

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS DE ORIGEM BACTERIANA E
VIRAL E MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI*
E *RHODOCOCCLUS EQUI* ISOLADOS DAS FEZES DE AVES
SILVESTRES DE CATIVEIRO DA FAUNA BRASILEIRA

AMANDA BONALUME CORDEIRO DE MORAIS

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS DE ORIGEM BACTERIANA E
VIRAL E MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI*
E *RHODOCOCCLUS EQUI* ISOLADOS DAS FEZES DE AVES
SILVESTRES DE CATIVEIRO DA FAUNA BRASILEIRA

AMANDA BONALUME CORDEIRO DE MORAIS

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia
Ribeiro

Nome do Autor: Amanda Bonalume Cordeiro de Moraes

Título: OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS DE ORIGEM BACTERIANA E VIRAL E MARCADORES DE VIRULÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* E *RHODOCOCCLUS EQUI* ISOLADOS DAS FEZES DE AVES SILVESTRES DE CATIVEIRO DA FAUNA BRASILEIRA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

Membro

Departamento de Medicina Veterinária (DMV)

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Data da Defesa: 27 de fevereiro de 2014.

*“...Ilumine seu rosto com alegria
Esconda qualquer traço de tristeza
Embora uma lágrima possa estar tão próxima
Esse é o tempo que você tem que continuar tentando
Sorria, o que adianta chorar?
Você descobrirá que a vida ainda continua
Se você apenas sorrir...”*

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Albérico e Áurea, obrigada pelo amor incondicional e todo o apoio à minha formação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, um exímio orientador e pesquisador, agradeço por toda a solicitude e confiança.

Agradecimentos

À minha falecida avó Esmeraldina, um exemplo de mulher que sempre lutou pela educação da sua família com muito amor

À avó Elisa, por ter permitido uma nova aproximação e uma mudança total de conceitos. Obrigada por ter “voltado” para nossas vidas

Às minhas irmãs Andrea e Alessandra, que mesmo distantes foram essenciais no meu desenvolvimento pessoal

À minha amiga-irmã Carol Scott, você foi um dos melhores presentes que Botucatu me proporcionou

Aos amigos de toda uma vida Getúlio, Thamyres, Bruna, Suzana, Carolzinha, Isa, Mineira e Carol Fernandes. Vocês são essenciais

Aos pós-graduandos Ana Carolina, Carmen, Gustavo e Rafaela, pela amizade, companheirismo e momentos de muitas risadas

Ao Marcel, pela parceria incomparável. Uma surpresa extremamente bem vinda na minha vida

Ao Fernando Listoni, muito obrigada, não somente, por todo o apoio ao desenvolvimento deste trabalho, como também pelo carinho e amizade ao longo destes dois anos

Aos Professores Carlos Teixeira, Paulo Eduardo Brandão e Domingos da Silva Leite, pela cooperação com este projeto, me acolhendo nos seus locais de trabalho

Aos Professores José Pantoja e Shinji Takai, pela grandiosa colaboração com esta pesquisa

Ao Seu Roberto, Rodrigo e M.V. Rodrigo Friciella, pela disponibilidade em nos permitir coletar as amostras das aves

À pós-doutoranda Amanda Keller, muito obrigada por toda a ajuda, amizade e paciência

À FAPESP (processo n° 2012/05818-9) pelo apoio financeiro.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cálculo de tamanho amostral, considerando a prevalência e o tamanho da população de aves silvestres/sinantrópicas, em uma expectativa de população disponível para análise de 200 aves. Botucatu, SP, 2012-2013.	25
Quadro 2 - Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas das fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012 –2013.....	31
Quadro 3 - Iniciadores utilizados para classificação filogenética de linhagens de <i>Escherichia coli</i> isoladas das fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012- 2013.....	33
Quadro 4 - Primers utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase para a detecção de coronavírus bovino, em amostras de fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012 – 2013.....	35
Quadro 5 - Sequência de oligonucleotídeos para a detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes para as reações de PCR para detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas das fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012 – 2013.....30

Tabela 2 - Número e porcentagem de espécies de aves da fauna nacional anilhadas de criadores particulares de Botucatu, SP, do Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” de Sorocaba, SP, e Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres da FMVZ – UNESP/ Botucatu, SP, utilizadas para identificação de patógenos bacterianos e virais nas fezes. Botucatu, SP, 2012-2013.....40

Tabela 3 - Frequência de patógenos de origem viral e bacteriana identificados nas fezes de diferentes espécies de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.....41

Tabela 4 - Frequência identificação de patógenos de eliminação fecal em Passeriformes e Psitaciformes pertencentes à fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.....42

Tabela 5 - Frequência de patógenos de eliminação entérica, segundo diferentes locais de colheita de fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.....45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequência de detecção de diferentes patógenos de eliminação entérica em amostras de fezes de Passeriformes e Psitaciformes pertencentes à fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.....43

Figura 2 - Porcentagem de colheita de material, proveniente de aves da fauna nacional, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2012-2013.....44

Figura 3 - Porcentagem de isolamento de patógenos de eliminação fecal, segundo o local de colheita das amostras de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.....44

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

µm = micrômetro

afa – gene codificador de adesina afimbrial

Aids = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BCov = coronavírus bovino

bfp = “bundle forming pilus”

CAZ-NB = meio de cultura composto por ceftazidima, novobiocina e ciclohexamida

CDC = Center for Disease Control

CEMPAS = Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

cnf – fator necrosante citotóxico

DAEC = *Escherichia coli* de aderência difusa

DEPC = Dietilpirocarbonato

eae – *Escherichia coli* “attachment and effacing” / intimina

EaggEC = *Escherichia coli* enteroagregativa

EHEC = *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC = *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC = *Escherichia coli* enteropatogênica

EPM = Escola Paulista de Medicina

ETEC = *Escherichia coli* enterotoxigênica

fimH – gene codificador de fímbria H / pili tipo 1

FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HIV = vírus da imunodeficiência humana

hly – gene codificador de hemolisina

HUS = síndrome urêmica hemolítica

IBAMA = Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

iuc – gene codificador de aerobactina

K88 = antígeno capsular

KDa = quilo Dalton

MILi = motilidade, indol e lisina

NCDV = Nebraska Calf Diarrhea Virus

nm = nanômetro

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

papC – subunidade C da fímbria P

papG – subunidade G da fímbria P

PZMQB = Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros

saa = gene codificador de adesina autoaglutinante

SARS-COV = vírus da pneumonia asiática

sfa – gene codificador de fímbria S

SS = agar Salmonella/Shigella

STX = toxina de Shiga

TSA = tryptic soy Agar

TT = caldo tetrionato

UPEC = *Eschericia coli* uropatogênica

usp = proteína específica uropatogênica

Vap = virulence associated protein

VBI = vírus da bronquite infecciosa das galinhas

VP = proteína viral

VT = verotoxina

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1. Colibacilose	8
2.2. Salmonelose	11
2.3. Rodococose	15
2.4. Coronavirose.....	18
2.5. Rotavirose.....	20
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Locais de colheita de material.....	24
4.2. Colheita de material e universo amostral	24
4.3. Autorização do IBAMA.....	25
4.4. Comissão de Ética no Uso de Animais, FMVZ- UNESP/ Botucatu, SP	25
5. EXAMES BACTERIOLÓGICOS	26
5.1. Diagnóstico de <i>Rhodococcus equi</i>	26
5.1.1. Cultivo microbiológico.....	26
5.1.2. Caracterização microbiológica de linhagens de <i>R. equi</i>	26
5.1.3. Determinação de antígenos e plasmídios de virulência.....	26
5.1.3.1. Extração de DNA plasmidial.....	26
5.1.3.2. Reação em cadeia pela polimerase.....	27
5.2. Diagnóstico de <i>Escherichia coli</i>	28
5.2.1. Caracterização microbiológica	28
5.2.2. Detecção genotípica de linhagem de <i>E. coli</i>	28
5.2.2.1. Controles positivos	28

5.2.2.2. Obtenção de DNA para PCR.....	28
5.2.2.3. Amplificação do DNA (PCR).....	29
5.2.2.4. Eletroforese em gel de agarose.....	32
5.5.5.5. Filogenia.....	32
5.3. Diagnóstico do gênero <i>Salmonella</i>	33
5.3.1. Caracterização microbiológica de <i>Salmonella</i> spp.	33
5.3.2. Teste de aglutinação com soro polivalente e caracterização de sorotipos.....	34
6. EXAMES VIROLÓGICOS	34
6.1. Diagnóstico de Coronavírus bovino (BcoV)	34
6.1.1. Reação de Transcriptase Reversa	34
6.1.2. Extração de RNA.....	34
6.1.3. Síntese de cDNA (Transcrição-Reversa)	35
6.1.4. Amplificação.....	35
6.1.5. Vírus de Referência	36
6.2. Diagnóstico de Rotavírus	36
6.2.1. Extração de RNA.....	36
6.2.2. Síntese de cDNA (Transcrição-Reversa)	36
6.2.3. Primeira amplificação	36
6.2.4. Segunda amplificação	37
6.2.5. Vírus de referência.....	38
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
8. RESULTADOS	39
9. DISCUSSÃO	46
10. CONCLUSÕES.....	51
11. REFERÊNCIAS.....	52

MORAIS, A.B.C. **Ocorrência de patógenos de origem bacteriana e viral e marcadores de virulência de *Escherichia coli* e *Rhodococcus equi* isolados das fezes de aves da fauna brasileira.** Botucatu, 2014. 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo investigou a ocorrência de *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., Coronavírus e Rotavírus nas fezes de Passeriformes e Psitaciformes pertencentes à fauna nacional, de 29 diferentes espécies, sem sinais entéricos. Foram investigados também marcadores de virulência nas linhagens de *E. coli* (*cnf1*, *hly*, *papC*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *fimH*, *afa*, *sfa*, *iucD*, *usp*, *vt1*, *vt2*, *eae*, *k88*) e *R. equi* (genes *vapA* e *vapB*). As aves utilizadas no estudo foram provenientes do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) FMVZ - UNESP/ Botucatu, SP, do Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” (PZMQB) de Sorocaba, SP e de criadores particulares com aves registradas no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) da região de Botucatu, SP. Do total de 152 amostras avaliadas foram isoladas 46 (30,26%) linhagens de *E. coli* das quais 37 (80%) foram provenientes de amostras de Psitaciformes e 9 (20%) de Passeriformes. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos para o maior isolamento de *E. coli* nos Psitaciformes. Dentre os marcadores de virulência de *E. coli* foram detectados os genes *fim H* (58,69%) e *eae* (4,34%). Foram isoladas 2 (1,32%) linhagens de *R. equi*, todas de Psitaciformes. Nestes isolados de *R. equi* não foram identificados os genes *vapA* e *vapB* associados à virulência. Foi encontrado material genético de Rotavírus bovino em três (1,97%) amostras de Psitaciformes. *Salmonella* sp. e Coronavírus não foram identificados nas aves amostradas. A presença de *E. coli*, *R. equi* e Rotavírus em amostras de fezes de aves silvestres, sem sinais entéricos, reforça o potencial destas espécies de servirem como reservatórios de patógenos de eliminação entérica para os humanos, devido à presença destes animais no ambiente domiciliar e peridomiciliar.

