais de companhia, em especial as aves.

2.3. *Salmonella* sp.

As salmoneloses tem destaque mundial no campo da saúde pública, devido as suas características de morbidade, por serem epidêmicas e principalmente pela dificuldade em seu controle. Esses fatores devem-se a múltiplos parâmetros epidemiológicos, principalmente pelas inúmeras fontes e vias de infecção e transmissão presentes em seu ciclo⁴⁰.

Bactérias do gênero *Salmonella* são pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, classificadas como bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativas⁴¹. São bacilos curtos (0,7 a 1,5 x 2,5 μm), não esporulados e a maioria das espécies são móveis com flagelos, com exceção da *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum. Sua temperatura ótima de multiplicação é 37°C, porém em temperaturas mais altas, a 42°C, elas também podem se multiplicar, sendo destruídas acima dos 60°C, não apresentando crescimento em temperaturas abaixo de 5°C^{42,43}.

O método de classificação das salmonelas mais aceito na atualidade e adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o esquema de Kauffmann-White, que dividiu o gênero *Salmonella* em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie de *Salmonella* entérica é dividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*), das quais existem diversos sorotipos, sendo conhecidos atualmente mais de 2500⁴⁴, dos quais 95,5% pertencem à espécie entérica⁴⁵.

Salmonella pode colonizar o trato digestório de aves, répteis e mamíferos, dentre eles o homem⁴³. Em aves as principais espécies causadoras de doenças são *Salmonella* Pullorum, causadora da pulorose, *Salmonella* Gallinarum, que causa o tifo aviário, e o paratifo aviário, que pode ser causado por qualquer *Salmonella*, com exceção destas citadas. As aves silvestres podem ser acometidas por qualquer sorotipo, no entanto, *Salmonella* Typhimurium tem sido o mais isolado⁴⁶.

Em aves silvestres a salmonelose, independente do sorotipo envolvido, pode gerar infecções graves e constituir uma ameaça à conservação da diversidade das espécies, apesar de muitos autores relatarem que a maioria das aves é portadora inaparente⁴³.

Em psitacídeos a salmonelose pode ser uma doença grave determinando sinais clínicos variados. Nessa espécie a doença cursa com febre ou hipotermia, diarreia, e em alguns casos mais severos e de maior duração, artrite e pan-oftalmite. Porém, algumas aves são portadoras assintomáticas. Dentre os achados necroscópicos podem ser observadas hepatomegalia, esplenomegalia, congestão de pulmão e rins, pericardite e enterite catarral a hemorrágica⁴⁷.

Diversos fatores estão envolvidos na severidade da manifestação da salmonelose em aves. A resposta do sistema imune da ave dependerá do sorotipo envolvido, da idade do animal, da existência de coinfeções, do estado nutricional, do manejo sanitário e do nível de estresse a que a ave é submetida, que poderá aumentar a gravidade da doença e a ocorrência de casos fatais⁴⁸.

Salmonella pode ser transmitida de diversas maneiras, sendo a via oro-fecal a de maior importância. A ave pode contrair a bactéria pelo contato indireto com outros animais infectados, pela água ou alimento, por objetos e superfícies contaminadas, ou mesmo pela inalação de partículas no ar. Insetos e alguns tipos de helmintos também servem como carreadores de *Salmonella* sp. Animais com infecções crônicas e aves de vida livre podem ser carreadores e servirem como reservatórios para animais mantidos em cativeiro⁴⁹.

Os psitacídeos são considerados importantes fontes de infecção para demais aves, mamíferos e seres humanos. Surtos por *Salmonella* acarretam aparecimento de aves doentes e geram mortes súbitas, porém indivíduos que se recuperam podem se tornar portadores assintomáticos e continuar disseminando o patógeno por tempo variável⁵⁰. Tais fatos evidenciam a importância do monitoramento dessas aves com relação a este microrganismo, com a realização de continuas pesquisas a fim de encontrar focos do patógeno e assim efetuar medidas de controle.

REFERÊNCIAS

1. Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: Medicina veterinária. 2 ed. São Paulo: Roca; 2014. 1172 - 1174.
2. Bejcek V. Enciclopédia das Aves: As várias espécies e seus habitats. Brasil: Livros & Livros; 2006. 288.
3. Lisboa F. Psitacídeos. Mundo dos animais, fevereiro 2008; E-zine nº 5. [acesso 24 mar 2017]. Disponível em: <https://www.mundodosanimais.com>.

4. Valle SF, Allgayer MC, Pereira RA, Barcellos LJG, Hlavac NRC, França RT, Locatelli ML. Parâmetros de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de Araras Canindé (*Arara ararauna*) saudáveis mantidas em cativeiro comercial. Cien Ru. 2008; 38(3):711-716.
5. Goiás. Agência Goiana de Defesa Agropecuária. Programa Estadual de Sanidade Avícola. Goiânia; 2015.
6. Gonçalves GAM, Almeida SM, Lima ET, Filho RLA. Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in the intestinal microbiota of Psittaciformes in rehabilitation process for wildlife reintroduction. Braz. J. Vet. Res. Anim. 2010; 47(3):185-189.
7. Chiacchio RMG, Cunha MPV, Sturn RM, Moreno LZ, Moreno AM, Pereira CBP, Martins FH, Franzolin MR, Piazza RMF, Knöbl T. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Zoonotic risks associated with psittacine pet birds in home environments. Vet Micro. 2016; 184: 27-30.
8. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet Micro. 2004; 104: 91-101.
9. Silveira GP, Faruk N, Gesser JC, Sá MM. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. 2006; 23(4): 844-855.
10. Tonin F, Del Carlo RJ. Controle imediato dos antimicrobianos. Rev CRMF. 2017; 74:31-33.
11. Gonçalves GAM, Lima ET, Sequeira JL, Andreatti RL. Colisepticemia em Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*): Relato de Caso. São Paulo. 2006.
12. Knöbl T, Godoy SN, Matushima ER, Guimarães MB, Ferreira AJP. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. 2008; 45: 54-60.
13. Lopes ES, Maciel WC, Albuquerque AH, Machado DN, Bezerra WGA, Vasconcelos RH, Lima BP, Gonçalves GAM, Teixeira RSC. Prevalence and antimicrobial resistance profile of enterobacteria isolated from psittaciformes of illegal wildlife trade. Acta Scie Vet. 2015; 43: 1313.
14. Almeida AMS, Leonídio ARA, Andrade MA. Associação dos quadros anatomopatológicos de colibacilose aviária com genes de virulência de *Escherichia coli*. Vet em foc. 2017; 13(2): 113-131.
15. Mattes BR, Consiglio SAS, Almeida BZ, Guido MC, Orsi RB, Silva RM, Costa A, Ferreira AJP, Knöbl T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psittacideos. Arq do Inst Bio. 2005; 72: 13-16.
16. Bowman TA, Jacobson ER. Cloacal flora of clinically normal captive psittacine birds. The Jour of Zoo Ani Med. 1980; 11(3): 81-85.

17. La Razione RM, Woodward MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res in Vet Sci.* 2002; 73: 27-35.
18. Sussman M. *Escherichia coli* mechanisms of virulence. Cambridge, Reino Unido: University Press. 1997; 3-48.
19. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res.* 1999;30: 299-316.
20. Saif YM, Bernes HJ, Glisson JR, Fatly AM, Macdougald, Swayne LRDE. Diseases of Poultry. Ames, EUA. JWA State University. 2004: 631-656.
21. Saidenberg AB, Teixeira RHF, Guedes NMR, Allgayer MC, Melville PA, Benites NR. Molecular detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in asymptomatic captive psittacines. *Pesq Vet Bras* 2012; 32(9):922-926.
22. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames: Blackwell Publishing. 2010; 267-308.
23. Knöbl T, Gomes TAT, Vieira MAM, Bottino JA, Ferreira AJPF. Detection of *pap*, *sfa*, *afa* and *fim* adhesin-encoding operons in avian pathogenic *Escherichia coli*. *Int Jour of App Res in Vet Med, Washington.* 2004; 2(2): 135-141.
24. Rocha ACGP, Silva AB, Brito BG, Moraes HLS, Pontes AP, Cé MC, Nascimento VP, Salle CTP. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Dis.* 2002;46(3):749-753.
25. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunology and Immunopathology.* 2013;152(1):2-12.
26. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 2005;49(2):269-273.
27. Mohamed MA, Shehata MA, Rafeek E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chicken. *Vet Med Int.* 2014;1:1-6.
28. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity island of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microb.* 1997;23:1089-1097.
29. Rocha DCC, Marinho ANR, Santos SD, Loureiro ECB. Caracterização molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica em animais silvestres capturados na Região Amazônica. *Rev Pan-Amaz Saude* 2017; 8(1):9-16.
30. Almeida RT, Palermo-Neto J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. *Farm Aplic a Avilc. São Paulo; Roca.* 2005: 161-174.
31. Oliveira AC, Silva RS. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev Ele de Enfer.* 2008;10(1):189-197.

32. Arias MVB, Carrilho CMDM. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? Cien Agra. 2012; 33 (2):775-790.
33. Guardabassi L, Jensen, LB, Kruse H. Guia de antimicrobianos em veterinária. Porto Alegre: Artmed, 2010; 268: 2-16.
34. Mateu E, Martin M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? Jourl of Vet Med Series B-Infec Dis and Vet Pub He, Berlin. 2001;48(8):569-581.
35. Azevedo FM. Microrganismos multirresistentes. In: Oliveira AC. Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005; 341-47.
36. Cloete TE. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. Int Biodeter Biodegradation. 2003;51(4):277-82.
37. Delgado A, Oliveira C, Ferreira J, Lico M. Evolução da Resistência de *Escherichia coli* à Ampicilina. Cien Viva. 2009.
38. Machado DN, Lopes ES, Albuquerque AH, Bezerra WGA, Horn RV, Lima SVG, Siqueira RAS, Beleza AJF, Oliveira FR, Cardoso WM, Teixeira RSC. Detecção e avaliação do perfil de sensibilidade antimicrobiana de enterobactérias isoladas de periquitos cara-suja (*Pyrrhura griseipectus*) em cativeiro. Arq Bras Med Vet Zootec. 2016;68(6):1732-1736.
39. Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LBG. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. Braz Jour of Vet Res and Ani Sci. 2005;42(6):465-470.
40. Hoefler HL. Diseases of the gastrointestinal tract. In: Altman RB; Clubb SL; Dorestein GM; Quesenbery K, Editors. Avi Med and Surg. Philadelphia: Saunders. 1997;419-453.
41. Silva MA; Marvulo MFV; Mota RA; Silva JCR. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. Pesq Vet Bras. 2010; 30(7):573-580.
42. Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. IN nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos: Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus. 2003;1:9.
43. Carvalho ACFB; Cortez ALL. *Salmonella* sp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. Ciênc Ru. 2005; 35(6):122-130.
44. CDC, 2015. [acesso 12 mar 2017]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>.
45. Ferreira EO, Campos LC. Salmonella. In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 5.ed. São Paulo: Atheneu. 2008; 43:329-338.
46. Benskin CMH; Wilson K; Jones K; Hartley IR. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. Biol Rev. 2009; 84:349-373.