Palavras-chave: Passeriformes; Psitaciformes; *E. coli*; *R. equi*; Rotavírus;

MORAIS, A.B.C. **Occurrence of pathogens of bacterial and viral origin and virulence markers of *Escherichia coli* and *Rhodococcus equi* isolates from bird feces of Brazilian fauna.** Botucatu, 2014. 66p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study investigated the occurrence of *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., Coronavirus and Rotavirus in the feces of Passeriformes and psittaciformes belonging to Brazilian wildlife, from 29 different species, without enteric signs. Virulence markers were also investigated in strains of *E. coli* (*cnf1*, *hlyA*, *papC*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *fimH*, *afa*, *sfa*, *iucD*, *usp*, *vt1*, *vt2*, *eae*, *k88*) and *R. equi* (*vapA* and *vapB* genes). The birds used in the study came from the Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) FMVZ - UNESP / Botucatu, SP, Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros" (PZMQB) Sorocaba, SP and private breeders with birds recorded in Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) from Botucatu region, SP. Of the total 152 fecal samples evaluated were isolated 46 (30.26%) strains of *E. coli*. From these, 37 (80%) were from psittaciformes samples and 9 (20%) of Passeriformes. There was a statistical difference ($p < 0.05$) between groups with greater isolation of *E. coli* in psittaciformes. Among the virulence markers of *E. coli* were detected the genes *fimH* (58,69%) and *eae* (4,34%). Were isolated 2 (1.32%) *R. equi* strains, all from psittaciformes. Among these *R. equi* isolates any *vapA* and *vapB* genes associated with virulence were founded. Genetic material of bovine Rotavirus was found in three (1.97%) psittaciformes samples. *Salmonella* sp. and Coronavirus weren't identified in any of the sampled birds. The presence of *E. coli*, *R. equi* and Rotavirus in fecal samples of wild birds without enteric signs from Brazil wildlife, reinforces the potential of these birds as a reservoirs of pathogens of enteric elimination for humans, due to the presence of these animals in the domestic and peridomestic, environment of human.

Key words: Passeriformes; psittaciformes; *E. coli*; *R. equi*; Rotavirus;

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos biomas mais ricos e complexos de todo o mundo. No tocante às aves, estima-se que o país detenha cerca de 1.832 espécies pertencentes à fauna nacional. É o segundo país com maior número de espécies de aves conhecidas (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2014). Os micro-organismos de veiculação entérica figuram dentre as principais classes de patógenos para humanos e animais. Este grupo peculiar de organismos caracteriza-se por permanecerem viáveis e com capacidade infectante em condições hostis do ambiente, após a eliminação fecal pelos hospedeiros. Em sua grande maioria, estabelecem infecção nos susceptíveis mediante a contaminação de alimentos de origem animal, água, verduras, frutas e utensílios de uso comum. O contato estreito dos humanos com animais, ou mesmo com o ambiente de criação dos animais, são importantes elos na cadeia epidemiológica de transmissão de patógenos de eliminação fecal dos animais para os humanos (ACHA e SZYFRES, 2003).

O acesso das aves da fauna silvestre ao ambiente próximo aos domicílios favorece a contaminação peridomiciliar pelas fezes dos Passeriformes e Psitaciformes. Ademais, a deficiente higienização de praças e parques públicos e privados e a falta de conscientização da população em geral quanto aos riscos representados por micro-organismos entéricos, torna estes ambientes de alto risco à veiculação de enteropatógenos para os humanos (FERNANDES et al., 2013).

Dentre os patógenos de veiculação fecal, com reconhecida resistência ambiental e de potencial zoonótico, relacionados a graves doenças em humanos, merecem destaque: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* spp., *Rhodococcus equi* (*R. equi*), Coronavírus sp. e Rotavírus sp. (ACHA e SZYFRES, 2003).

E. coli é reconhecida classicamente como a enterobactéria mais importante dos animais e humanos. Linhagens da classe enterohemorrágica (EHEC) pertencentes ao sorotipo O157:H7, têm sido investigadas nos últimos anos quanto à produção de verotoxinas, um tipo especial de toxina

de efeito citotóxico (TAUXE, 1997). As estirpes produtoras desta toxina estão relacionadas a graves manifestações clínicas de colite hemorrágica e falha renal aguda em humanos, de curso geralmente fatal em crianças e pacientes debilitados. O desenvolvimento dos quadros clínicos está intimamente relacionado ao consumo de carne e subprodutos de origem bovina (com tratamento térmico inadequado) leite e derivados, verduras, frutas e água contaminados com as fezes de animais portadores (TARR, 1995; TAUXE, 1997). Não está claramente estabelecido na literatura, particularmente no Brasil, o impacto da manutenção deste sorotipo patogênico no ambiente dos humanos.

No Brasil, as investigações de *E. coli* O157:H7 verotoxigênicas foram iniciadas com a detecção do sorotipo nas fezes de bovinos de abatedouro (CERQUEIRA et al., 1999). Subsequentemente, os estudos avançaram na investigação do sorotipo em alimentos de origem animal (RIBEIRO et al., 2006) e, de forma preocupante, em pacientes humanos acometidos por distúrbios gastroentéricos e/ou renais (TRABULSI et al., 1999). Apesar da ocorrência do sorotipo em humanos na América Latina, são ainda pouco frequentes as identificações de linhagens verotoxigênicas em pacientes no Brasil (DE SOUZA et al., 2007), dificultando aquilatar o real impacto da doença no país.

São também escassos no país estudos voltados a investigação do sorotipo O157:H7 de *E. coli* no ambiente cotidiano dos humanos, notadamente de crianças, em face da alta mortalidade neste grupo considerado de vulnerabilidade (ou de risco). Neste contexto, estudo recente investigou a presença de marcadores de virulência em 63 linhagens de *E. coli* isoladas da areia de praças e parques, públicos e privados, da região central do estado de São Paulo, sugerindo a participação de Passeriformes e Psitaciformes na contaminação destes ambientes (FERNANDES et al., 2013).

O gênero *Salmonella* frequentemente é incriminado como agente causal de severos surtos de toxi-infecções de origem alimentar nos humanos. O micro-organismo possui vários sorotipos que são comuns aos animais e humanos (ACHA e SZYFRES, 2003). Este gênero de bactérias

coloniza principalmente a porção distal do intestino delgado e/ou cólon das aves e de outros animais (AGUILAR et al., 2006; GODOY, 2007). A bactéria é eliminada intermitentemente pelas fezes por várias espécies de animais domésticos, répteis, anfíbios e aves (com e sem sinais entéricos) mantendo-se viável por meses no ambiente (ACHA e SZYFRES, 2003).

Determinados sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de animais são reconhecidos atualmente como emergentes de doença nos humanos, como *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis (RIBEIRO et al., 2003). A grande maioria dos estudos de casos e surtos de salmonelose em humanos tem-se voltado à investigação da bactéria nos manipuladores de alimentos, nos utensílios de cozinha e dos próprios alimentos (ACHA e SZYFRES, 2003). No entanto, denota-se pouca preocupação com a participação da contaminação ambiental pela bactéria no estabelecimento das infecções nos humanos.

Em aves silvestres do zoológico “Quinzinho de Barros” em Sorocaba, SP, foi realizado estudo para avaliar a presença de *Salmonella* spp. em exemplares mantidos em cativeiro. Foram analisadas 100 amostras de fezes, das quais 11 foram positivas nas seguintes espécies: quatro corujas-do-mato (*Ciccaba sp*), dois emus (*Dromiceius novaehollandiae*), um irerê (*Dendrocygna viduata*), um urumutum (*Nothocrax urumutum*), um mutum de penacho (*Crax fasciolata*), um papagaio-do-mangue (*Amazon amazonica*) e um frango d’água (*Gallinula chloropus*) (SCHUBERT, 2008). À semelhança de *E. coli*, ambientes peridomiciliares de visitação humana como praças e parques estão sujeitos a contaminação por fezes de Passeriformes e Psitaciformes contendo salmonela, em especial para crianç as e adolescentes (FERNANDES et al., 2013).

R. equi são bactérias de comportamento oportunista, relacionadas a graves infecções piogranulomatosas nos animais e humanos. O micro-organismo é eliminado pelas fezes de várias espécies de animais domésticos e silvestres (RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007). Evidências suportam que pacientes humanos possam adquirir a bactéria pelo contato com o solo ou fezes de animais (PRESCOTT, 1991). *R. equi* multiplica-se ativamente no solo que contenha material de origem fecal,

mantendo-se viável por vários meses no ambiente (LINDER, 1997). Recentemente, a patogenicidade do organismo foi relacionada à presença de plasmídeos e proteínas associados à virulência (Vap) identificados principalmente em linhagens isoladas de doença pulmonar e entérica em potros, linfadenite em suínos e em pacientes humanos imunossuprimidos, em especial acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) (TAKAI, 1997). Não está completamente esclarecido o papel do ambiente do cotidiano dos humanos, assim como o ambiente dos animais, na transmissão de *R. equi*, tendo em vista que estudos em outros países têm identificado tanto linhagens virulentas (presença de Vap) como avirulentas no solo de criatórios de animais de produção e de ambientes de entretenimento humano, como parques e praças (TAKAI, 1997). Em dias atuais, a detecção dos marcadores de virulência de *R. equi* são imprescindíveis para a investigação da epidemiologia molecular da doença nos humanos e em animais, assim como para avaliar os reflexos em saúde pública da rodococose. No Brasil, são pontuais os estudos direcionados à caracterização de virulência em linhagens de *R. equi* de origem humana e animal (RIBEIRO et al., 2011a,b). Ainda, são incipientes os estudos no país visando detectar a virulência de estirpes isoladas do ambiente dos humanos e/ou dos animais (RIBEIRO et al., 2011b). Em estudo recente, Fernandes et al. (2013) identificaram em 200 amostras de areia obtidas de praças públicas e privadas da região central do estado de São Paulo, a presença de 23 linhagens de *R. equi*, aventando que a contaminação da areia possa ter ocorrido pelas fezes de Passeriformes e/ou Psitaciformes.

O gênero Coronavírus pode infectar várias espécies de aves e de mamíferos. Este vírus possui tropismo pelas células epiteliais intestinais e respiratórias. Nos animais, causam doenças como a bronquite infecciosa das galinhas, a gastroenterite transmissível dos suínos, enterite em cães, bovinos e felinos, e a peritonite infecciosa dos felinos. As infecções em animais domésticos geralmente são inaparentes (QUINN et al., 2005). O interesse por essa família aumentou recentemente com a classificação de novo coronavírus humano causador da pneumonia asiática (SARS-COV), visto que, classicamente, o coronavírus estava relacionado aos resfriados comuns

em humanos (FLORES, 2007).

Os coronavírus não são estritamente espécie-específicos e são capazes de mutações frequentes. Desta forma, podem infectar novas espécies e, portanto, é possível a infecção cruzada entre animais e humanos (GREENE, 2012). Assim, as aves domésticas e selvagens, devem ser consideradas na cadeia epidemiológica de transmissão da coronavirose humana. Neste contexto, são escassos os estudos envolvendo a detecção de coronavírus obtidos das fezes de Passeriformes e Psitaciformes da fauna nacional. Fernandes, et al. (2013) detectaram duas cepas de coronavírus na areia de parques/praças de Botucatu, SP, e aventaram a participação de aves sinantrópicas/silvestres na contaminação destes ambientes por eliminação fecal do vírus.

O gênero Rotavírus é considerado um dos principais enteropatógenos para os animais e humanos. Encontram-se amplamente difundidos na natureza. Acomete humanos, aves, animais domésticos e silvestres. As infecções por rotavírus constituem uma das principais causas de morbimortalidade infantil em todo o mundo (CDC, 1991; GLASS et al., 1991; ACHA e SZYFRES, 2003). A eliminação viral em altos títulos por períodos prolongados, a existência de portadores e a alta resistência ambiental, contribuem para a ampla disseminação da rotavirose. O rotavírus é predominantemente espécie-específico, embora infecções heterólogas sejam relatadas. Cepas geneticamente relacionadas com vírus de origem bovina, suína, canina, felina e aviária têm sido isoladas de crianças com infecções entéricas ou assintomáticas. De maneira similar, cepas de rotavírus do grupo A, de origem humana, têm sido identificadas em animais (NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1993; DE LEENER et al., 2004; STEYER et al., 2008). A rotavirose afeta principalmente crianças de até cinco anos, com predomínio entre seis meses a um ano de idade (ACHA e SZYFRES, 2003). Nos animais de produção, a rotavirose ocorre predominantemente nas primeiras semanas de vida (RADOSTITS et al., 2007).

Não se tem notado na literatura especializada estudos que avaliem, simultaneamente, os principais patógenos de veiculação fecal com potencial zoonótico, de origem bacteriana e/ou viral, em aves da fauna brasileira

presentes em ambientes do cotidiano humano, tampouco voltados à investigação de marcadores de virulência destes micro-organismos. Estudos desta natureza são fundamentais para sinalizar a ocorrência destes patógenos em animais saudáveis, a virulência dos agentes, bem como os reflexos das aves da fauna nacional como fontes de infecção de patógenos de eliminação fecal para os humanos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Colibacilose

E. coli é certamente, o principal representante das bactérias da família Enterobacteriaceae. Morfologicamente apresenta-se sob a forma de bastonete Gram-negativo, encontrado na microbiota entérica de animais e humanos (CAMPOS e TRABULSI, 1999). Diferentes autores consideram a presença de micro-organismos Gram-negativos no trato digestório de Psitaciformes e Passeriformes como fator preocupante, devido ao potencial de patogenicidade destas bactérias para as aves, outros animais e ocasionalmente humanos (MATTES et al., 2005). *E. coli* é a bactéria mais frequentemente isolada em tecidos obtidos na necrópsia de aves silvestres (DORRESTEIN et al., 1985). Determinadas linhagens isoladas de aves são patogênicas para os humanos e animais.

Nos animais de produção, *E. coli* causa classicamente quadros gastroentéricos e grande variedade de outras afecções, incluindo mastite, diarreia, endometrite, cistite, nefrite, artrite, abortamento, osteomielite, endocardite, pneumonia, conjuntivite e septicemia (RADOSTITS et al., 2007).

Nos humanos, está bem documentada a participação do agente em distúrbios gastrintestinais graves, infecções urinárias, meningites do recém-nascido e septicemias (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Campos e Trabulsi (1999) afirmaram que *E. coli* é responsável por cerca de 40 a 50% da casuística de septicemias por bactérias Gram-negativas em humanos. Quase que, invariavelmente, *E. coli* pode ser isolada do material fecal de animais com e sem diarreia. A colonização intestinal das aves por *E. coli*

patogênicas está intimamente associada a fatores de estresse, má nutrição ou problemas de manejo (MATTES et al., 2005).

A severidade clínica das colibaciloses depende da presença de fatores de virulência, que determinam o grau de patogenicidade das linhagens. Certos fatores de virulência são componentes intrínsecos da estrutura bacteriana (lipopolissacarídeos de membrana), também denominados endotoxinas (CASTRO e YANO, 1992). Outros, porém, constituem-se de diferentes tipos de exotoxinas ou citotoxinas (enterotoxinas, verotoxinas, hemolisinas e fator necrosante citotóxico), bem como propriedades que permitem a multiplicação em meios com baixa disponibilidade de ferro (CAMPOS e TRABULSI, 1999).

A patogênese das infecções de Psitaciformes, Passeriformes e outras aves silvestres por *E. coli* é pouco conhecida. Aparentemente, *E. coli* de origem aviária produz menor diversidade de exotoxinas comparativamente às estirpes de mamíferos que apresentam grande complexidade destas toxinas, resultando em diversas manifestações clínicas nestas espécies (RITCHIE et al., 1994).

As linhagens de *E. coli* responsáveis por distúrbios entéricos nos humanos e nos animais foram agrupadas nas últimas décadas em seis classes patogênicas: enterotoxigênicas (ETEC), enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasoras (EIEC), enteroagregativas (EaggEC) e de aderência difusa (DAEC), subdivididas pela capacidade de produção de toxinas, de invasão celular e pela apresentação de determinadas manifestações clínicas (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Recentemente, tem-se proposto nova classe denominada uropatogênica (ACHA e SZYFRES, 2003). Nos últimos anos, *E. coli* EHEC sorotipo O157:H7 tem emergido como causa preocupante de doença entérica e síndrome urêmica em humanos (TARR, 1995; TAUXE, 1997). *E. coli* sorotipo O157:H7 inibe a síntese protéica, produz toxinas com efeito citopático “in vitro” em células Vero denominadas de verotoxinas (VTs) ou *Shiga-like* toxinas (STX) (LEVINE, 1987) e altera os fatores de coagulação sanguínea. O conjunto desses efeitos patogênicos culmina em grave quadro de colite hemorrágica, trombocitopenia e síndrome urêmica hemolítica,

frequentemente fatal em crianças e indivíduos com debilidade orgânica (TAUXE, 1997).

Epidemiologicamente, a espécie bovina é caracterizada como a principal fonte de infecção do sorotipo O157:H7, eliminado pelas fezes de bovinos com e sem sinais entéricos (FAITH et al., 1996). A absorção das toxinas pelo trato intestinal desencadeia, inicialmente, forte dor abdominal, acompanhada ou não de estado febril, com evolução para disenteria, emese e desidratação (DOYLE, 1991). A doença pode evoluir para grave comprometimento renal ou síndrome urêmica hemolítica (HUS), provocada por lesões no endotélio vascular renal pela ação das VTs. Em crianças com idade inferior a dez anos, os sinais clínicos tornam-se mais pronunciados, com elevada letalidade (TARR, 1995). Altekruise et al. (1997) afirmaram que *E. coli* O157:H7 representa a maior causa de falha renal aguda em crianças nos EUA, das quais 3 a 5% com evolução fatal. Dentre as crianças que se recuperam, aproximadamente 12% apresentam sequelas secundárias à doença renal crônica, hipertensão e/ou sinais neurológicos.

No Brasil, Cerqueira et al. (1999) notificaram pela primeira vez o sorotipo O157:H7 nas fezes de bovinos em abatedouros no Rio de Janeiro. Subsequentemente, outros estudos se sucederam no país no intuito de investigar a ocorrência do sorotipo O157:H7 em leite bovino (RIBEIRO et al., 2006), ou em casos de infecção entérica e renal em crianças por linhagens verotoxigênicas (DE SOUZA et al., 2007).

Apesar da ocorrência deste sorotipo em países da América Latina (ACHA e SZYFRES, 2003) não está esclarecido o real impacto de *E. coli* verotoxigênicas na epidemiologia de doenças nos humanos e em animais no Brasil (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Adicionalmente, estudos conduzidos na investigação do agente em animais, alimentos, água, ambiente e em infecções nos humanos são fundamentais na vigilância epidemiológica da doença, notadamente em virtude da alta letalidade dos casos clínicos, especialmente em crianças (TARR, 1995. TAUXE, 1997). As manifestações clínicas da colibacilose em aves incluem sinais de intensa prostração, enterite, hepatite, hepato e esplenomegalia, aerossaculite, poliserosite e

comprometimento de diversos órgãos como rins, oviduto, pulmões, medula óssea e articulações (KNÖBL et al., 2008).

Em São Paulo, Knöbl et al. (2008) realizaram a caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *E. coli* isoladas de papagaios com colibacilose e detectaram a presença do gene *pap* associado a infecções do trato geniturinário em três de oito linhagens. A fímbria P é uma adesina manose-resistente frequentemente observada em linhagens uropatogênicas presentes em isolados de infecções do trato urinário (cistite e pielonefrite) em humanos. A expressão da fímbria P em *E. coli* de aves parece estar relacionada à colonização de órgãos internos (fígado e coração) nos estágios mais avançados da colibacilose. Estudo recente conduzido na identificação de marcadores de virulência de *E. coli* isolados de areia em parques e praças do interior do estado de São Paulo, detectaram os genes *eae*, *bfp*, *saa*, *iucD*, *pap GI*, *sfa* e *hly* em 63 isolados, postulando a possível participação de Passeriformes e Psitaciformes na contaminação dos ambientes por eliminação fecal do patógeno (FERNANDES et al., 2013). No Brasil, os estudos de infecção por *E. coli* geralmente são conduzidos na avaliação de alimentos, água e de humores orgânicos de pacientes infectados. Nota-se pouca preocupação no país quanto aos riscos de transmissão destes agentes patogênicos provenientes de aves silvestres, que podem se constituir em reservatórios ou portadores de linhagens patogênicas para os humanos.

2.2. Salmonelose

A salmonelose é considerada uma das principais zoonoses em todo o mundo. *Salmonella* spp. é um micro-organismo ubíquo, que acarreta diversas afecções nos humanos, animais domésticos e silvestres. O conhecimento da ocorrência e a distribuição de salmonela em animais silvestres e domésticos é essencial para relacionar os possíveis reservatórios relacionados à transmissão do agente. Fatores que provocam desequilíbrio na microbiota intestinal, como o uso de antimicrobianos, mudanças na dieta ou privação de comida e água, podem facilitar a

multiplicação do patógeno no trato intestinal (QUINN et al., 2005; GODOY, 2007).

A taxonomia do gênero *Salmonella* é objeto de controvérsia entre os bacteriologistas em virtude da coexistência de classificação sorológica e, recentemente, molecular. Aceita-se atualmente a existência de duas espécies, *S. enterica* (patogênica) e *S. bongori* (saprófita). *S. enterica* é a espécie mais patogênica contendo vários sorotipos, que têm sido relacionados a quadros de gastroenterite, pneumonia, septicemia e, eventualmente, abortamentos nos animais e humanos (ACHA e SZYFRES, 2003).

As aves domésticas e selvagens são consideradas reservatórios de salmonela para os humanos, sobretudo devido às contaminações que ocorrem durante a cadeia de produção e beneficiamento de alimentos de origem animal (PEDERSEN et al., 2006). Comumente, aves de vida livre podem estabelecer contato direto ou indireto com aves de produção, favorecendo a infecção de humanos pelo consumo de carne e ovos de aves infectadas. Ademais, é crescente o uso de aves selvagens/exóticas como animais de estimação, estreitando o contato destes animais e humanos, aumentando significativamente os riscos de infecção, independente da ave ser proveniente de criador legalizado ou de comércio ilegal (NETO et al., 2009).

Nos humanos, o micro-organismo está intimamente relacionado às toxinfecções alimentares mediante o consumo de produtos de origem animal. A principal forma de transmissão da bactéria para os humanos é representada pela via fecal-oral por contaminação de alimentos, água e utensílios, levando a gastroenterite severa, ocasionalmente fatal. As manifestações clínicas da doença nos pacientes incluem febre, dor abdominal, vômito e diarreia com estrias de sangue, mialgias e sinais de desidratação (ACHA e SZYFRES, 2003).

A salmonela é eliminada pelas fezes e possui elevada resistência ambiental, especialmente em ambientes úmidos, ao abrigo da luz solar direta. Diferentes espécies de animais e inclusive os humanos podem albergar a bactéria no intestino, com eliminação intermitente pelas fezes.

Os cães, gatos e animais de produção são considerados, epidemiologicamente, como importantes fontes de infecção. Em virtude da proximidade de contato estreito entre as crianças e os animais de companhia e, por vezes, pelos hábitos indevidos ou precários de higiene observados em crianças nessa faixa etária, o risco de infecções por bactérias do gênero *Salmonella* é motivo de grande preocupação entre os profissionais da área de saúde, principalmente em crianças abaixo dos quatro anos de idade (SCHUTZE et al., 1999; TREVEJO et al., 2003).

As aves podem se infectar pelo contato direto com outros animais infectados ou superfícies contaminadas, pela ingestão de água ou alimento, ou pela inalação de aerossóis contendo o micro-organismo. As aves de vida livre podem servir como portadores ou reservatórios para animais mantidos em cativeiro (FRIEND, 1999; BROWN, 2000; GODOY, 2007).