47. Grimes JE, Arizmendi F. Survey of clinical psittacine bird sera for *Salmonella typhimurium* agglutinis. *Avian Dis.* 1992; 36: 813-815.
48. Evans EE; Zoonotic diseases of common pet birds: Psittacine, Passerine and Columbiform species. *Vet Clin Exot Anim.* 2011;14:457-476.
49. Brown NHH. Psittacine Birds. In: Tully TN, Lawton MPC, Dorrestein GM. *Avian Medicine.* Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltda, 2000.
50. Guimarães MB. Passeriformes (Pássaro, Canário, Saíra, Gralha). In: Cubas ZS, Silva JCR; Catão-Dias JL, Editores. *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.* São Paulo: Roca; 2006. p.324-337.

CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli* COM DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA E GENES DE VIRULÊNCIA EM PSITACÍDEOS DE REVENDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA – GOIÁS

RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de isolar e identificar *Escherichia coli* em amostras coletadas em gaiolas de psitacídeos de estabelecimentos de revenda em Goiânia e região metropolitana, com posterior realização de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos e detecção de genes de virulência. Foram coletadas 141 amostras de excretas de psitacídeos e iguais quantidades de ração e suabes de bebedouro, totalizando 423 amostras. Dentre as amostras obtidas, *Escherichia coli* foi isolada em 9,7% (41/423), sendo 12% (17/141) em excretas, 8,5% (12/141) em ração e 8,5% (12/141) em bebedouros. Na determinação do perfil de suscetibilidade das amostras de *Escherichia coli*, obteve-se resistência a ciprofloxacina 4,9% (2/41), gentamicina 17% (7/41), doxiciclina 34,1% (14/41), florfenicol 34,1% (14/41), trimetropin 39% (16/41), tetraciclina 41,5% (17/41), enrofloxacin 43,9% (18/41), amoxicilina 48,8% (20/41), neomicina 61% (25/41) e sulfonamida 90,2% (37/41). Detectou-se o gene *iss* em três isolados, o gene *tsh* em três, o gene *papC* em dois e os genes *traT* e *eae* não foram detectados. Com os dados obtidos conclui-se que amostras obtidas de gaiolas de psitacídeos estão contaminadas por *Escherichia coli* resistentes a diversos antimicrobianos e portadoras de genes de virulência.

Palavras chave: APEC, aves silvestres, patogenicidade, resistência antimicrobiana.

CHAPTER 2 - *Escherichia coli* IDENTIFICATION WITH DETERMINATION OF RESISTANCE PROFILE AND VIRULENCE GENES IN SALES PSITTACINES IN THE METROPOLITAN REGION OF GOIÂNIA – GOIÁS

ABSTRACT

The current study was developed to isolate and identify *Escherichia coli* in samples collected from psittacine cages from retail establishments in Goiânia and metropolitan region, with subsequent antimicrobial susceptibility testing and detection of virulence genes. 141 samples of psittacine excreta and equal amounts of feed and drinkers' swabs were collected, totaling 423 samples. Among the samples obtained, *Escherichia coli* was isolated in 9.7% (41/423), 12% (17/141) in excreta, 8.5% (12/141) in feed and 8.5% (12 / 141) in drinkers' swabs. In the determination of the susceptibility profile of the *Escherichia coli* samples, resistance to ciprofloxacin 4.9% (2/41), gentamicin 17% (7/41), doxycycline 34.1% (14/41), florfenicol 34, 1% (14/41), trimethoprim 39% (16/41), tetracycline 41.5% (17/41), enrofloxacin 43.9% (18/41), amoxicillin 48.8% (20/41) , neomycin 61% (25/41), and sulfonamide 90.2% (37/41). The *iss* gene was detected in three isolates, the *tsh* gene in three, the *papC* gene in two, and the *traT* and *eae* genes were not detected. . It concludes that samples obtained from psittacine cages are contaminated by *Escherichia coli* resistant to several antimicrobials and carriers of virulence genes.

Keywords: antimicrobial resistance, APEC, pathogenicity, wild birds.

1. INTRODUÇÃO

Psitacídeos são criados como animais de estimação em todo mundo, principalmente por suas características naturais e pelo fácil manejo¹. Em seu “habitat” natural alimentam-se de frutas e ingerem água de fontes naturais e a microbiota do seu trato digestivo é composta principalmente por bactérias Gram-positivas^{2,3}. Já nos psitacídeos mantidos em cativeiro, ou criados como animais de companhia que podem ter contato com animais domésticos e com o homem, a presença de bactérias Gram-negativas é mais frequente, o que potencialmente possibilita o risco de doenças^{4,5}.

Em cativeiro, os psitacídeos passam a maior parte do tempo em microambientes limitados, dependentes de cuidados com relação a alimentação, fornecimento de água e higiene do local que vivem. Este fato aumenta o seu risco de exposição a bactérias potencialmente patogênicas, principalmente pela higiene inadequada de recipientes nos quais são fornecidos água e alimentos⁶.

Teoricamente, este risco se torna ainda maior em estabelecimentos comerciais, em que há, na maioria dos casos, superlotação das gaiolas, com condições higiênicas insuficientes e altas cargas de estresse⁷. Todos esses fatores potencializam a chance de infecção e transmissão de bactérias patogênicas, destacando-se *Escherichia coli*, que é considerada a enterobactéria mais isolada em aves silvestres⁵.

Escherichia coli pode estar presente na natureza e até mesmo colonizando o trato gastrointestinal (TGI) de aves, de forma apatogênica, sendo considerada por muitos autores como comensal e oportunista⁸. No entanto, algumas cepas modificaram suas estruturas antigênicas e adquiriram genes que lhes tornaram capazes de gerar doenças⁹, pois podem expressar genes capazes de determinar alterações clínicas e patológicas¹⁰.

A APEC é o patótipo relacionado a aves domésticas e silvestres¹¹ e suas cepas possuem uma grande diversidade genética, com uma ampla gama de fatores de virulência que inclui adesinas, sistemas de absorção de ferro, proteínas de membrana e toxinas, que são codificadas em plasmídeos ou em ilhas de patogenicidade. Dentre os genes que classificam uma cepa como APEC encontram-se os responsáveis pela resistência aos efeitos bactericidas do soro (*traT* e *iss*), mecanismos de adesão (*pap* e *fela*), aerobactina (*iuc*) e com hemaglutinina temperatura-sensível (*tsh*)^{8,12-14}.

É de conhecimento que *E. coli* isoladas em humanos e animais possuem diversos genes em comum, fato que evidencia a possibilidade de trocas genéticas entre diferentes cepas

ao entrarem em contato, contribuindo para uma maior virulência e para o surgimento de cepas patogênicas resistentes em ambas espécies¹⁵.

Apesar de haver muitos estudos relacionados a infecções e detecção de genes de virulência presentes em APEC em galinhas, ainda existem poucas informações sobre o perfil de virulência desse microrganismo em outras espécies aviárias, assim como sobre seu impacto na saúde pública e os elementos que facilitam a disseminação deste patógeno entre diferentes espécies¹⁶.

Outro fator relevante tanto para a saúde dos animais envolvidos, quanto para a saúde pública, se relaciona à resistência bacteriana aos antimicrobianos e à possibilidade de transferência de genes de resistência¹⁷. Estudos mostram um aumento exponencial de microrganismos resistentes aos antimicrobianos¹⁸, sendo os psitacídeos o foco de algumas pesquisas que revelam sua importância como hospedeiros de bactérias resistentes a antibióticos de uso na medicina humana e animal.

Lopes et al.¹⁹, relataram a preocupação com relação aos altos níveis de resistência e multirresistência em seu estudo envolvendo psitacídeos de um centro de reabilitação, afirmando que se não controladas, a presença de cepas resistentes a múltiplos fármacos pode levar a condições de risco sanitário, que afetam não só as aves contaminadas, mas também outros animais que possam ter contato com as mesmas e as pessoas envolvidas no manejo e cuidado dessas aves. Autores alertam que a presença de bactérias com altas taxas de resistência além de dificultar o tratamento de infecções, também contribuem para um aumento dos custos terapêuticos nesses animais²⁰.

Estes estudos evidenciam o cuidado que se deve ter com tais aves e a importância de maiores pesquisas envolvendo *E. coli* nas mesmas, uma vez que elas podem albergar enterobactérias resistentes, em especial cepas multirresistentes, sendo passíveis de disseminá-las no ambiente, bem como transmiti-las para outras espécies de animais e para o homem²¹.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo identificar *E. coli* em amostras de excretas, ração e suabes de bebedouro coletadas em gaiolas de psitacídeos de casas de revendas, com posterior determinação do perfil de resistência e detecção de genes de virulência nos isolados.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Local

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Bacteriologia e de Diagnóstico Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo nº 058/17.

2.2. Coletas das amostras

Inicialmente, foi atualizado o cadastro oficial das casas de vendas, acompanhando uma fiscal da AGRODEFESA, identificando os estabelecimentos de acordo com a localização e a presença das aves (*Psittacidae*) em toda região de Goiânia e municípios da região metropolitana. Das 80 lojas cadastradas que continham psitacídeos foram selecionados por conveniência 50 estabelecimentos para a coleta das amostras (Tabela 1).

TABELA 1 – Número de lojas de vendas de aves por município, da região metropolitana de Goiânia - Goiás, em que foram realizadas coletas das amostras de gaiolas de psitacídeos.

Municípios	Número de lojas
Goiânia	23
Senador Canedo	8
Aparecida de Goiânia	5
Trindade	4
Inhumas	3
Bela Vista	2
Teresópolis	2
Hidrolândia	1
Goianápolis	1
Goianira	1
TOTAL	50

O número de gaiolas selecionadas para coleta de amostras foi estabelecido de acordo com o total de gaiolas contendo psitacídeos por estabelecimento (Tabela 2). Em cada gaiola selecionada coletaram-se excretas, ração e suabes de bebedouro, em um total de três amostras por gaiola.

TABELA 2 – Número de gaiolas selecionadas aleatoriamente de acordo com a quantidade total por estabelecimento.

Número de gaiolas por estabelecimento	Número de gaiolas a serem coletadas
1 - 2	1
3 - 5	3
5 - 7	5
8 - 10	8
11 ou mais	11

Foi coletado aproximadamente 1,0 g de excretas, por meio de espátulas esterilizadas, em cinco pontos diferentes das bandejas, formando assim um *pool*, que constituiu uma amostra. Em relação ao alimento disponibilizado para as aves, foram coletados dos comedouros 2,5 g de cinco pontos diferentes, e acondicionados em tubos esterilizados, da mesma forma que as amostras anteriores. As coletas nos bebedouros foram realizadas por três suabes que foram esfregados em toda a extensão dos mesmos e acondicionados em tubos de polipropileno, os quais constituíram uma amostra.

Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas, identificadas e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável ao laboratório para processamento. Ao final das coletas nos 50 estabelecimentos obteve-se a soma de 423 amostras, sendo 141 de excretas, 141 de ração e 141 de suabes de bebedouro.

Durante a realização do estudo foram coletadas amostras em um total de 141 gaiolas e identificadas oito espécies diferentes de psitacídeos, das quais 48,2% (68/141) eram de periquitos australianos, 33,4% (47/141) de calopsitas e 14,2% (20/141) de agapornis. Além de gaiolas dessas espécies também foram identificadas 1,4% (2/141) *Bourke* rosa, 0,7% (1/141) *Red Humped* e iguais percentuais de *Turquoise*, papagaio verdadeiro e Araracanga. Verificou-se que a maioria das gaiolas continham mais de duas aves (100/141) (Tabela 3).

TABELA 3 – Relação entre quantidade de aves por gaiola e espécies identificadas durante as coletas nas revendas na região metropolitana de Goiânia - GO.

Espécies	Quantidade de aves por gaiola						Total
	1 ave		2 aves		3 ou mais aves		
	N*	%	N*	%	N*	%	N*
Periquito Australiano	2	1,4	11	7,8	55	39	68
Calopsita	6	4,3	12	8,5	29	20,6	47
Agapornis	-	-	4	2,9	16	11,3	20
<i>Bourke</i> rosa	-	-	2	1,4	-	-	2
<i>Red Humped</i>	1	0,7	-	-	-	-	1
<i>Turquoise</i>	1	0,7	-	-	-	-	1
Papagaio verdadeiro	1	0,7	-	-	-	-	1
Araracanga	1	0,7	-	-	-	-	1
Total de gaiolas	12	8,5	29	20,6	100	70,9	141

*N: número de gaiolas; -: ausência.

2.3. Pesquisa de *Escherichia coli*

As amostras foram processadas de acordo com Oliveira²². Inicialmente as amostras de ração foram pesadas e assim como as amostras de suabes de bebedouro, foram pré-

enriquecidas em água peptonada a 1%, na proporção de 1:10, incubadas a 37°C/ 18-24h e posteriormente transferidos 1 mL desta solução para 9 mL de caldo selenito cistina (CS) e então incubados à 37°C/ 18-24h. Já as amostras de excretas foram pesadas e inoculadas em caldo cérebro coração (BHI) e incubadas a 37 °C/ 18-24h.

Em sequência, alíquotas dos caldos de CS e BHI foram estriadas em ágar MacConkey e incubados a 37°C/ 18-24h. Do ágar MacConkey três unidades formadoras de colônias (UFC) com características morfológicas de *Escherichia coli* foram transferidas para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37°C/ 24h.

Após esse período, os TSI foram selecionados de acordo com a utilização de glicose, sacarose e lactose e submetidos aos testes de motilidade, produção de indol, produção de urease, produção de H₂S, malonato, reação vermelho metila, reação no citrato de Simmons. Os isolados com características compatíveis de *E. coli* foram repicados em caldo BHI, incubados a 37°C/ 24h e mantidos a -20°C para utilização posterior.

2.4. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana das amostras de *E. coli* foram determinadas pelo método de Difusão em Disco de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*²³.

Foram avaliados antimicrobianos utilizados em humanos e animais, sendo eles: amoxicilina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), ciprofloxacina (5 mcg), enrofloxacina (5 mcg), florfenicol (30 mcg), neomicina (30 mcg), sulfonamida (300 mcg), tetraciclina (30 mcg) e trimetopim (25 mcg) e doxiciclina (30 mcg).

Foram transferidas cinco UFC com características morfológicas semelhantes para 5 mL de caldo Casoy, que foi incubado a 37°C 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 inócuo. Após aguardar cerca de 15min para a difusão do caldo com o inócuo no ágar foram depositados os discos de antimicrobianos sobre a superfície inoculada, com o auxílio de uma pinça. Os discos foram 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 foram incubadas em posição invertida a 35-37°C/ 18h. Após este período, realizou-se a leitura dos halos de inibição com o auxílio de uma régua e os resultados foram interpretados de acordo

com uma tabela considerando a concentração do disco. Foi utilizada como cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.5. Técnica de PCR

Para realizar a extração do DNA foram utilizados *Qiagen Plasmid mini kit* e *Wizard® Genomic DNA Purification kit* e seguidos seus protocolos utilizando 3 mL de suspensão da cultura bacteriana em caldo BHI incubados por 24h a 37°C. Os *pellets* de DNA obtidos na extração foram suspensos em 50 µL de tampão TE, e então armazenados a -20°C.

Os DNA dos isolados foram submetidos ao PCR convencional empregando-se diferentes pares de base para a detecção a dos genes *tsh*, *iss*¹⁴, *traT*²⁴, *papC*²⁵ e *eae*²⁶ (Quadro 1).

QUADRO 1 – Sequência de *primers* utilizados para detecção de genes de virulência de *Escherichia coli* pela técnica de PCR.

Gene alvo	Sequência de primer 5'-3'	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>tsh</i>	5'-ACT ATT CTC TGC AGG AAG TC-3' 5'-CTT CCG ATG TTC TGA ACG T-3'	829pb	EWERS et al. ¹⁴
<i>iss</i>	5'-ATC ACA TAG GAT TCT GCC G-3' 5'-CAG CGG AGT ATA GAT GCC A-3'	309pb	EWERS et al. ¹⁴
<i>traT</i>	5'-GGTGTGGTGCATGAGCACAG-3' 5'-CACGGTTCAGCCATCCCTGAG-3'	290pb	HORNE et al. ²⁴
<i>papC</i>	5'-TGATATCACGCAGTCAGTAGC-3' 5'-CCGGCCATATTCACATAA-3'	205pb	SIEK et al. ²⁵
<i>eae</i>	5'-AAACAGGTGAACTGTTGCC-3' 5'-CTCTGCAGATTAACCTCTGC-3'	454pb	YU et al. ²⁶

As reações de PCR foram efetuadas no termociclador *Mastercycler Personal Eppendorf®* seguindo os protocolos de preparação do mix de reagentes e programas descritos pelos autores de cada par de *primers* (Anexo B).

Para os genes *iss* e *tsh*, após desnaturação inicial de 94°C/3min, foi realizada amplificação por 25 ciclos de 94°C/30s (desnaturação), 58°C/30s (anelamento), 68°C/30s (extensão) e finalizada com 72°C/10min¹⁴.

Para o gene *traT*, após desnaturação inicial de 95°C/12min, foi realizada amplificação por 25 ciclos de 94°C/30s (desnaturação), 58°C/30s (anelamento), 68°C/3min (extensão) e finalizada com 72°C/10min²⁴.

Para o gene *papC*, após desnaturação inicial de 94°C/5min, foi realizada amplificação por 30 ciclos repetidos de 94°C/30seg (anelamento), 58°C/30seg (extensão) e 72°C/2min (desnaturação). A programação era finalizada com 2min. a 72°C para maximizar o processo de extensão²⁵.

Para o gene *eae*, após desnaturação inicial de 94°C/2min, foi realizada amplificação por 30 ciclos de 53°C/2min (desnaturação), 72°C/2min (anelamento), 94°C/1min (extensão) e finalizada com 72°C/2min²⁶.

Como controles positivos para as reações da PCR, foram utilizadas cepas de DNA de referência de *E. coli* cedidas pela professora Dr.^a Terezinha Knöbl do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. Como controle negativo, o volume referente à amostra foi substituído por água ultrapura (*Dnase/Rnase- Free Distilled Water-Invitrogen*).

Os resultados foram obtidos após a corrida dos amplificadores por eletroforese em gel de Agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X, a 90 V, durante aproximadamente 40 minutos, corados com brometo de etídio na concentração de 3µg/mL, durante 15 minutos e visualização sob luz ultravioleta em transiluminador.

2.6. Análise estatística

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 423 amostras analisadas houve isolamento de *E. coli* de 9,7% (41/423). Desse total, em 141 amostras de cada categoria, houve isolamento de *E. coli* de 12% (17/141) nas excretas, 8,5% (12/141) na ração e 8,5% (12/141) em suabes de bebedouro.

O isolamento de *E. coli* nas excretas por si só não representa um sinal de distúrbio entérico ou de doença no animal, visto que as aves se encontravam aparentemente saudáveis. Este achado condiz com os relatos de alguns autores, ao afirmarem que *E. coli* pode ser detectada em aves clinicamente saudáveis, sendo consideradas apenas como bactéria oportunista e que gera doença clínica apenas em aves imunossuprimidas, submetidas a altas cargas de estresse, ou que já estejam debilitadas por outros fatores^{27,28}. Por outro lado, Corrêa et al.⁵ afirmaram que *E. coli* apresenta elevado potencial patogênico e a sua presença é indicativa de problemas de manejo.

Durante a realização das coletas, foi observada em alguns estabelecimentos falta de higiene em relação aos recipientes onde eram fornecidos água e alimento, em que era comum encontrar excretas nos mesmos. Uma hipótese para a detecção de *E. coli* em amostras oriundas de aves aparentemente saudáveis se deve ao fato dessas aves criadas em revendas serem passíveis de estresse crônico, que pode ser constatado pelas condições encontradas na maioria dos estabelecimentos visitados, em que havia uma elevada quantidade de aves por gaiola, proximidade das gaiolas com animais de outras espécies e manipulação frequente das aves²⁹.