Salmonella enterica sorotipo Enteritidis tem sido considerada agente emergente de zoonose (ALTEKRUSE et al., 1997). No Brasil, Ribeiro et al. (2003) descreveram caso de gastroenterite, septicemia e falha renal, por este sorotipo de salmonela em cão domiciliado, e ressaltaram os riscos do convívio estreito do proprietário e o cão na transmissão desta zoonose.

As bactérias do gênero *Salmonella* podem causar três doenças distintas nas aves: (1) tifo aviário causado pela *Salmonella gallinarum*, (2) pulorose causada pela *Salmonella pullorum* e o (3) paratifo aviário causados por vários sorotipos do gênero *Salmonella* (BERCHIERI JR., 2000). As infecções causadas por *S. pullorum* e *S. gallinarum* podem ser transmitidas verticalmente e se caracterizam por quadros entéricos e septicêmicos, com elevada mortalidade em aves jovens. As infecções paratifóides, causadas por qualquer outro sorotipo, exceto *S. gallinarum* e *S. pullorum*, podem ser transmitidas pelo contato com outros animais, incluindo aves, répteis, mamíferos, roedores e humanos (HOEFER, 1997). *Salmonella* spp. é o agente responsável por quadros agudos, subagudos e crônicos de enterite nas aves que, após a recuperação da infecção, permanecem assintomáticas, continuando a eliminar o agente nas fezes por várias semanas (CARTER, 2005). Animais que não desenvolvem a doença, ou que

se recuperam clinicamente podem tornar-se portadores, servindo como fontes de infecção para outros animais e humanos (KETZ – RILEY, 2003).

Diferentes sorotipos de *Salmonella* sp. têm sido descritos em aves de várias espécies, a saber: *Salmonella pullorum* em cacatua de palma preta (*Probosciger aterrimus*) [LIOW, 1978], *Salmonella* Typhimurium em “bullfinch” (*Pyrrhula pyrrhula*), “Eurasian siskin” (*Carduelis spinus*), “common redpoll” (*Carduelis flammea*), “eurasian greenfinch” (*Carduelis chloris*) [REFSUM et al., 2003], lorikeets, lories (WARD et al., 2003), codornas (*Colinus virginianus*) [HELM et al., 1999] e pombos (*Columba livia*) [KIMPE et al., 2002]. Em contraste, *Salmonella* sorotipo Typhimurium variante Copenhagen e Hadar foi descrita em codornas (*Coturnix coturnix japonica*) [SANDER et al., 2001]. *Salmonella arizonae* foi relatada em cacatua de penacho amarelo claro (*Cacatua galerita galerita*) [ORÓS et al., 1998], enquanto *Salmonella* spp. foi descrita em abetarda (*Chlamydotis undulata*) [D’ALOIA et al., 1996]. *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar Kottbus foi relatada em patos e marrecos [GALLETTI et al., 1999]. *S. havana*, *S. virchow*, *S. livingstone*, *S. hadar*, *S. paratyphi* B e *Salmonella* sp. foram reportadas em coruja orelhuda (*Bubo bubo*), falcões peregrinos (*Falco peregrinus*), águia dourada (*Aquila chrysaetos*) e gaviões (*Buteo buteo*) [BATTISTI et al., 1998].

No zoológico infantil (local onde crianças têm contato com animais) de Nagano, Japão, 11 aves domésticas representadas por quatro gansos da China (*Anser cygnoide*), três patos (*Anas platyrhynchos*), três perus (*Meleagris gallopavo*) e um ganso de Toulouse (*Anser anser*) foram positivos para o isolamento de *Salmonella* Typhimurium (SATO et al., 1999). No Brasil, no zoológico pertencente ao estado do Rio Grande do Sul, foram colhidas fezes de 280 psitacídeos, utilizando suabes cloacais, de aves pertencentes a treze espécies mantidas em cativeiro. Utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi detectada *Salmonella* spp. em 37 amostras, indicando que 13,2% dos psitacídeos eram portadores assintomáticos ou transientes infectados pela bactéria (ALLGAYER, 2003).

Em pombos domésticos capturados no município de Jaboticabal, SP, foi isolado *Salmonella* spp. de órgãos (pulmões, gônadas, fígado e baço) e conteúdo intestinal em dez (7,94%) dentre 126 pombos. Dos dez pombos

positivos para *Salmonella* spp., em sete o agente foi isolado de apenas um órgão e em três aves o isolamento ocorreu em mais de um órgão. A tipagem sorológica revelou oito isolamentos pertencentes ao sorotipo *S. Typhimurium*, um sorotipo *S. enterica* subsp. *enterica* 4, 12 e um *S. enterica* subsp. *enterica* 4, 12, i (MARCIANO, 2004).

Com efeito, poucos estudos no Brasil têm investigado o risco microbiológico que as aves da fauna nacional representam para os humanos como portadores ou reservatórios do gênero *Salmonella*.

2.3. Rodococose

A rodococose é uma doença infectocontagiosa piogranulomatosa causada por *R. equi* que acomete animais domésticos, selvagens e humanos. De comportamento oportunista, o micro-organismo está relacionado às diversas manifestações clínicas, de difícil resolução terapêutica (LINDER, 1997). Entre os animais, o equino é a principal espécie-alvo de *R. equi*, particularmente os potros. Clinicamente, a doença manifesta-se por infecções pulmonares e, em menor frequência, por distúrbios entéricos e/ou articulares. Nos suínos a doença não é progressiva, apresentando-se como linfadenite com lesões semelhantes às observadas na tuberculose (TAKAI, 1997). Em outras espécies de animais de produção, de companhia e selvagens, a doença é rara, ocorrendo sob a forma de enterite, linfadenite, abortamento, mastite, dermatite e piometra (PRESCOTT, 1991).

R. equi é eliminado principalmente pelas fezes de herbívoros e onívoros, incluindo equinos, bovinos, suínos, ovinos, caprinos e cervos. Raramente a bactéria é isolada das fezes de aves, humanos, cães e até o momento, não foi isolada das fezes de gatos (PRESCOTT, 1991).

Nos últimos anos, a virulência das linhagens de *R. equi* foi atribuída à presença de plasmídios e antígenos (proteínas) denominados VAP (virulence associated protein). Estes marcadores de virulência impulsionaram os estudos da epidemiologia molecular e patogenicidade de *R. equi* isoladas de animais e de humanos.

As linhagens virulentas possuem antígenos de 15 a 17 kDa, que codificam proteínas VapA. Os isolados VapA são encontrados em estirpes isoladas de pneumonia em potros, em humanos imunocompetentes e, também, acometidos pela Aids. As estirpes de virulência intermediária ou *vapB* (20 kDa) são identificadas na linfadenite em suínos e, predominantemente, em pacientes com Aids. Em contraste, as estirpes avirulentas (não detentoras dos genes *vapA* e *vapB*) ocorrem principalmente no ambiente de criação de herbívoros domésticos (solo, fezes), especialmente em criatórios de equinos e bovinos (HINES et al., 1997; TAKAI, 1997). Linhagens avirulentas têm sido encontradas também em humanos com rodococose, com ou sem imunossupressão (TAKAI, 1997), incluindo no Brasil (RIBEIRO et al., 2011b). Dentre a literatura consultada, não existe referencial de estudos sobre o perfil de virulência de *R. equi* isolados de aves silvestres, apesar da descrição do patógeno isolado das fezes de Passeriformes e Psitaciformes (PRESCOTT, 1991).

A rodococose humana é considerada em certos países como doença emergente (LINDER, 1997). As infecções por *R. equi* são descritas, principalmente, em indivíduos severamente comprometidos ou imunossuprimidos, transplantados, portadores de neoplasias, submetidos à terapia prolongada com corticóides e, em especial, pacientes acometidos pela Aids (LINDER, 1997; TAKAI et al., 2002). Estima-se que, em média, 39,4 milhões de pessoas convivam atualmente com a Aids em todo o mundo. No Brasil, o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica assinalou que, entre 1980 e 2006, ocorreram 433 mil casos de Aids oficialmente notificados. Até metade da década de 90, as taxas de incidência atingiram 19 casos de Aids / 100 mil habitantes. Destes, cerca de 80% concentravam-se nas regiões Sudeste e Sul do país (BRASIL, 2007). No Brasil, Caterino-de-Araújo et al. (2000) descreveram o primeiro caso de rodococose em paciente humano acometido por Aids, apresentando sinais pulmonares, no qual foi isolada estirpe de *R. equi* de virulência intermediária (VapB). Nos EUA, Verville et al. (1994) investigaram detalhadamente a epidemiologia de 12 casos de rodococose humana, dos quais seis pacientes eram coinfectados com o vírus da Aids, e constataram

que dois tinham histórico de contato estreito com equinos e seu ambiente de criação, um com cão doméstico e outro com ambiente rural.

Evidências suportam que a transmissão de *R. equi* dos animais para os humanos estaria relacionada à exposição ao agente no ambiente, secundária à inalação ou por lesões transcutâneas (PRESCOTT, 1991; ADAL et al., 1995). Clinicamente, a rodococose manifesta-se nos pacientes por pneumonia cavitária crônica com derrame pleural. Secundariamente, são observados quadros extrapulmonares como abscessos renais, diarreia com sangue, caquexia, pleurisia, hepatopatias, peritonite, artrite séptica, osteomielite, linfadenite e meningite (BROWN, 1995; SEVERO e LONDERO, 1996).

R. equi multiplica-se ativamente no ambiente, tendo como exigência condições mínimas de temperatura, pH e umidade obtidas, principalmente, no solo e material fecal de animais. Multiplica-se em extremos de temperatura (15°C a 37°C), mas preferencialmente em ambientes quentes, o que explicaria a elevada ocorrência da doença em países de clima tropical. Diferenças entre as condições ambientais a cada ano, principalmente de temperatura, poderiam justificar variações anuais e sazonais nas infecções pela bactéria em animais (PRESCOTT, 1991).

No Brasil, Fernandes et al. (2013) investigaram a virulência de 23 linhagens de *R. equi* isoladas de 200 amostras de areia de parques e praças, públicas e privadas, do interior do estado de São Paulo. Em nenhuma destas linhagens foram detectados plasmídeos VapA ou VApB. Os autores aventaram a possibilidade de veiculação fecal das estirpes de *R. equi* por pássaros da fauna nacional, que poderiam justificar a presença do patógeno na areia nos parques públicos, e principalmente nos privados sem acesso a animais domésticos. Apesar da emergência da doença, são escassos os estudos no Brasil investigando os mecanismos de virulência de estirpes de *R. equi* isoladas dos animais e humanos.

Ribeiro et al. (2006) revelaram a presença de estirpes virulentas (VapA) 41 linhagens isoladas de potros no estado de São Paulo, enquanto Farias et al. (2007) relataram a virulência (VapA) de *R. equi* em gato com infecção cutânea. Recentemente, foi investigada a virulência de estirpes de

R. equi isoladas de 20 humanos no Brasil. Destes, nove linhagens eram provenientes de pacientes HIV - positivos, seis de HIV - negativos e cinco de status desconhecido. Foram detectadas cinco linhagens VapB (todas em pacientes com Aids), quatro VapA e onze avirulentas. Dentre os 20 indivíduos, onze tinham histórico de contato com ambiente rural e/ou animais de produção (bovinos, equinos). Os autores destacaram a necessidade de novos estudos de epidemiologia molecular com *R. equi* no intuito de esclarecer o impacto de linhagens avirulentas na doença no Brasil, incluindo em pacientes sem contato com animais domésticos, que poderiam ter se infectado com isolados oriundos do ambiente (RIBEIRO et al., 2011b).