Tais eventos possivelmente podem contribuir para a contaminação das aves, como relatou Taormina³⁰, ao descrever que recipientes abertos podem ser facilmente contaminados por microrganismos externos e pelas fezes das próprias ou por fragmentos de alimentos, ou ainda durante banhos. Além disso, as aves regurgitam pequenas quantidades de água de volta no recipiente e caso não seja feita uma limpeza periódica dos mesmos, pode ocorrer a formação de biofilmes. O fornecimento de frutas e legumes em algumas lojas também foi observado, sendo tais alimentos também relatados como possíveis fontes de contaminação³⁰.

De acordo com relatos de Godoy³¹, o isolamento de *E. coli* é mais frequente em psitacídeos mantidos em locais com grande número de indivíduos, nos quais há uma maior dispersão da bactéria pela contaminação fecal da água, do alimento disponível e do ambiente onde essas aves vivem, fato que foi constatado neste estudo, pois *E. coli* foi isolada tanto em bebedouros quanto em rações.

As condições em que as aves são alojadas nos estabelecimentos estão diretamente relacionadas ao isolamento de *E. coli* nas amostras coletadas, como relatado em uma estudo realizado por Xenoulis et al.³², que compararam a microbiota entérica de psitacídeos de vida livre e de cativeiro através de técnicas moleculares e relataram um isolamento significativamente maior nos psitacídeos mantidos em cativeiro, atribuindo tal resultado às condições do ambiente de cativeiro, além da dieta e do possível uso de antimicrobianos. Em trabalho similar, Bowman & Jacobson³³ avaliaram oito espécies de psitacídeos adultos, clinicamente saudáveis e apesar de relatarem uma baixa porcentagem de isolamento de bactérias Gram-negativas, isolaram *E. coli* com maior frequência.

Na determinação do perfil de suscetibilidade dos isolados de *E. coli* das amostras de excretas, ração e suabes de bebedouros de psitacídeos se constatou uma maior resistência em ambas amostras frente a sulfonamida e a neomicina. Dentre os isolados provenientes de suabes de bebedouro, todos foram resistentes a sulfonamida (12/12). Nos isolados provenientes de ração e excretas, não houve resistência a ciprofloxacina (Figura 1).

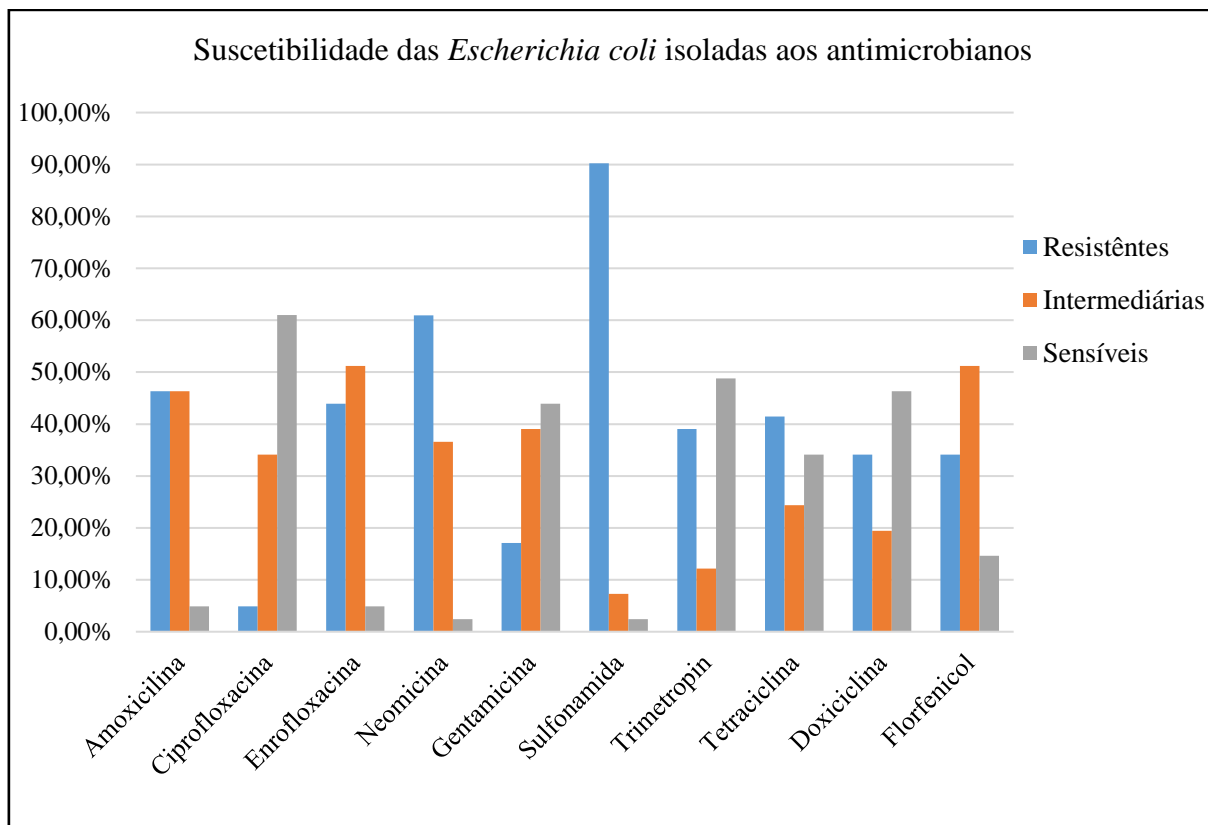


FIGURA 1 - Resultados de testes de suscetibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras provenientes de gaiolas de psitacídeos de revendas da região metropolitana de Goiânia – GO, frente aos antimicrobianos testados.

O uso de antimicrobianos nos psitacídeos dos estabelecimentos em que foram realizadas as coletas não era comum, no entanto alguns proprietários relataram a sua utilização em aves de outras espécies, como em pintinhos que eram alojados em gaiolas próximas as dos psitacídeos. Dentre os antimicrobianos relatados, a sulfonamida era a mais utilizada. Apesar de não terem sido administrados diretamente aos psitacídeos, o fato de tais aves serem manipuladas e terem contato com os mesmos tratadores, ou mesmo por estarem em gaiolas próximas, pode propiciar a veiculação de microrganismos resistentes entre as mesmas²¹.

Em trabalho envolvendo a análise de psitaciformes obtidos do tráfico ilegal, Lopes et al.¹⁹ também encontraram altos níveis de resistência aos antimicrobianos testados, sendo a sulfonamida uma das que apresentaram maiores níveis de resistência, juntamente com azitromicina, ampicilina e tetraciclina. Os autores sugerem que tais níveis podem ser uma consequência do uso frequente desses antimicrobianos na medicina humana e veterinária. Também Guardabassi e Prescott³⁴ associaram os altos níveis de resistência bacteriana atuais ao uso prolongado dos antimicrobianos, sendo que alguns foram criados a mais de sete décadas e utilizados na medicina humana desde então, contribuindo para a seleção de cepas resistentes ao

longo do tempo, sendo assim menos eficazes quando utilizadas, mesmo em animais que nunca tiveram contato com tais drogas³⁵.

Nos 41 isolados de *E. coli* das amostras obtidas de gaiolas de psitacídeos, foi encontrada multirresistência (resistência a quatro ou mais antimicrobianos) em 20 amostras, sendo sete de excretas (7/17), cinco de ração (5/12), e oito de suabe de bebedouro (8/12). Um dos isolados de suabe de bebedouro apresentou resistência a todos antimicrobianos (Tabela 4).

TABELA 4 - Distribuição dos padrões de resistência aos 10 antimicrobianos testados em cepas de *Escherichia coli* isoladas em amostras provenientes de gaiolas de psitacídeos em casas de vendas da região metropolitana de Goiânia – GO.

Classificação da resistência	Números padrões de resistência	%
Simple	1	7,9
Dupla	2	18,4
Tripla	3	21,1
Múltipla	4 ou mais	52,6

Perfil de resistência	Padrões de resistência	Número de cepas
Múltipla	AMO CIP ENR NEO GEN SUL TRI TET DOX FLF	1
Múltipla	AMO ENR NEO GEN SUL TRI TET DOX FLF	1
Múltipla	AMO ENR NEO SUL TRI TET DOX FLF	3
Múltipla	AMO ENR GEN SUL TRI TET DOX FLF	1
Múltipla	ENR NEO SUL TRI TET DOX FLF	2
Múltipla	AMO ENR GEN SUL TET DOX FLF	1
Múltipla	ENR NEO GEN SUL TRI FLF	1
Múltipla	ENR NEO SUL TRI TET DOX	1
Múltipla	ENR NEO GEN SUL TRI TET	1
Múltipla	AMO ENR SUL TRI TET DOX	1
Múltipla	AMO NEO SUL TRI TET DOX	1
Múltipla	AMO CIP GEN SUL FLF	1
Múltipla	AMO ENR NEO SUL FLF	1
Múltipla	NEO SUL TRI TET DOX	1
Múltipla	ENR SUL TRI TET	1

TABELA 4 - Distribuição dos padrões de resistência aos 10 antimicrobianos testados em cepas de *Escherichia coli* isoladas em amostras provenientes de gaiolas de psitacídeos em casas de revendas da região metropolitana de Goiânia – GO (Continuação).

Perfil de resistência	Padrões de resistência	Número de cepas
Múltipla	AMO NEO SUL FLF	1
Múltipla	AMO NEO TET DOX	1
Tripla	ENR NEO SUL	1
Tripla	NEO SUL FLF	1
Tripla	SUL TRI TET	1
Tripla	AMO NEO SUL	5
Dupla	NEO SUL	3
Dupla	ENR SUL	2
Dupla	AMO SUL	2
Simples	SUL	3

AMO – amoxicilina, CIP – ciprofloxacina, ENR – enrofloxacina, NEO – neomicina, GEN – gentamicina, SUL – sulfonamida, TRI – trimetropin, TET – tetraciclina, DOX – doxiciclina, FLF – florfenicol.

A obtenção de resultados elevados de resistência e multirresistência aos antimicrobianos mais utilizados nas linhas humana e veterinária evidenciam o problema que o uso frequente de antimicrobianos vem gerando, uma vez que esta resistência é resultado da interação entre agentes antimicrobianos, microrganismos e meio ambiente³⁶. Com o aumento desta interação, as bactérias desenvolveram mecanismos de defesa contra essas medicações, acarretando um aumento da resistência antimicrobiana³⁷. A situação se agrava ainda mais, se levarmos em consideração o menor número de classes terapêuticas desenvolvidas nos últimos anos e a rápida resposta dos microrganismos frente a tais medicações, com o rápido desenvolvimento de resistência aos mesmos³⁸.

Quanto aos genes de virulência, detectaram-se três isolados de *E. coli* com o gene *iss* (7,3%), sendo dois provenientes de amostras de excretas e um de ração. Três isolados com o gene *tsh* (7,3%), sendo dois oriundos de ração e um de excretas. Dentre estes isolados, um proveniente de excretas apresentou os dois genes (*tsh* e *iss*). Também foi encontrado o gene *papC* em dois isolados, sendo um de uma amostra de suabe de bebedouro e o outro em uma amostra de excretas. Os genes *traT* e *eae* não foram encontrados em nenhum isolado (Tabela

5). Todos os isolados positivos para os genes em estudo foram encontrados em amostras de gaiolas com periquitos australianos, contendo duas ou mais aves.

TABELA 5 – Distribuição dos genes *iss*, *tsh*, *papC*, *traT* e *eae* em cepas de *Escherichia coli* isolados de psitacídeos de revendas da região metropolitana de Goiânia - Goiás.

Genes	Nº de amostras	Amostras positivas	Origem dos isolados	%	Proporção
<i>iss</i>	41	3	Suabes de bebedouro Excretas	7,3	3/41
<i>tsh</i>	41	3	Ração Excretas	7,3	3/41
<i>papC</i>	41	2	Suabes de bebedouro Excretas	4,9	2/41
<i>iss + tsh</i> *	41	1	Excretas	2,4	1/41
<i>traT</i>	41	0	-	0	0/41
<i>eae</i>	41	0	-	0	0/41

* Em uma amostra de excreta o isolado apresentou os genes *iss* e *tsh*.

Apesar do gene *iss* ter sido encontrado em três dos isolados, Silveira et al.³⁹ relataram que somente a detecção do plasmídeo contendo o gene *iss* não é suficiente para caracterizar uma cepa de *E. coli* como patogênica, porém este gene pode ser considerado como marcador de virulência, uma vez que ele é considerado o mais prevalente em cepas de isolados de aves doentes⁴⁰. Este gene está localizado em plasmídeos de grandes dimensões e podem por sua vez carrear simultaneamente fatores de virulência e resistência a antimicrobianos⁴¹. Além disso, o gene *iss* pode servir como marcador de virulência de cepas patogênicas nas aves, uma vez que sua expressão está frequentemente relacionada a seus efeitos patogênicos^{42,43}.

Alguns trabalhos sugerem que a presença do gene *iss* também pode ser associada a altos níveis de resistência, assim como os obtidos no estudo. Johnson et al.⁴¹ localizaram em uma cepa de *E. coli* do patótipo APEC, um plasmídeo que codificava simultaneamente o gene *iss* e a resistência a oito grupos de agentes antimicrobianos (tetraciclina, sulfonamidas, aminoglicosídeos, trimetoprim e agentes beta-lactâmicos). Em trabalho semelhante, Yang et al.⁴⁴ avaliaram 71 isolados de *E. coli* provenientes de galinhas, relatando que dentre os isolados que apresentaram resistência à múltiplos antimicrobianos, 97% portava o gene *iss*.

O gene *tsh* também foi detectado em três dos isolados de *E. coli* e, por sua vez, é um gene comumente detectado em APEC e tem como função a síntese de proteínas termo-sensíveis, com habilidade de hemaglutinação⁸. Ele codifica a produção de uma proteína auto-

transportadora, que está relacionada a mecanismos de aderência ao trato respiratório⁴⁵ e é frequentemente descrito como importante fator de patogenicidade na colibacilose⁴⁶. Dentre os isolados obtidos, o gene *tsh* foi encontrado em *E. coli* de uma amostra de ração e de excretas provenientes de uma mesma gaiola. Tal resultado aponta a possibilidade das aves infectadas por *E. coli* disseminarem o microrganismo contendo genes de virulência, que ao contaminarem a própria ração, infectam as demais aves da mesma gaiola.

A associação dos genes *iss* e *tsh*, detectada em um dos isolados, foi descrita por Costa et. al.⁴⁷, ao relatarem que, juntamente com outros genes de virulência, eles são frequentemente encontrados em amostras patogênicas e potencialmente patogênicas em aves domésticas e silvestres. Já Bonnet et al.⁴⁸ realizaram um estudo em que evidenciaram menor frequência de genes de virulência, como *tsh* e *iss*, em isolados de *E. coli* comensais. Tal fato pode corroborar com os achados do presente estudo, uma vez que as aves se apresentavam aparentemente saudáveis no momento das coletas, sendo as *E. coli* isoladas provavelmente comensais nesses animais.

O gene *PapC*, que foi encontrado em dois dos isolados, é um dos genes que codifica a fímbria P, sendo essa, uma das adesinas mais frequentes de cepas de *E. coli*. No entanto, de acordo com alguns autores, sua detecção não pode ser utilizada para classificação e identificação de cepas APEC, uma vez que ele também pode ser encontrado em cepas de *E. coli* não patogênicas. Mohamed et al.⁴⁹ evidenciaram tal afirmação em seu estudo com frangos de corte aparentemente saudáveis e doentes, em que detectaram o gene *papC* tanto em *E. coli* não patogênicas (57,1%) quanto em APEC (44,4%).

O gene *traT* não foi encontrado nos isolados. Este gene por sua vez, é frequentemente relacionado a resistência aos efeitos nocivos do soro às bactérias. Assim como o gene *iss*, ele é considerado um gene determinante para a resistência sérica. No presente estudo não foi encontrada associação dos mesmos, mas trabalhos mostram que quando associados, eles tornam as cepas APEC mais resistentes aos efeitos bactericidas do sistema complemento e à fagocitose, e geralmente são detectadas em cepas envolvidas em processos septicêmicos¹⁶.

O gene *eae* também não foi identificado nos isolados obtidos. Ele é responsável por um dos mecanismos de virulência que caracterizam as cepas de *E. coli* diarreiogênicas⁵⁰, sendo frequentemente relacionado a patótipos causadores de diarreias graves em humanos nos países em desenvolvimento⁵¹. A ausência deste gene nos isolados condiz com o fato de que as aves durante a coleta de material apresentavam-se aparentemente saudáveis, sem quadros de diarreia nas gaiolas.

Apesar da baixa frequência, os genes de virulência e resistência sérica encontrados nas cepas de *E. coli* isoladas no estudo podem ser transmitidas para outras espécies e para humanos através do contato direto, ou em ambientes contaminados, o que pode favorecer o surgimento de cepas patogênicas e resistentes, gerando quadros graves de infecções bacterianas com opções medicamentosas cada vez mais limitadas⁵².

4. CONCLUSÃO

Escherichia coli isoladas de amostras obtidas de gaiolas de psitacídeos alojados em estabelecimentos de revendas em Goiânia e região metropolitana possuem uma grande resistência aos antimicrobianos mais utilizados na atualidade, principalmente sulfonamidas e neomicina, além de possuir genes de virulência e resistência sérica, que evidenciam a possibilidade destas aves serem carreadoras de cepas patogênicas.

REFERÊNCIAS

1. Gondim LSQ; Gomes DM; Maia PCC. Casuística de aves selvagens atendidas de 2002 a 2004 na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. 26º Congresso Brasileiro de Zoologia; Londrina, Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2006. p.86-87.
2. Grahan CL, Grahan DL. Occurrence of *Escherichia coli* in feces of Psittacine birds. Avian Dis 1978; 22: 717-20.
3. Flammer K, Drewes LA. Species related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. Avian Dis 1988; 32: 79-83.
4. Mattes BR, Consiglio SAS, Almeida BZ, Guido MC, Orsi RB, Silva RM, Costa A, Ferreira AJP, Knöbl T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. Arq do Inst Bio. 2005; 72: 13-16.
5. Corrêa IMO, Flores F, Schneiders GH, Pereira LQ, Brito BG, Lovato M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. Pesq Vet Bras. 2013; 33(2):241-246.
6. Evans EE, Osborne JN, Jay P, Flammer K. Assessment of the microbial quality of water offered to captive psittacine birds. Jour of Avi Med and Surg. 2009; 23(1):10-17.
7. Chiacchio RMG, Cunha MPV, Sturn RM, Moreno LZ, Moreno AM, Pereira CBP, Martins FH, Franzolin MR, Piazza RMF, Knöbl T. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC):

- Zoonotic risks associated with psittacine pet birds in home environments. *Vet Micro.* 2016; 184: 27-30.
8. Gyles CI, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.* Ames: Blackwell Publishing. 2010; 267-308.
 9. Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL. *Veterinary Microbiology.* Wiley-Blackwell, Massachusetts. 2 ed; 2004:536.
 10. Saidenberg AB, Teixeira RHF, Guedes NMR, Allgayer MC, Melville PA, Benites NR. Molecular detection of enteropathogenic *Escherichia coli* in asymptomatic captive psittacines. *Pesq. Vet. Bras.* 2012; 32(9):922-926.
 11. Barros MR, Silveira WD, Araujo JM, Costa EP, Oliveira AAF, Santos APSF, Silva VAS, Mota RA. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. *Pesq Vet Bras.* 2012; 32(5):405-410.
 12. La Ragione RM, Woodward MJ. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res in Vet Sci.* 2002; 73: 27-35.
 13. Rocha ACGP, Silva AB, Brito BG, Moraes HLS, Pontes AP, Cé MC, Nascimento VP, Salle CTP. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Disease.* 2002; 46(3):749-753.
 14. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases.* 2005; 49(2): 269-273.
 15. Kuhnert P, Boerlin P, Frey J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. *Micro Rev.* 2000; 24:107-117.
 16. Almeida AMS, Leonídio ARA, Andrade MA. Associação dos quadros anatomopatológicos de colibacilose aviária com genes de virulência de *Escherichia coli*. *Vet em Foc.* 2017; 13(2): 113-131.
 17. Gilliver MA, Bennet M, Begon M, Hazel SMY, Hart CA. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nat.* 1999; 401-233.
 18. Haraken S, Yassine H, El-Fadel M. Antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. *Env Poll.* 2006; 143(2): 269-277.
 19. Lopes ES, Maciel WC, Albuquerque AH, Machado DN, Bezerra WGA, Vasconcelos RH, Lima BP, Gonçalves GAM, Teixeira RSC. Prevalence and antimicrobial resistance profile of enterobacteria isolated from psittaciformes of illegal wildlife trade. *Acta Scie Vet.* 2015; 43: 1313.