Dentre a literatura consultada, não existe, até o momento, nenhum estudo no país que tenha investigado a virulência de *R. equi* isoladas de fezes de aves silvestres, que possibilitasse a comparação com o perfil de virulência de estirpes humanas ou de outros animais. O reconhecimento dos antígenos de virulência do micro-organismo e a sua utilização como marcadores de patogenicidade têm permitido avanços significativos na identificação do perfil de virulência e de novas variantes da bactéria, e são imprescindíveis no entendimento da epidemiologia, patogenia, controle e reflexos em saúde pública da doença (RIBEIRO et al., 2007).

2.4. Coronavírose

Os vírus da família *Coronaviridae* estão classificados na ordem *Nidovirales* e são subdivididos em três sorogrupos (grupos I, II, III), classificados com base no hospedeiro natural, reações sorológicas e técnicas moleculares (FLORES, 2007). O grupo I está envolvido em manifestações entéricas e respiratórias em suínos, gastroenterite em cães e peritonite em felinos. O grupo II causa resfriado em humanos, encefalite e gastroenterite em suínos, hepatite em camundongos e sinais de enterite em bovinos e perus, enquanto o grupo III provoca traqueobronquite e nefrite em aves (FLORES, 2007).

Os coronavírus são vírus RNA envelopados. Possuem o maior

genoma conhecido entre os vírus RNA. Os vírions possuem forma esférica, entre 80 a 120 nanômetros (nm), circundados por projeções externas de aproximadamente 20nm de extensão, que conferem à partícula viral aparência similar a uma coroa (QUINN et al., 2005). Este grupo de vírus são inativados por solventes lipídicos, agentes oxidantes, formaldeído, detergentes e desinfetantes comuns. Apresentam grande sensibilidade ao calor e ao pH ácido, e podem permanecer viáveis em pH 3 (GREENE, 2012). Gundy et al. (2009) avaliaram a viabilidade do coronavírus em água parada e água de esgoto a 4°C e 23°C, e observaram presença de partículas virais viáveis por mais de 100 dias na água a 4°C, 10 dias na água a 23°C e entre 2 a 4 dias na água de esgoto.

O gênero *Coronavírus* apresenta complexo mecanismo de replicação viral, que inclui a produção de RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos, gerando alta frequência de recombinações, grande variação antigênica e a existência de vários sorotipos. Além disso, os coronavírus sofrem mutações frequentes no seu genoma, decorrentes de erros cometidos pela RNA polimerase e deleções no genoma de vírus pré-existentes (FLORES, 2007).

Os coronavírus podem infectar várias espécies de aves e de mamíferos. Apresentam tropismo por células epiteliais intestinais e respiratórias. As infecções podem ser graves em animais jovens e nos adultos, mas comumente são brandas ou inaparentes (QUINN et al., 2005).

O interesse por este grupo viral aumentou recentemente com a classificação de um novo coronavírus humano, o agente causal da pneumonia asiática (SARS-COV). Antes do reconhecimento deste coronavírus nos humanos, os patógenos deste gênero estavam relacionados principalmente a resfriados de evolução benigna (FLORES, 2007). Os coronavírus não são estritamente espécie-específicos e podem infectar novas espécies. Desta forma, postula-se a possibilidade de infecções cruzadas entre animais e humanos, incluindo aves silvestres ou selvagens. Neste contexto, estudos voltados à detecção de coronavírus em aves silvestres ou selvagens assumem importância na vigilância epidemiológica da SARS em humanos.

Montassier et al. (2013) investigaram a presença de coronavírus do

grupo 3 em 29 aves silvestres da região nordeste do Estado de São Paulo, distribuídas em 18 espécies e 12 famílias. Os resultados evidenciaram que 3 das 29 aves pertencentes às espécies *Coragyps atratus* (Urubu de cabeça preta), *Passer domesticus* (pardal) e *Zenaida auriculata* (Pomba de bando), foram positivas para a presença de coronavírus semelhante ao vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI).

2.5. Rotavirose

Os rotavírus são reconhecidos mundialmente como um dos principais vírus entéricos para humanos e animais. Estão amplamente distribuídos na natureza e acometem grande diversidade de hospedeiros, incluindo mamíferos domésticos, silvestres e aves (ACHA e SZYFRES, 2003).

As partículas destes vírus quando observadas na microscopia eletrônica apresentam aparência de “roda”, fato que motivou a denominação rotavírus. Os vírions medem cerca de 85nm de diâmetro e não possuem envelope. São os únicos vírus de mamíferos e aves que possuem 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) no genoma e com diferentes tamanhos. A diferença de tamanho permite caracterizar o perfil de migração singular dos segmentos genômicos para os rotavírus quando separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Cada segmento codifica pelo menos uma proteína viral, totalizando seis proteínas estruturais e seis não estruturais. O segmento 11 do genoma é o único que codifica mais de uma proteína. No núcleo viral estão presentes as proteínas VP1, VP2 e VP3. No capsídeo intermediário localiza-se a VP6 e, no capsídeo externo, a VP4 e VP7 (QUINN et al., 2005).

Os rotavírus podem ser classificados em sete sorogrupos, designados pelas letras A a G, segundo diferenças antigênicas da proteína VP6, como também pelo padrão eletroforético de migração dos 11 segmentos genômicos. Os grupos A, B e C são encontrados tanto em humanos quanto em animais, enquanto os grupos D e G são identificados exclusivamente em animais. As proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7

permitem também a caracterização do vírus em sorotipos e/ou genótipos. Dessa forma, o rotavírus possui sistema binário de classificação, constituído por tipos de VP4 e tipos de VP7. Atualmente, são reconhecidos mais de 27 diferentes tipos de VP4 e VP7 e mais de 405 combinações possíveis entre os diferentes genótipos (ACHA e SZYFRES, 2003; FLORES, 2007). A diversidade antigênica dos rotavírus ocorre devido a mutações pontuais (substituições de aminoácidos das proteínas), de reassortimento (troca de segmentos genômicos por cepas diferentes ao coinfecarem uma célula) e de rearranjos genômicos (deleções ou duplicações em porções de um segmento genômico) (FLORES, 2007).

Os rotavírus mantêm a infectividade em pH entre 3 e 9. São relativamente estáveis em condições ambientais e podem se manter viáveis por meses nas fezes. São sensíveis a formalina, cloro, betapropiolactona, etanol (95%) e glutaraldeído (GREENE, 2012).

Os enterócitos dos animais jovens são altamente susceptíveis à infecção devido ao desenvolvimento completo do ciclo replicativo e a produção de progênie viral (RADOSTITS et al., 2007; FLORES, 2007). Clinicamente, as infecções nos animais manifestam-se por diarreia, desidratação, desequilíbrio eletrolítico e acidose, acometendo principalmente animais jovens durante o primeiro mês de vida, o que acarreta grandes perdas econômicas nas criações comerciais. Em adultos, a infecção geralmente é assintomática, porém podem se tornar portadores e transmitir o vírus para os animais jovens. A transmissão da rotavirose ocorre via oral-fecal pela água, alimentos e fômites contaminados (ACHA e SZYFRES, 2003; RADOSTITS et al., 2007; GREENE, 2012).

Os rotavírus são predominantemente espécie-específicos. Entretanto, infecções heterólogas são relatadas com grande frequência. Cepas virais que são geneticamente relacionadas com vírus de origem bovina, suína, canina, felina e aviária têm sido isoladas de crianças com infecções sintomáticas ou assintomáticas. Ademais, combinações genotípicas comumente associadas com cepas de rotavírus do grupo A de origem humana têm sido identificadas em animais (FLORES, 2007).

O Center for Disease Control - CDC (CDC, 1991) dos EUA,

examinaram amostras fecais de crianças por 23 meses e 20% das amostras foram positivas para rotavírus, com maior incidência nos meses de inverno. No Brasil, foram analisadas 557 amostras fecais de crianças hospitalizadas em Goiânia, com ou sem gastroenterite. No grupo de crianças com diarreia foi encontrado 29,2% de amostras positivas, enquanto no grupo sem diarreia 4,1% foram positivas (CARDOSO et al., 1992).

Veronesi e Focaccia (1996) referiram a participação de rotavírus na etiologia das diarreias em comunidades indígenas da Amazônia e ressaltaram alguns aspectos singulares, como a rápida disseminação dos surtos epidêmicos, o acometimento de todas as faixas etárias com severidade clínica, e a existência de animais silvestres como reservatórios ou portadores do vírus entre esses silvícolas.

Silva et al. (2013) analisaram 85 amostras fecais de frangos de corte (*Gallus gallus*), provenientes de 37 granjas aviárias no Brasil. No total, das 85 amostras fecais, 35 (41,2%) mostraram-se positivas para Rotavírus. Foram encontrados 19 (51,4%) aviários com pelo menos um galpão positivo para rotavírus aviário. No entanto, poucos estudos têm investigado rotavírus em aves da fauna nacional.

A maioria dos estudos no Brasil envolvendo a identificação de patógenos de eliminação fecal em aves da fauna nacional estão restritos a um agente. Devido à complexidade destes agentes no ambiente entérico, a possibilidade de coinfeções e o potencial zoonótico de muitos destes micro-organismos, são necessários estudos que avaliem, simultaneamente, os principais patógenos de eliminação fecal em aves da fauna brasileira, visando avaliar o impacto destes patógenos como agentes de diarreia, a virulência destes micro-organismos, assim como a participação destes animais na transmissão de patógenos de potencial zoonótico para os humanos. Neste cenário, o presente estudo investigou a ocorrência de patógenos de origem bacteriana e viral e marcadores de virulência de *E. coli* e *R. equi* isolados das fezes de aves da fauna brasileira.

3. OBJETIVOS

Geral:

Verificar a ocorrência de patógenos de origem bacteriana e viral, de potencial zoonótico, presentes nas fezes de aves silvestres de cativeiro, sem sinais entéricos, da fauna brasileira, bem como investigar marcadores de virulência de *E. coli* e *R. equi*

Específicos:

- ✓ Investigar a ocorrência de *R. equi*, *E. coli*, *Salmonella* spp., coronavírus e/ou rotavírus na microbiota intestinal de aves pertencentes à fauna brasileira;

- ✓ Detectar a presença de marcadores de virulência (genes *vapA* e *vapB*) em linhagens de *R. equi*;

- ✓ Investigar a presença de diferentes citotoxinas, enterotoxinas e fatores de colonização em linhagens de *E. coli* (*hly*, *cnf-1*, *cnf-2*, *vt1*, *vt2*, *papC*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *fim H*, *iucD*, *k88*, *sfa*, *afa* e *usp*).

- ✓ Determinar os sorotipos patogênicos nos isolados do gênero *Salmonella*;

- ✓ Detectar a presença de material genético de Coronavírus e Rotavírus na microbiota intestinal das aves.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Locais de colheita de material

As amostras de fezes para o estudo foram colhidas exclusivamente de aves silvestres ou sinantrópicas pertencentes à fauna brasileira, no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)-UNESP/ Botucatu, SP, e de criadores que possuem animais registrados pelo IBAMA na cidade de Botucatu, SP. As amostras foram colhidas também no Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” (PZMQB), em Sorocaba, SP.

4.2. Colheita de material e universo amostral

Foram colhidas 152 amostras de fezes de aves silvestres de cativeiro, diretamente da cloaca, utilizando suabes esterilizados, após contenção mecânica (rede), de acordo com os preceitos recomendados para a espécie. Nas aves de pequeno porte, foram utilizados plásticos esterilizados que suportassem temperatura de autoclave, do tamanho do fundo de gaiolas comuns de aves. Para colheita, estes plásticos esterilizados foram retirados da embalagem e dispostos no fundo de uma gaiola vazia. Imediatamente, esta gaiola foi justaposta (com as portinholas abertas) à gaiola da ave objeto de colheita. Instintivamente, os animais tendem a passar para a gaiola vazia, defecando no plástico esterilizado. Este plástico imediatamente era removido, e o material fecal nele presente acondicionado no meio de Stuart utilizando suabe estéril, mantido em condições de refrigeração (4 a 8°C) e levado imediatamente ao laboratório.

As amostras foram colhidas de diferentes espécies de Psitaciformes e Passeriformes pertencentes à fauna brasileira, em animais de cativeiro, apreendidos e/ou vitimados de maus-tratos. As amostras de fezes foram identificadas e acondicionadas em refrigeração (4 a 8°C), processadas para as diferentes técnicas microbiológicas em no máximo 48 horas após a colheita. Os suabes foram submersos em tubos contendo 5 mL de solução esterilizada de água bidestilada, e agitados em Vortex por dois minutos. Uma alíquota deste

material foi utilizada nos exames bacteriológicos e o restante congelado (-20°C), visando a realização dos exames virológicos.

O tamanho amostral para demonstrar a presença de cada patógeno na população de aves disponíveis para amostragem (população finita), de acordo com os métodos descritos por Dohoo et al. (2010), indicaram a colheita de no mínimo 58 aves, conforme o Quadro 1. Os cálculos foram baseados estimando uma prevalência de 5 a 10%, sensibilidade do teste diagnóstico = 90% e nível de confiança = 95%.

Quadro 1. Cálculo de tamanho amostral, considerando a prevalência e o tamanho da população de aves silvestres/sinantrópicas, para expectativa de população disponível visando análise de 200 aves. Botucatu, SP, 2012-2013.

	Prevalência = 0,02	Prevalência = 0,03	Prevalência = 0,04	Prevalência = 0,05	Prevalência = 0,1	Prevalência = 0,2
População = 50	–	44	44	36	26	15
População = 100	87	71	59	51	29	16
População = 200	118	88	70	58	31	17
População = 300	132	95	74	61	32	17

4.3. Autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA

A autorização para atividades com finalidade científica foi concedida pelo IBAMA, através do sistema SISBIO, obtendo-se a numeração 33530-1.

4.4. Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) FMVZ- UNESP/ Botucatu, SP

O presente projeto foi submetido ao CEUA (protocolo número 49/2012) e foi aprovado, visto que não fere os preceitos éticos e de uso de animais na condução de estudos científicos.

5. EXAMES BACTERIOLÓGICOS

5.1. Diagnóstico de *Rhodococcus equi*

5.1.1. Cultivo microbiológico

O material fecal foi cultivado em meio de CAZ-NB (ceftazidima, novobiocina e cicloheximida), incubado a 30°C, por 48 a 72 horas (MUSCATELLO et al., 2007). Simultaneamente, o mesmo material foi semeado em meio de Ágar acrescido de sangue ovino (5%), desfibrinado, mantido em aerobiose, a 37°C, por 48 a 72 horas (QUINN et al., 1994, 2005, 2011).

5.1.2. Caracterização microbiológica de linhagens de *R. equi*

Após o cultivo em Ágar sangue e CAZ-NB, colônias suspeitas de *R. equi* foram identificadas com base nas características morfo-tintoriais (coloração de Gram), de cultivo (WOOLCOCK et al., 1979) e bioquímicas, incluindo as reações de catalase, oxidase, redução de nitrato, urease e utilização de substratos (glicose, maltose e sacarose), assim como colorações específicas para ácido-resistência, como o método de Ziehl-Neelsen modificado (QUINN et al., 1994, 2005). A identificação fenotípica de *R. equi* foi realizada no laboratório de Diagnóstico microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. As estirpes isoladas foram mantidas no meio de Lignières, em temperatura ambiente (25°C), em tubos de vidro com tampa de borracha, até o momento do processamento.

5.1.3. Determinação de antígenos e plasmídios de virulência

5.1.3.1. Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi obtido pelo método de lise alcalina. O material genético extraído dos isolados foi analisado pela digestão com enzimas de restrição (*Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RI e *Eco*T22I), visando a determinação do tamanho plasmidial: 85 a 90kb para linhagens virulentas (VapA), 79 a 100kb para linhagens de virulência intermediária (VapB) e avirulentas com ausência

de VapA e VapB (BIRNBOIM & DOLY, 1979; TAKAI et al., 1993). A detecção molecular dos genes *vapA* (virulentos), *vapB* (virulência intermediária) e avirulentos (ausência dos genes *vapA* e *vapB*) foram realizadas na Universidade de Kitasato, no Japão, sob a responsabilidade do Prof. Shinji Takai. Os isolados foram enviados para o Japão em meio de Lignières, em temperatura ambiente, em tubos devidamente lacrados e identificados, acompanhados das respectivas autorizações para a exportação e importação de micro-organismos, do Serviço de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasil e do Ministério da Agricultura e Pesca do Japão.

5.1.3.2. Reação em cadeia pela polimerase

A amplificação do material genético foi realizado em 10µl de DNA preparado em 50µl de volume contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,3, a 25°C), 50 mM de KCl, 0,2 mM de desoxinucleotídios trifosfatos, 1,5 mM de MgCl², 2,5U de *Taq* DNA-polimerase e 1mM de cada primer. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de amplificação, segundo as seguintes condições: desnaturação por 90 segundos a 94°C; anelamento por 1 minuto a 55°C, e extensão por 2 minutos a 72°C. A detecção de sequências de genes de antígenos virulentos ou *vapA* (15–17 kDa) foi realizada utilizando o *primer* 1 (5'–GACTCTTCACAAGACGGT–3') e *primer* 2 (5'–TAGGCGTTGTGCCAGCTA–3'), visando a amplificação de sequência entre 569 e 552 pares de base. Para estirpes de virulência intermediária ou *vapB* (20 kDa) foram utilizados o *primer* 3 (5'–AACGTAGTCGCGGTGAGAA–3') e primer 4 (5'–ACCGAGACTTGAGCGACTA–3'), para amplificação gênica entre 240 e 258 pares de base (TAKAI et al., 1995a,b). Os primers, *Taq* polimerase e cepas–controle foram cedidos pelo Prof. Shinji Takai da Universidade de Kitasato, Japão.

5.2. Diagnóstico de *Escherichia coli*

5.2.1. Caracterização microbiológica

O material fecal foi cultivado em meio seletivo de ágar MacConkey, mantido em condições de aerobiose, a 37°C, por 48 horas. Colônias suspeitas de *E. coli* foram identificadas segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (KRIEG e HOLT, 1994), no laboratório de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, utilizando os meios de MILI (motilidade, indol e lisina), citrato e da Escola Paulista de Medicina – EPM (glicose, gás, LTD, H₂S, uréase) (TRABULSI et al., 1999). A partir da identificação, todas as linhagens foram mantidas em ágar Lignières (25°C), no mesmo laboratório, até a avaliação dos fatores de virulência.

5.2.2. Detecção genotípica de linhagens de *E. coli* produtoras de intimina e/ou toxinas

5.2.2.1. Controles positivos

Como controles positivos para os fatores de virulência foram utilizadas as seguintes cepas padrão: O157:H7 (*fimH*, *vt2*), 039 (*hly*, *sfa*, *cnf-1*), H30 (*eae*), 023 (*vt1*, *papGIII*, *papC*, *hly*, *usp*, *sfa*, *cnf-1*), 024 (*papC*), 044 (*afa*, *iuc*), 06 (*papGI*, *papC*, *hly*, *sfa*, *cnf-1*), 021 (*papGII*, *papC*, *hly*, *iuc*, *usp*), 073 (*k88*). Todas as cepas controles foram cedidas pelo Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, do Laboratório de Antígenos Bacterianos, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da UNICAMP, Campinas, SP

5.2.2.2. Obtenção de DNA para PCR

O método para obtenção de DNA foi realizado conforme descrito por Blanco et al. (1997). A totalidade das linhagens foi cultivada em caldo cérebro coração (BHI), a 37°C, “over night”. Em seguida, as estirpes foram semeadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar), a 37°C, por 24 horas, para crescimento confluyente. Um raspado de cada uma das linhagens foi suspenso em 100 µL de água ultra-pura estéril. Estas suspensões foram fervidas por 10 minutos e

centrifugadas a 9676,8g (12.000 rpm) por 3 minutos (centrífuga Sorvall®, MC12). Após a centrifugação, foram utilizados os sobrenadantes destes materiais para as reações de PCR.

5.2.2.3. Amplificação do DNA (PCR)

Para a PCR foram utilizados *primers* específicos para cada um dos genes: *vt1*, *vt2* (verotoxinas dos tipos 1 e 2), *papC* (proteína de membrana externa da fímbria P), *papGI/GII/GIII* (alelos da adesina papG), *sfa* (gene codificador da fímbria S), *afa* (gene codificador de adesina afimbrial), *hlyA* (proteína estrutural hemolítica), *iucD* (oxigenase responsável pela biossíntese da aerobactina), *eae* (gene codificador para eae – *E. coli* attachment and effacing), *cnf-1* (citotoxina CNF-1), *fimH* (gene codificador de fímbria H), *usp* (proteína específica uropatogênica) e *k88* (antígeno capsular).

A Tabela 1 mostra os reagentes e respectivas quantidades utilizadas nas reações. O Quadro 2 apresenta a sequência de iniciadores, peso molecular e temperatura de anelamento das reações de cada fator de virulência investigado de *E. coli*.

Tabela 1. Reagentes para as reações de PCR para detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas das fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.

Reagentes	Volume (μ L)	Concentração final
Água ultra-pura estéril (qsp)	30	-----
10X "PCR Buffer" (Fermentas)	3	1X
10mM "dNTP mixture" (Fermentas)	0,6	0,2 mM cada
<i>primer 1</i>	*	-----
<i>primer 2</i>	*	-----
50mM MgCl ₂ (Fermentas)	1,2	2,0 mM
DNA extraído	7	-----
"Taq-DNA Polimerase" (Fermentas)	1	1,0 U
TOTAL	30	-----

*Os iniciadores foram preparados em uma concentração de 30 ng/ μ l. De acordo com a necessidade de iniciadores para as reações de PCR foram utilizadas 1, 2 ou 3 vezes da concentração inicial.

Quadro 2. Iniciadores utilizados para detecção de diferentes fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas das fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')	TA* (°C)	Produto amplificado (pb)	Quantidade iniciadores/ reação (ng/μg)	Referências
<i>cnf1</i>	CNF1: GAA CTT ATT AAG GAT AGT CNF2: CAT TAT TTA TAA CGC TG	63	543	90	Blanco et al. (1997)
<i>hlyA</i>	1: AAC AAG GAT AAG CAC TGT TCT GGC T 2: ACC ATA TAA GCG GTC ATT CCC GTC A	63	1.177	60	Yamamoto et al. (1995)
<i>papC</i>	1: GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G 2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A	60	328	60	Daigle et al. (1994)
<i>papGI</i>	1: CAA CCT GCT CTC AAT CTT TAC TG 2: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT	63	692	60	Karkkainem et al. (1998)
<i>papGII</i>	1: GGA ATG TGG TGA TTA CTC AAA GG 2: TCC AGA GAC TGT TCA AGA AGG AC	63	562	60	Karkkainem et al. (1998)
<i>papGIII</i>	PG1: CAT GGC TGG TTG TTC CTA AAC AT PG2: TCC AGA GAC TGT GCA GAA GGA C	63	421	60	Karkkainem et al. (1998)
<i>fimH</i>	A: TGC AGA ACG GAT AAG CCG TGG B: GCA GTC ACC TGC CCT CCG GTA	63	508	60	Johnson, J. R. (1991)
<i>afa</i>	1: GCT GGG CAG CAA ACT GAT AAC TCT C 2: CAT CAA GCT GTT TGT TCG TCC GCC G	76	750	60	Yamamoto et al. (1995)
<i>sfa</i>	1: CGG AGG AGT AAT TAC AAA CCT GGC A 2: CTC CGG AGA ACT GGG TGC ATC TTA C	63	410	90	Daigle et al. (1994)
<i>iucD</i>	A: TAC CGG ATT GTC ATA TGC AGA CCG T B: AAT ATC TTC CTC CAG TCC GGA GAA G	63	602	60	Yamamoto et al. (1995)
<i>usp</i>	A: ATG CTA CTG TTT CCG GGT AGT GTG T B: CAT CAT GTA GTC GGG GCG TAA CAA T	66	1000	60	Nakano et al. (2001)
<i>vt1</i>	A: AAG TTG CAG CTC TCT TTG AAT A B: TGC AAA CAA ATT ATC CCC TGA G	53	364	90	Yamamoto et al. (1995)
<i>vt2</i>	A: GGG CAG TTA TTT TGC TGT GGA B: GTA TCT GCC TGA AGC GTA A	53	515	90	Yamamoto et al. (1995)
<i>eae</i>	A: GAC CCG GCA CAA GCA TAA GG B: CCA CCT GCA GCA ACA AGA GC	63	384	30	Blanco et al. (1997)
<i>k88</i>	A: TGA ATG ACC TGA CCA ATG GTG GAA CC B: GCG TTT ACT CTT TGA ATC TGT CCG AG	60	601	90	Gomes. (2012)

*TA: Temperatura de anelamento

As PCRs das soluções foram realizadas em termocicladores (GeneAmp[®], PCR System 9700 PE Applied Biosystems) programados para pré-aquecimento a 94°C/05 minutos e 30 ciclos, como segue: 94°C/1 minuto, temperatura de anelamento de acordo com o gene pesquisado, temperatura de extensão 72°C/1 minuto, seguida por 72°C/ 7 minutos.