20. Oliveira KW, Gomes FCO, Morais PB. Ocorrência de *Escherichia coli* multirresistentes a antimicrobianos nas principais praias do reservatório de Lajeado – TO. *Eng Amb.* 2012;9(3): 338-351.
21. Machado DN, Lopes ES, Albuquerque AH, Bezerra WGA, Horn RV, Lima SVG, Siqueira RAS, Beleza AJF, Oliveira FR, Cardoso WM, Teixeira RSC. Detecção e avaliação do perfil de sensibilidade antimicrobiana de enterobactérias isoladas de periquitos cara-suja (*Pyrrhura griseipectus*) em cativeiro. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2016;68(6):1732-1736.
22. Oliveira SJ. Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária. 3a ed. Canoas: Ulbra; 2012. 260p.
23. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017.
24. Horne SM, Pfaff-McDonough SJ, Giddings CW, Nolan LK. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Disease.* 2000;44(1):179-84.
25. Siek KER, Giddings WC, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res.* 2005; 36:241-256.
26. Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microb.* 1992;6(3):411-417.
27. Cubas ZS, Godoy SN. Algumas doenças de aves ornamentais. 2004. [acesso 6 ago 2017]. Disponível em: <http://www.abma.com.br/2004/notes/207.pdf>.
28. Aguilar RF, Hernandez SM, Hernandez SJ. Medicina e patologia de aves de companhia. Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos. São Paulo. Interbook; 2006: 213-264.
29. Lopes ES, Maciel WC, Teixeira RSC, Albuquerque AH, Vasconcelos RH, Machado DN, Bezerra WGA, Santos ICL. Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittaciformes: relevância em saúde pública. *Anim Path.* 2016; 83:1-10.
30. Taormina PJ. Produce as a potential source of bacterial infections in exotic pets. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2000:636–646.
31. Godoy SN. Psittaciformes (arara, papagaio, periquito). In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), Tratado de Animais Selvagens. Roca, São Paulo. 2007; 222-251.
32. Xenoulis PG, Gray PL, Brightsmit D, Palculict B, Sharman H, Steiner JM, Tizard I, Suchodolski JS. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. *Vet Micro.* 2010;146:320-325.
33. Bowman TA; Jacobson ER. Cloacal flora of clinically normal captive psittacine birds. *The J Zoo Ani Med.* 1980; 11(3):81-85.
34. Guardabassi L, Prescott JF. Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2015; 45: 361-376.

35. Bezerra WGA, Horn RH, Silva ING, Teixeira RSC, Lopes ES, Albuquerque AH, Cardoso WC. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. Arch de Zoot. 2017; 254(66):301-307.
36. Rodrigues DP, Fonseca EL. Resistência antimicrobiana. Manual de procedimento para a determinação de suscetibilidade antimicrobiana em enterobactérias. FIOCRUZ, LRNCEB/LABENT. 2006.
37. Carmo G. Princípios e problemas do uso de antibióticos. Jornadas 30 anos de SNS. 2009. [acesso 12 mar 2017]. Disponível em: www.hsm.minsaude.pt/.../Uso%20de%20Antibióticos_Germano%20do%20ppt.
38. Faúla LL, Cerqueira MMOP, Magalhães PP. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e identificação de patotipos diarréiogênicos entre amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos. Rev Bras Ci Vet. 2017;24:108-115.
39. Silveira W.D, Fantinatti F, Castro AFP. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. Revta Bras. Genética. 1994; 17:9-14.
40. Delicato E.R., Brito B.G., Gaziri L.C.J. & Vidotto M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Vet. Microbiol. 2003; 94: 97-103.
41. Johnson TJ, Giddings CW, Horne SM, Gibbs PS, Wooley RE, Skyberg J, Olah P, Kercher R, Sherwood JS, Foley SL, Nolan LK. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. Avian Diseases 2012;46(2):342-352.
42. Nolan LK, Giddings CW, Horne SM, Doetkott C, Gibbs PS, Wooley RE, Foley SL. 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. 2002;46(2):386-392.
43. Gibbs PS, Maurer JJ, Nolan LK, Wooley E. Prediction of chicken embryo lethality with the avian *Escherichia coli* straits complement resistance, colic in V production, and presence of increased serum survival gene cluster (*iss*). Avian Diseases. 2003;47(2):370-379.
44. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J. Clin. Microbiol. 2004;42(8):3483-3489.
45. Dozois CM, Dho-Moulin M, Bree A, Fairbrother JM, Curtiss R. Relationship between the *tsh* autotransportes and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. Infection and Immunity. 2000;68(7):4145-4154.

46. Provence DL, Curtiss R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*. 1994;62(4):1369-1380.
47. Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Coelho AC, Matos M, Rojo-Bezares B, Rodrigues J, Torres C. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. *Micro Drug Resist*. 2008;14(1):71-77.
48. Bonnet C, Diarrassouba F, Brousseau R, Masson L, Topp E, Diarra MS. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *App and env microb*. 2009;75(22):6955-6962.
49. Mohamed MA, Shehata MA, Rafeek E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from broiler chicken. *Vet Med Int*. 2014;1:1-6.
50. Persson S, Olsen K, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Europ Jour of Clin Microb & Infec Dis*. 2007;13:516–524.
51. Costa ARF, Lima KVB, Sousa CO, Loureiro ECB. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicas. *Rev Pan-Amazônica de Saúde*. 2010;1(2)77-84.
52. Ajiboye RM, Solberg OD, Lee BM, Raphael E, Debroy C, Riley LW. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clin Infec Disea*. 2009; 49:365-371.

CAPÍTULO 3 - PESQUISA DE *Salmonella* sp. EM AMOSTRAS DE GAIOLAS DE PSITACÍDEOS DE CASAS DE REVENDA NA REGIÃO METROPOLITANA DE GOIÂNIA – GOIÁS

RESUMO

Bactérias do gênero *Salmonella* estão frequentemente relacionadas a infecções em humanos e animais sendo as aves silvestres suas potenciais carreadoras. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar *Salmonella* em amostras coletadas em gaiolas de psitacídeos de estabelecimentos de revendas em Goiânia e região metropolitana, através das técnicas de microbiologia convencional. Nas 423 amostras obtidas de psitacídeos, sendo 141 amostras de excretas, 141 de ração e 141 de suabes de bebedouro, não houve isolamento de *Salmonella* por microbiologia convencional em nenhuma das amostras. Os resultados obtidos mostram a necessidade de maiores pesquisas através de diferentes técnicas para monitoramento de possíveis infecções por *Salmonella* em psitacídeos de estabelecimentos de revenda.

Palavras chave: aves silvestres, microbiologia convencional, revenda de aves, salmonelose.

CHAPTER 3 – *Salmonella* sp. SEARCH IN SAMPLES OF PSITTACINE CAGES OF RESELLING HOUSES IN THE METROPOLITAN REGION OF GOIÂNIA - GOIÁS

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Salmonella* are often related to infections in humans and animals being wild birds their carrier powers. The present study was developed with the objective of investigate *Salmonella* in samples collected in psittacine cages from retail establishments in Goiânia and metropolitan region, using conventional microbiology techniques. Of the 423 samples obtained from psittacids, 141 of which were excreta, 141 of feed and 141 of drinkers' swabs, there was no isolation of *Salmonella* by conventional microbiology in any of the samples. The results show a need for further research using different techniques for monitoring possible *Salmonella* infections in psittacines of resale establishment.

Keywords: conventional microbiology, poultry resale, salmonellosis, wild birds.

1. INTRODUÇÃO

As aves são consideradas os principais reservatórios de *Salmonella* na natureza¹. Dentre elas, aves de vida livre são potenciais carreadoras de patógenos para os demais animais criados em cativeiro e em ambientes domésticos. Porém, a frequência de *Salmonella* em aves silvestres criadas em cativeiro é relativamente baixa quando comparada às outras espécies, como répteis e mamíferos².

Salmonella Gallinarum gera quadros de infecção principalmente em frangos e perus de todas idades, no entanto a doença já foi descrita em diferentes espécies como patos, codornas, pombos, faisões, pavões e canários. Recentemente, foi relatado um surto de *Salmonella Gallinarum* envolvendo periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), demonstrando a importância deste sorotipo em psitacídeos³.

Em aves silvestres o sorotipo mais isolado é *Salmonella Typhimurium*⁴. Esse sorotipo é frequentemente isolado em psitacídeos e, de acordo com Vigo et al.⁵, pode se manifestar como um patógeno primário ou gerar infecções subclínicas em aves jovens ou debilitadas. Além disso, ele é frequentemente associado a casos de zoonoses envolvendo aves silvestres, principalmente relacionados aos psitacídeos. Em um estudo de caso, Ward et al.⁶ relataram o isolamento do sorotipo em um surto de salmonelose em psitacídeos ocorrido logo após uma exposição de animais realizada em um zoológico, com taxa de letalidade de 22%. Thornley et al.⁷ investigaram um surto na Nova Zelândia em que 119 pessoas foram diagnosticadas com salmonelose causada pelo sorotipo Typhimurium e verificaram que 10,9% dos indivíduos infectados tiveram contato com aves silvestres mortas.

Aves clinicamente saudáveis podem ser portadoras de *Salmonella*, que pode ficar alojada em macrófagos de vísceras como fígado e baço e serem eliminadas nas fezes quando as aves estiverem imunossuprimidas ou sob condições de estresse, o que torna possível a ocorrência de resultados falsos-negativos nas análises microbiológicas⁸. Este fato aponta a importância da realização de estudos e maiores informações com relação a *Salmonella* em animais silvestres e domésticos, a fim de identificar os possíveis reservatórios e elaborar medidas de prevenção e controle⁹. Aves comercializadas como *pets*, destinadas a programas de soltura e reintrodução no ambiente natural, ou mesmo aves de produção devem ser avaliadas continuamente quanto à presença do microrganismo, a fim de evitar a transmissão da bactéria ao homem e para demais animais com os quais possam ter contato¹⁰.