5.2.2.4. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado em concentração 1,2% em TAE. As bandas foram identificadas após incubação em solução de brometo de etídio (1,5 µg/mL) por 15 minutos e visualizadas em transiluminador de luz UV. Os géis foram fotografados e as imagens capturadas.

5.5.5.5. Filogenia

A classificação filogenética das linhagens de *E. coli* foi realizada em PCR-Multiplex, conforme Clermont et al. (2000). Foi utilizado um par de primers para cada gene *chuA* (gene necessário para o transporte do grupo heme da hemoglobina na *E. coli* enterohemorrágica O157:H7) e *yjaA* (um gene inicialmente identificado de *E. coli* K12 com função desconhecida) ou TspE4.C2 (fragmento anônimo de DNA) (Quadro 3). O protocolo supracitado permitiu a classificação das cepas nos grupos filogenéticos A e B1 (comensais), B2 e D (extraintestinais). Como padrões positivos para o gene *chuA* foram utilizadas as cepas J96 e/ou 5925. Para *yjaA* foram utilizadas as cepas O157:H7, 2348/69 e/ou J96, enquanto para TsPE4.C2 somente a cepa 2348/69.

Quadro 3. Iniciadores utilizados para classificação filogenética de linhagens de *Escherichia coli* isoladas das fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5' - 3')	TA (°C)	Produto amplificado (pb)	Quantidade iniciadores/ reação (ng/mg)
<i>ChuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT TGCCGCCAGTAGGAAAGACA	55	279	30
<i>YjaA</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG ATGGAGAATGCGTTCTCAAC	55	211	30
<i>TspE4.C2</i>	GAGTAATGTCGGGGCATTCA CGCGCCAACAAAGTATTACG	55	152	30

*Classificação proposta por CLERMONT et al.,(2000).

TA: temperatura de anelamento

pb: pares de bases

°C: grau centígrado

ng/MG: nanograma/ miligrama

5.3. Diagnóstico de *Salmonella*

5.3.1. Caracterização microbiológica de *Salmonella* spp.

Foram utilizados 1 mL de fezes aliquotadas à partir dos suabes, diluídas em 24 mL de água bidestilada esterilizadas e homogeneizado em “stomacher” por 2 minutos. Aproximadamente 1 mL da amostra diluída foi transferida para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Tetrionato (TT). A incubação foi realizada a 35°C, por 18 a 24 horas. Em seguida, os caldos de enriquecimento seletivo foram cultivados com alça de níquel-cromo, na superfície de placas contendo ágar *Salmonella / Shigella* (SS), com incubação a 35°C, por 18 a 24h. Colônias compatíveis com o gênero *Salmonella* foram submetidas a testes bioquímicos: produção de indol, reação de Vermelho de Metila e de Voges-Proskauer, utilização de citrato, produção de urease, utilização de glicose e lactose, observação do movimento e produção de fenilalanina desaminase (ANDREWS et al., 1998).

5.3.2. Teste de aglutinação com soro polivalente e caracterização de sorotipos

Foi utilizado o teste de aglutinação gênero-específica em lâmina nas linhagens caracterizadas fenotipicamente como *Salmonella* sp. Utilizou-se o soro polivalente comercial anti-*Salmonella* somático, de acordo com as recomendações do fabricante¹.

Os resultados foram expressos em ausência ou presença de *Salmonella* spp. As linhagens caracterizadas como *Salmonella* nos testes bioquímicos e com aglutinação positiva em lâmina foram encaminhadas para caracterização de sorotipos (POPOFF e LE MINOR, 1992), na Fundação Oswaldo Cruz, RJ.

6. EXAMES VIROLÓGICOS

6.1. Diagnóstico de Coronavírus bovino (BcoV)

6.1.1. Reação de Transcriptase Reversa

Todas as amostras de fezes foram submetidas ao diagnóstico de coronavírus bovino utilizando a reação de transcrição reversa, seguida por reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) dirigida à amplificação de segmento de 179 pares de bases da ORF1b, codificadora da RNA-polimerase RNA - dependente viral (ESCUTENAIRE et al., 2006).

6.1.2. Extração de RNA

O RNA total foi extraído do sobrenadante das suspensões da amostra utilizando-se Trizol Reagent (InvitrogenTM), de acordo com as instruções do fabricante. A cepa padrão Kakegawa de BCoV foi utilizada como controle positivo e água-DEPC (Dietilpirocarbonato) como controle negativo.

¹ Probac do Brasil. Produtos Bacteriológicos Ltda. São Paulo, SP

6.1.3. Síntese de cDNA (Transcrição-Reversa)

Foram desnaturados 3,5µL do RNA extraído a 94°C durante 2 minutos e adicionados ao mix de transcrição reversa contendo 1 X First Strand Buffer (Invitrogen™), 10mM de cada dNTP, 10mM DTT, 50ng/ µl de primers randômicos e 200U/µl de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para reação final de 10µL, realizando a transcrição reversa a 37°C/60 minutos.

6.1.4. Amplificação

Foi utilizado volume de 2,5µL de cada respectivo cDNA e adicionado ao mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer (11FW e 13RV) (Quadro 4), 1,5mM MgCl₂, 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e água ultra-pura esterilizada para uma reação final de 25µL. As amostras foram submetidas a 5 ciclos de 94°C/1minuto, 40°C/1minutos e 72°C/1minuto, 35 ciclos de 94°C/1 minuto, 50°C/1 minuto e 72°C/1 minuto, seguidos por 72°C/10 minutos para extensão final.

Após a amplificação, 10µL foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e observado sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que resultaram em banda de 179 pb.

Quadro 4. Primers utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase para a detecção de coronavírus bovino, em amostras de fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.

Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon	Referência
11FW senso	TGATGATGSNGTTGTNTGYTAYAA	179pb	Alejo (2012)
13RV anti-senso	GCATWGTRTGYTGNGARCARAATTC	179pb	Alejo (2012)

6.1.5. Vírus de Referência

Como vírus de referência de coronavírus bovino foi utilizada a cepa Kakegawa (AKASHI et al., 1980), com título hemaglutinante de 256. A detecção de Coronavírus foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ – USP, São Paulo, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

6.2. Diagnóstico de Rotavírus

6.2.1. Extração de RNA

O RNA total foi extraído do sobrenadante das suspensões das amostras utilizando Trizol Reagent (Invitrogen TM) de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizada a amostra Nebraska Calf Diarrhea Vírus (NCDV), (WHITE et al., 1970) como controle positivo e água-DEPC como controle negativo.

6.2.2. Síntese de cDNA (Transcrição-Reversa)

Foram desnaturados 3,5µL do RNA extraído a 94°C durante 2 minutos e adicionados ao mix de transcrição reversa contendo 1 X First Strand Buffer (Invitrogen TM), 10mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada primer (ROT1 e ROT2) (Quadro 5) e 200U/µl de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen TM) para reação final de 10µL, realizando a transcrição reversa a 37°C/60 minutos.

6.2.3. Primeira amplificação

Foi utilizado volume de 2,5µL de cada respectivo cDNA e adicionado ao mix de PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen TM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer (ROT1 e ROT2), 1,5mM MgCl₂, 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen TM) e água ultra-pura esterilizada para uma reação final

de 25µL. As amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94°C/ 30 segundos, 50°C/ 30 segundos, 72°C/ 45 segundos e 75°C/ 5 minutos para extensão final.

6.2.4. Segunda amplificação

Foram adicionados 2,5µL do produto da primeira amplificação ao mix de nested-PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer ROT 1 e ROT3 (Quadro 5), 1,5mM de MgCl₂, 0,625U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e água ultra-pura esterilizada para uma reação final de 25µL. As amostras foram submetidas a 35 ciclos de 94°C/ 30 segundos, 55°C/ 30 segundos e 72°C/ 45 segundos, seguidos de 72°C/ 5 minutos para extensão final.

A cada três amostras adicionadas na reação de nested foi acrescido um tubo contendo água ultra-pura esterilizada para o monitoramento de contaminações, também adicionada de mix de nested PCR e levado ao termociclador. Após a reação de nested, 10µL foram analisados em eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e observado sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que resultaram em banda de 228 pb.

Quadro 5. Sequência de oligonucleotídeos para a detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.

Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon	Referência
ROT1 (senso)	CTCTGGCAAARCTGGTGTCA	492pb	Asano et al. (2010)
ROT2 (anti-senso)	CATTTCGACGCTGATGACATY	492pb	Asano et al. (2010)
ROT3 (anti-senso)	ARCAATCRACCAACCASTCCTGTA	228pb	Asano et al. (2010)

6.2.5. Vírus de referência

Como vírus de referência de rotavírus foi utilizada a cepa NCDV (WHITE et al., 1970) mantida em células da linhagem MA-104 (rim fetal de macaco *Rhesus*). A identificação de Rotavírus foi realizada no VPS da FMVZ-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre a presença dos diferentes micro-organismos isolados em Passeriformes e Psitaciformes, e a detecção dos fatores de virulência de *E. coli* e *R. equi* foram avaliados utilizando o teste de Qui-quadrado (Exato de Fisher), utilizando o programa EPI-INFO (versão 6.04), considerando diferença significativa para valores de $p < 0,05$ (DEAN et al., 1994).

8. RESULTADOS

Foram colhidas 152 amostras de fezes de 152 aves silvestres de cativeiro diferentes, da fauna nacional. Apesar do cálculo amostral indicar no mínimo 58 aves, foram colhidas 152 amostras visando maximizar a identificação dos patógenos de eliminação fecal.

A Tabela 2 sumariza as aves utilizadas no presente estudo amostradas no CEMPAS, PZMQB e de aves anilhadas de criadores particulares do município de Botucatu, SP. A Tabela 3 apresenta a frequência de patógenos identificados nas fezes de diferentes espécies de aves da fauna nacional.

Tabela 2. Número e porcentagem de espécies de aves da fauna nacional anilhadas de criadores particulares de Botucatu, SP, do Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros” de Sorocaba, SP, e Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres da FMVZ – UNESP/ Botucatu, SP, utilizadas para identificação de patógenos bacterianos e virais nas fezes. Botucatu, SP, 2012-2013.