Apesar de relatos, acredita-se que as aves silvestres não exerçam um papel importante na epidemiologia da salmonelose humana, no entanto, quando um grande número

de aves está confinado em um mesmo local, como em criadouros comerciais, elas podem representar um potencial risco para a saúde do ser humano e de demais animais¹¹.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo isolar *Salmonella* sp. em amostras de excretas, ração e suabes de bebedouro provenientes de psitacídeos de estabelecimentos de revenda em Goiânia e região metropolitana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O presente estudo foi realizado nos laboratórios de Bacteriologia e de Diagnóstico Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo nº 058/17.

2.2. Coletas das amostras

Dentre as 80 lojas de vendas de aves que continham psitacídeos, cadastradas na AGRODEFESA, foram selecionados por conveniência 50 estabelecimentos distribuídos em 10 municípios para a coleta das amostras, como especificado na Tabela 1.

TABELA 1 – Número de lojas de vendas de aves por município, da região metropolitana de Goiânia - Goiás, em que foram realizadas coletas de amostras de gaiolas de psitacídeos.

Municípios	Número de lojas
Goiânia	23
Senador Canedo	8
Aparecida de Goiânia	5
Trindade	4
Inhumas	3
Bela Vista	2
Teresópolis	2
Hidrolândia	1
Goianápolis	1
Goianira	1
Total	50

As gaiolas dos psitacídeos foram selecionadas de forma aleatória em cada estabelecimento de acordo com o número total de gaiolas de psitacídeos, onde coletaram-se excretas, ração e suabes de bebedouro (Tabela 2).

TABELA 2 – Número de gaiolas selecionadas aleatoriamente de acordo com a quantidade total por estabelecimento.

Número de gaiolas por estabelecimento	Número de gaiolas a serem coletadas
1 - 2	1
3 - 5	3
5 - 7	5
8 - 10	8
11 ou mais	11

Foi coletado aproximadamente 1,0 g de excretas, por meio de espátulas esterilizadas, em cinco pontos diferentes das bandejas, formando assim um *pool*, que constituiu uma amostra. Em relação ao alimento disponibilizado para as aves, foram coletados dos comedouros 2,5 g de cinco pontos diferentes, e acondicionados em tubos esterilizados, da mesma forma que as amostras anteriores. As coletas nos bebedouros foram realizadas por três suabes que foram esfregados em toda a extensão dos mesmos e acondicionados em tubos de polipropileno, os quais constituíram uma amostra.

Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas, identificadas e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável ao laboratório para processamento. Ao final das coletas nos 50 estabelecimentos obteve-se a soma de 423 amostras, sendo 141 de excretas, 141 de ração e 141 de suabes de bebedouro.

Durante a realização do estudo foram coletadas amostras em um total de 141 gaiolas e identificadas oito espécies diferentes de psitacídeos, das quais 48,2% (68/141) eram de periquitos australianos, 33,4% (47/141) de calopsitas e 14,2% (20/141) de agapornis. Além de gaiolas dessas espécies, também foram identificadas 1,4% (2/141) de *Bourke* rosa, 0,7% (1/141) de *Red Humped* e iguais percentuais de *Turquoise*, papagaio verdadeiro e Araracanga. (Tabela 3).

TABELA 3 – Relação entre espécies identificadas e quantidade de gaiolas em que foram coletadas amostras de excretas, ração e suabes de bebedouro nas revendas da região metropolitana de Goiânia - GO.

Espécies	Número de gaiolas	%
Periquito australiano	68	48,2
Calopsita	47	33,3
Agapornis	20	14,2
<i>Bourke</i> rosa	2	1,42
<i>Red Humped</i>	1	0,7
<i>Turquoise</i>	1	0,7
Papagaio verdadeiro	1	0,7
Araracanga	1	0,7
Total de gaiolas	141	100

2.3. Pesquisa de *Salmonella*

As amostras de suabes de bebedouro e ração foram inoculadas em água peptonada tamponada a 1%, na proporção de 1:10, e incubadas a 37°C/ 18-24h. Posteriormente, foi transferido 1 mL do inóculo para 9 mL de caldo selenito cistina (CS) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis que foram incubados a 37°C/ 18-24h. Já as amostras de excretas foram pesadas e colocadas em caldo CS e incubados a 37 °C/ 18-24h.

Em sequência, alíquotas dos caldos de CS e Rappaport Vassiliadis foram estriadas nos ágar MacConkey e verde brilhante (VB) e incubados a 37°C/ 18h. De cada meio seletivo foram transferidas três unidades formadoras de colônias (UFC) com características morfológicas de *Salmonella* para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37°C/ 24h. Após esse período, os tubos de TSI com crescimento característicos de *Salmonella* foram selecionados e submetidos a provas de produção de urease, prova de indol, produção de H₂S, prova do vermelho de metila, prova de motilidade, citrato de Simmons, malonato e prova de lisina descarboxilase.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um total de 423 amostras coletadas, provenientes de gaiolas de psitacídeos localizados em estabelecimentos de revenda, sendo 141 amostras excretas, 141 de ração e 141 de suabes de bebedouro, não houve isolamento de *Salmonella*.

A ausência de *Salmonella* pela bacteriologia convencional condiz com o trabalho de Corrêa¹, em que não se isolou nenhuma amostra de *Salmonella* em amostras de psitacídeos de cativeiro. Em trabalho semelhante, Hidasi et al.¹² isolaram apenas uma amostra positiva para *Salmonella* Typhimurium de um total de 508 amostras provenientes de psitacídeos recuperados do tráfico, evidenciando a baixa frequência desse microrganismo em aves dessa espécie.

Outros trabalhos científicos também demonstraram casos negativos ou com baixa frequência de isolamento de *Salmonella* sp. em psitacídeos. Sareyyüpoğlu et al.¹³ analisaram 185 amostras de sete criatórios que continham periquitos australianos, canários e outras espécies de aves. Apesar de terem isolado *Salmonella* em quatro espécies de aves, dentre as 27 amostras de fezes obtidas dos periquitos australianos não houve isolamento nesta espécie.

Também Dlugzs et al.⁸, em estudo realizado em criatórios comerciais de psitacídeos, que se encontravam clinicamente saudáveis, não isolaram *Salmonella* por meio da técnica microbiológica convencional. Entretanto, eles afirmaram que tais resultados não

confirmam que as aves não estejam infectadas pelo agente, destacando a necessidade de realização de técnicas mais apuradas para confirmar a ausência do microrganismo nas aves.

Bezerra et al.¹⁴ analisaram 264 amostras de suabes de arrasto e suabes cloacais de periquitos australianos comercializados em *pet shops* e criadouros, nas quais não foi isolado *Salmonella* sp. pela metodologia utilizada. Tais autores justificaram a ausência do microrganismo pela possível utilização de antimicrobianos nas aves, no entanto, também consideraram as medidas sanitárias adotadas pelos criadores, como a limpeza frequente do ambiente, gaiolas, bebedouro e comedouro, assim como o fornecimento de água tratada e troca da ração.

Apesar do controle sanitário ser de extrema e fundamental importância para a baixa prevalência de *Salmonella* em aves silvestres e demais animais de cativeiro, outros fatores podem estar relacionados a tais resultados, como a possibilidade de excreção intermitente desse microrganismo nas fezes por aves portadoras aparentemente saudáveis, de acordo com as condições em que se encontram¹². Tal fato pode prejudicar a identificação deste patógeno por meio de provas microbiológicas convencionais, uma vez que a bactéria pode não estar sendo eliminada durante o período de coleta das excretas³.

Lopes et al.¹⁵ investigaram 182 psitacídeos clinicamente saudáveis de criatórios comerciais e conservacionistas da Região Metropolitana de Fortaleza, dos quais isolaram *Salmonella* em apenas três aves. Os pesquisadores concluíram que o fato do microrganismo ter sido pouco isolado nas aves não exclui a possibilidade de outras aves estarem infectadas, justificando a importância de um monitoramento e mais pesquisas a cerca deste patógeno nas aves.

Apesar da baixa ocorrência de *Salmonella* em psitacídeos, esse microrganismo ocasionalmente é relacionado a surtos¹, portanto, é importante que sejam realizadas contínuas pesquisas deste microrganismo em psitacídeos, mesmo havendo baixa prevalência, pois uma vez instalada, a doença pode gerar sinais clínicos severos e letalidade elevada. Também é importante a obtenção de dados sobre a ocorrência e distribuição de *Salmonella* em animais silvestres e domésticos para monitoramento e detecção de reservatórios do microrganismo e possíveis fontes de contaminação, a fim de evitar surtos da doença² (ALLGAYER et al., 2009).

4. CONCLUSÃO

Salmonella sp. não foi isolada pela bacteriologia convencional em amostras de gaiolas de psitacídeos de estabelecimentos comerciais em Goiânia e região metropolitana.

REFERÊNCIAS

1. Corrêa IMO, Flores F, Schneiders GH, Pereira LQ, Brito BG, Lovato M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. Pesq Vet Bras. 2013; 33(2):241-246.
2. Allgayer MC, Oliveira SJ, Mottin VD, Loiko MR, Fernanda Abilleira F, Guedes NMR, Passos DT, Weimer TA. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). Cien Ru. 2009.
3. Lopes ES, Maciel WC, Teixeira RSC, Albuquerque AH, Vasconcelos RH, Machado DN, Bezerra WGA, Santos ICL. Isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* de psittacíformes: relevância em saúde pública. Anim Path. 2016; 83:1-10.
4. Lopes ES, Maciel WC, Albuquerque AH, Machado DN, Bezerra WGA, Vasconcelos RH, Lima BP, Gonçalves GAM, Teixeira RSC. Prevalence and antimicrobial resistance profile of enterobacteria isolated from psittacíformes of illegal wildlife trade. Acta Scie Vet. 2015; 43: 1313.
5. Vigo GB, Origlia J, Gornatti D, Piscopo M, Salve A, Caffer MI, Pichel M, Binsztein N, Leotta GA. Isolation of *Salmonella* Typhimurium from dead blue and gold macaws (*Araararauna*). Avian Dis. 2009;53: 135-138.
6. Ward MP, Ramer JC, Proudfoot J, Garner MM, Juan-Sallés C, Wu CC. Outbreak of Salmonellosis in a zoologic collection of Lorikeets and Lories (*Trichoglossus*, *Lorius*, and *Eos* spp.). Avian Dis. 2003; 47:493-498.
7. Thornley CN, Simmons GC, Callaghan ML, Nicol CM, Baker MG, Gilmore KS, Garret NKG. First incursion of *Salmonella* Typhimurium DT 160 into New Zealand. Emerg Infec Dis. 2003;9(4):493-495.
8. Dlugosz AP, Santin E, Hayashi RM, Lourenço MC, Silva AB. Prevalência de *Salmonella* sp. em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) mantidas em cativeiro comercial. Arch Vet Sci. 2015; 20(2): 155-160.
9. Allgayer MC. Molecular diagnosis of *Salmonella* species in captive psittacine birds. Vet Rec. 2008;162(25):816-819.
10. Cubas SZ. Natural diseases of free-ranging birds in South America. In: FOWLER ME. Zoo e wild animal medicine: current therapy. Philadelphia: Saunders. 1993;166- 172.
11. Vaz AN, Armando AP, Ribeiro AR, Zancan FT, Brisola ML. Pesquisa de *Salmonella* em mutuns (*Mitu mitu*) mantidos em cativeiro. Cienc Anim Bras. 2015;16:68-72.
12. Hidasi HW, Hidasi Neto J, Moraes DMC, Linhares GFC, Jayme VS, Andrade MA. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. Jour of Zoo and Wild Med. 2013; 44: 9-12.

13. Sareyyüpoğlu B, Çelik OK, Cantekin Z, Yardimci AH, Akan M, Akçay A. Polymerase chain reaction detection of *Salmonella* spp. in fecal samples of pet birds. *Avian Dis.* 2008;52:163-167.
14. Bezerra WGA, Cardoso W, Teixeira RSC, Horn RV, Machado DN, Lopes ES, Albuquerque AH, Rocha-Silva RC. Survey of *Salmonella* spp. in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in Fortaleza, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae* 2013;41:1-7.
15. Lopes ES, Cardoso WM, Albuquerque AH, Teixeira RSC, Salles RPR, Bezerra WGA, Rocha-Silva RC, Lima SVG, Sales RJPF, Vasconcelos RH. Isolation of *Salmonella* spp. in captive psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil *Arq Bras de Med Vet e Zoot.* 2014;66(3):965-968.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aproximação dos seres humanos com as aves silvestres é um fato cada vez mais frequente nos dias atuais. Em estabelecimentos comerciais que revendem aves vivas são facilmente encontradas aves da família *Psittacidae*, porém ainda não existe um controle satisfatório com relação a origem destas aves e as condições sanitárias em que as mesmas se encontram ao chegarem nesses estabelecimentos. Com isso, ao adquirir tais aves, o proprietário não tem conhecimento sobre o possível risco zoonótico que elas podem representar.

A realização de pesquisas relacionadas a microbiota presente nos psitacídeos e sua relevância com relação à transmissão de patógenos para seres humanos e demais espécies de animais são de fundamental importância, para que sejam definidos padrões e então criados protocolos nos estabelecimentos, a fim de melhorar o controle higiênico sanitário destas aves.

Durante a realização do estudo, um fator frequentemente observado foi a falta de higiene em recipientes nos quais eram fornecidas água e ração, além de acúmulo de excretas e superlotação das gaiolas.

Além do isolamento de *E. coli*, um fato de grande importância constatado foi a alta frequência de bactérias resistentes e multirresistentes aos antimicrobianos mais utilizados na atualidade. Tal resultado evidencia a importância dessas aves com relação a saúde pública, uma vez que as mesmas podem transferir genes de resistência para seres humanos, e contribuir para a disseminação de cepas resistentes. Assim, é de suma importância que sejam feitas pesquisas mais aprofundadas com relação aos fatores de virulência e os genes ligados a resistência antimicrobiana, a fim de orientar a população e prevenir a transmissão de microrganismos patogênicos e multirresistentes.

Diante de tais resultados, pretende-se orientar proprietários de revendas quanto ao uso incorreto de antimicrobianos, que podem não só gerar resistência antimicrobiana nas aves, mas também em humanos que tem o contato direto com resíduos desses animais. Além disso, é de fundamental importância salientar a necessidade do correto alojamento, disposição das aves, de um manejo adequado e implantação de melhores técnicas de higienização de gaiolas e do ambiente no qual as mesmas estão dispostas. Também instruir futuros compradores das aves quanto à importância de cuidados com a higiene e dos riscos de contaminação ao manusear aves infectadas, contribuindo com a saúde e bem-estar do animal e minimizando risco de transmissão de doenças.

ANEXO A – Ficha de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 19 de junho de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 058/17

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Mestrado

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 22/05/2017
- Título do projeto:** Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* com determinação do perfil de resistência em amostras de psitacídeos coletadas em revendas na região metropolitana de Goiânia - Goiás
- Pesquisador Coordenador no SIGAA Pesquisa:** Maria Auxiliadora Andrade
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Karine Louise Calaça/EVZ/UFV
- Pesquisadores Participantes:** Maria Auxiliadora Andrade, Karine Louise Calaça, Silvânia Andrade Reis
- Médico Veterinário/CRMV:** Karine Louise Calaça/ 6555 - GO
- Unidade onde será realizado:** EVZ/UFV

III - Objetivos e justificativa do projeto: Investigar *Salmonella* e *Escherichia coli* em excretas, suabes de bebedouros e amostras de comedouros oriundas de psitacídeos em casas de revenda na região metropolitana de Goiânia – GO.

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Já será utilizado, pois a coleta das amostras não gera desconforto aos animais.
- Prevê Projeto Piloto:** não.
- Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** não se aplica. Será utilizada excretas de aves colhidas em gaiolas.
- Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** não se aplica.
- Fonte de obtenção do animal:** Lojas agropecuárias de Goiânia.
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** não se aplica.
- Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Risco de contaminação em caso de amostras positivas por *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. Para prevenir é necessário o uso de EPIs (Equipamento de Proteção Individual) e treinamento das pessoas envolvidas na pesquisa.
- Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Serão coletadas das gaiolas das aves aproximadamente 2,5 g de excretas frescas, por meio de espátulas esterilizadas, em cinco pontos diferentes das

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



bandejas, formando assim um pool, que será uma amostra. As coletas nos bebedouros serão realizadas por cinco suabes que serão esfregados em toda a extensão dos mesmos e constituirão uma amostra. Em relação ao alimento disponibilizado para as aves, serão coletados dos comedouros 25 g de cinco pontos diferentes, que serão acondicionados em sacos plásticos esterilizados da mesma forma que as amostras anteriores. Após a coleta, as amostras serão homogeneizadas, identificadas e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo ao laboratório para processamento.

- Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** não se aplica.
- Grau de invasividade:** G1
- Destino do animal:** Continuarão nos estabelecimentos de revenda no comércio.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG:** Os documentos estão de acordo com as exigências da CEUA/UFG, incluindo o Termo de Consentimento para o proprietário da loja agropecuária.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Os procedimentos experimentais estão de acordo com as exigências do CONCEA.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de março de 2018**.

VII - Data da reunião: 19/06/17.

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

ANEXO B - Componentes utilizados na preparação do mix de reagentes para amplificação dos genes *iss*, *tsh*, *traT*, *papC* e *eae* em isolados de *Escherichia coli*.

QUADRO 1 - Componentes utilizados na realização da PCR duplex para amplificação dos genes *iss* e *tsh* em isolados de *Escherichia coli*.

Componentes	Volume
Água ultrapura (<i>DNase/RNase-free distilled water – Invitrogen</i>)	16,3 µL
Tampão 10x (<i>pcr buffer 10x Invitrogen</i>)	2,5 µL
MgCl ₂ <i>Invitrogen</i> (50mM)	2,0 µL
dNTP <i>amersham biosciences</i> (10mM)	1,0 µL
Primer <i>foward/ primer reverse iss</i> (20µM)	0,5 µL
Primer <i>foward/ primer reverse tsh</i> (20µM)	0,5 µL
Taq polimerase (<i>Invitrogen</i>) (5U/µM)	0,2 µL
DNA	2,0 µL
Total	25,0 µL

Fonte: Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*. 2005; 49(2): 269-273.

QUADRO 2 - Componentes utilizados na realização da PCR para amplificação do gene *traT* em isolados de *Escherichia coli*.

Componentes	Volume
Água ultrapura (<i>DNase/RNase-free distilled water – Invitrogen</i>)	34,75 µL
Tampão 10x (<i>pcr buffer 10x Invitrogen</i>)	5,0 µL
MgCl ₂ <i>Invitrogen</i> (50mM)	2,0 µL
dNTP <i>amersham biosciences</i> (10mM)	1,0 µL
Primer <i>foward/ primer reverse traT</i> (20µM)	2,0 µL
Taq polimerase (<i>Invitrogen</i>) (5U/µM)	0,25 µL
DNA	5,0 µL
Total	50,0 µL

Fonte: Horne SM, Pfaff-McDonough SJ, Giddings CW, Nolan LK. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Disease*. 2000; 44(1):179-84.

QUADRO 3 - Componentes utilizados na realização da PCR para amplificação do gene *papC* em isolados de *Escherichia coli*.

Componentes	Volume
Água ultrapura (<i>DNase/RNase-free distilled water – Invitrogen</i>)	16,25 µL
Tampão 10x (<i>pcr buffer 10x Invitrogen</i>)	2,5 µL
MgCl ₂ <i>Invitrogen</i> (50mM)	2,0 µL
dNTP <i>amersham biosciences</i> (10mM)	1,0 µL
Primer <i>foward/ primer reverse papC</i> (20µM)	1,0 µL
Taq polimerase (<i>Invitrogen</i>) (5U/µM)	0,25 µL
DNA	2,0 µL
Total	25,0 µL

Fonte: Siek KER, Giddings WC, Doetkott C, Johnson TJ, Nolan LK. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res*. 2005; 36:241-256.

QUADRO 4 - Componentes utilizados na realização da PCR para amplificação do gene *eae* em isolados de *Escherichia coli*.

Componentes	Volume
Água ultrapura (<i>DNase/RNase-free distilled water – Invitrogen</i>)	35,75 µL
Tampão 10x (<i>pcr buffer 10x Invitrogen</i>)	5,0 µL
MgCl ₂ <i>Invitrogen</i> (50mM)	2,0 µL
dNTP <i>amersham biosciences</i> (10mM)	1,0 µL
<i>Primerforward/ primer reverse papC</i> (20µM)	1,0 µL
Taq polimerase (<i>Invitrogen</i>) (5U/µM)	0,25 µL
DNA	5,0 µL
Total	50,0 µL

Fonte: Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microb.* 1992; 6(3):411-417.