Espécies	Nome comum	n	Porcentagem
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	arara azul	4	2,63%
<i>Ara chloropterus</i>	arara vermelha	2	1,32%
<i>Guaruba guarouba</i>	ararajuba	1	0,66%
<i>Cyanoloxia brissonii</i>	azulão	12	7,89%
<i>Saltator fuliginosus</i>	bico-de-pimenta-do-campo	1	0,66%
<i>Saltatricula atricollis</i>	bico-de-pimenta	2	1,32%
<i>Sporophila lineola</i>	bigodinho	1	0,66%
<i>Sicalis flaveola pelzelni</i>	canário-chapinha	1	0,66%
<i>Sicalis flaveola brasiliensis</i>	canário-da-terra	4	1,97%
<i>Sporophila caerulescens</i>	coleirinho	7	4,61%
<i>Oryzoborus angolensis</i>	curió	16	10,53%
<i>Paroaria dominicana</i>	galo da campina	2	1,32%
<i>Primolius auricollis</i>	maracanã-de-colar	3	1,97%
<i>Pionus maximiliani</i>	maritaca	7	4,61%
<i>Pionus menstruus</i>	maritaca-de-cabeça-azul	1	0,66%
<i>Amazona aestiva</i>	papagaio verdadeiro	45	29,61%
<i>Amazona amazonica</i>	papagaio-do-mangue	7	4,61%
<i>Amazona vinacea</i>	papagaio-do-peito-roxo	4	2,63%
<i>Sporophila plumbea</i>	patativa	3	1,97%
<i>Aratinga cactorum</i>	periquito-da-caatinga	1	0,66%
<i>Aratinga nenday</i>	periquito-de-cabeça-preta	1	0,66%
<i>Sporagra magellanica</i>	pintassilgo	4	2,63%
<i>Saltator similis</i>	pixarro	11	7,24%
<i>Lanio cucullatus</i>	sangrinho	1	0,66%
<i>Thraupis sayaca</i>	sanhaço	1	0,66%
<i>Zonotrichia capensis</i>	tico-tico	2	1,32%
<i>Pyrrhura perlata</i>	tiriba-de-barriga-vermelha	1	0,66%
<i>Pyrrhura frontalis</i>	tiriba-de-testa-vermelha	5	3,29%
<i>Forpus xanthopterygius</i>	tuim	3	1,97%
Total geral		152	100,00%

n = número

% = porcentagem

Tabela 3. Frequência de patógenos de origem viral e bacteriana identificados nas fezes de diferentes espécies de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013

Espécie	Patógeno	Neg	Pos	Total	Neg(%)	Pos(%)
arara azul	<i>R. equi</i>	2	2	4	50	50
arara vermelha	-	2	-	2	100	0
ararajuba	<i>Rotavírus</i>	-	1	1	0	100
	<i>E. coli</i>					
azulão	<i>E. coli</i>	10	2	12	83,33	16,67
bico-de-pimenta-do-campo	-	1	-	1	100	0
bico-de-pimenta	<i>E. coli</i>	1	1	2	50	50
bigodinho	<i>E. coli</i>	-	1	1	0	100
canário - chapinha	-	1	-	1	100	0
canário-da-terra	-	3	-	3	100	0
coleirinho	<i>E. coli</i>	6	1	7	85,71	14,29
curió	-	16	-	16	100	0
galo da campina	-	2	-	2	100	0
maracanã-de-colar	<i>E. coli fim H</i>	2	1	3	66,67	33,33
	<i>Rotavírus</i>		2			
maritaca	<i>E. coli</i>	1	3	7	14,29	85,71
	<i>E. coli fimH</i>		1			
maritaca-de-cabeça-azul	-	1	-	1	100	0
	<i>E. coli</i>		7			
papagaio verdadeiro	<i>E. coli fimH</i>	20	17	45	44,44	55,56
	<i>E. coli eae</i>		1			
papagaio-do-mangue	<i>E. coli fimH</i>	2	5	7	28,57	71,43
papagaio-do-peito-roxo	<i>E. coli fimH</i>	2	1	4	50	50
	<i>E. coli eae</i>		1			
patativa	-	3	-	3	100	0
periquito-da-caatinga	-	1	-	1	100	0
periquito-de-cabeça-preta	<i>E. coli fimH</i>	-	1	1	0	100
pintassilgo	-	4	-	4	100	0
pixarro	<i>E. coli</i>	10	1	11	90,91	9,09
sangrinho	-	1	-	1	100	0
sanhaço	-	1	-	1	100	0
tico-tico	-	2	-	2	100	0
tiriba-de-barriga-vermelha	-	1	-	1	100	0
tiriba-de-testa-vermelha	<i>E. coli fimH</i>	4	1	5	80	20
tuim	-	3	-	3	100	0
Total geral		104	48	152	68,42	31,58

Pos = identificação positiva
E. coli = *Escherichia coli*
 % = porcentagem

Neg = identificação negativa
R. equi = *Rhodococcus equi*

A variável espécie foi categorizada e agrupada em apenas dois grupos distintos, relacionados a Ordem das aves pesquisadas: Passeriformes e Psitaciformes. Na Tabela 4 se observa a porcentagem de cultivos positivos e negativos relativos a Ordem das aves amostradas.

Tabela 4. Frequência identificação de patógenos de eliminação fecal em Passeriformes e Psitaciformes pertencentes a fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013

Ordem	Neg	Pos	Total	% Neg	%Pos	% Total
passer	72	9	81	69,23%	18,75%	53,29%
psita	32	39	71	30,77%	81,25%	46,71%
Total geral			152			100,00%

Valores de P menores que 0,05 indicam diferença significante entre identificação de patógenos nas ordens de aves amostradas, utilizando o teste do Qui-quadrado (Exato de Fisher).

Pos = identificação positiva

Neg = identificação negativa

passer = Passeriformes

psita = Psitaciformes

Houve diferença significante ($p < 0,05$) para a maior detecção de patógenos nas fezes dos Psitaciformes se comparado aos Passeriformes.

Segundo a regressão logística (razão das chances), com intervalo de confiança de 95% (entre 4,20 – 22,7), os Psitaciformes apresentam chance 9,7 vezes maior de apresentar os patógenos de eliminação entérica pesquisados se comparados aos Passeriformes.

Nas 152 aves foram isoladas 46 (30,26%) linhagens de *E. coli*, duas (1,32%) linhagens de *R. equi* e em três (1,97%) amostras foi detectado rotavírus bovino. O isolamento de *R. equi* foi obtido exclusivamente no meio seletivo de CAZ-NB. Em contraste, *Salmonella* sp. e Coronavírus não foram identificados em nenhuma das aves amostradas.

Houve tendência de maior identificação dos patógenos nas amostras de aves colhidas do grupo de Psitaciformes (Figura 1).

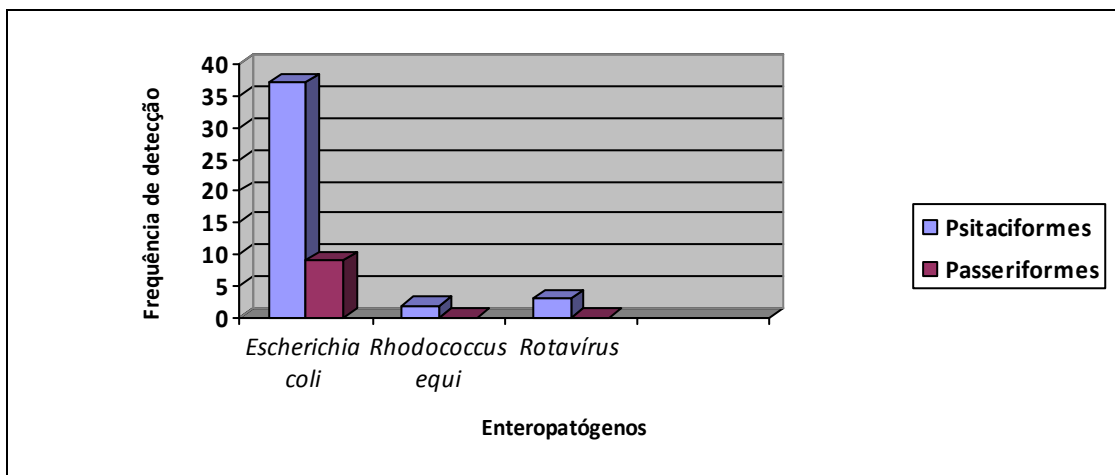


Figura 1: Frequência de detecção de diferentes patógenos de eliminação entérica em amostras de fezes de Passeriformes e Psittaciformes pertencentes a fauna nacional. Botucatu SP, 2012-2013.

Ocorreu maior identificação e diferença significativa ($p < 0,005$) para o isolamento de *E. coli* em Psittaciformes do que Passeriformes, visto que das 46 linhagens, 37 (80%) foram provenientes de fezes de Psittaciformes, enquanto 9 (20%) foram oriundas de Passeriformes. As duas linhagens de *R. equi* foram identificadas em araras azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*), enquanto que as três cepas de rotavírus também foram detectadas em Psittaciformes, uma em ararajuba (*Guaruba guarouba*) e duas em maritacas (*Pionus maximiliani*). No entanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos grupos estudados e a detecção de *R. equi* e Rotavírus, entre os Psittaciformes e Passeriformes.

A Figura 2 apresenta a porcentagem de amostras de fezes colhidas em cada local do estudo. A Figura 3 mostra a porcentagem de identificação dos diferentes patógenos de eliminação entérica, segundo o local de amostragem.

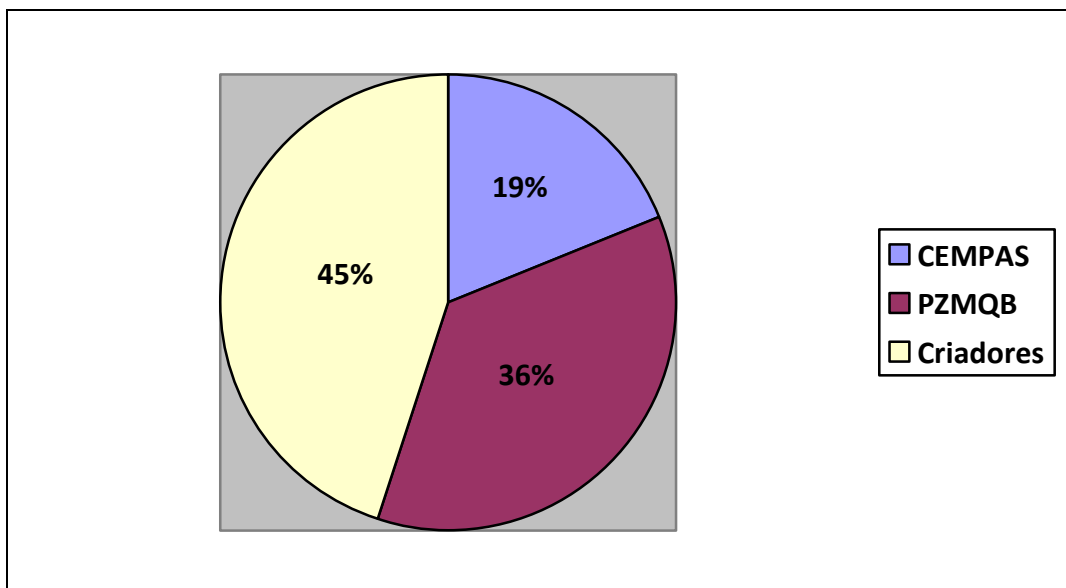


Figura 2: Porcentagem de colheita de material, proveniente de aves da fauna nacional, segundo o local de colheita. Botucatu, SP, 2012-2013.

CEMPAS = Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres

PZMQB = Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros"

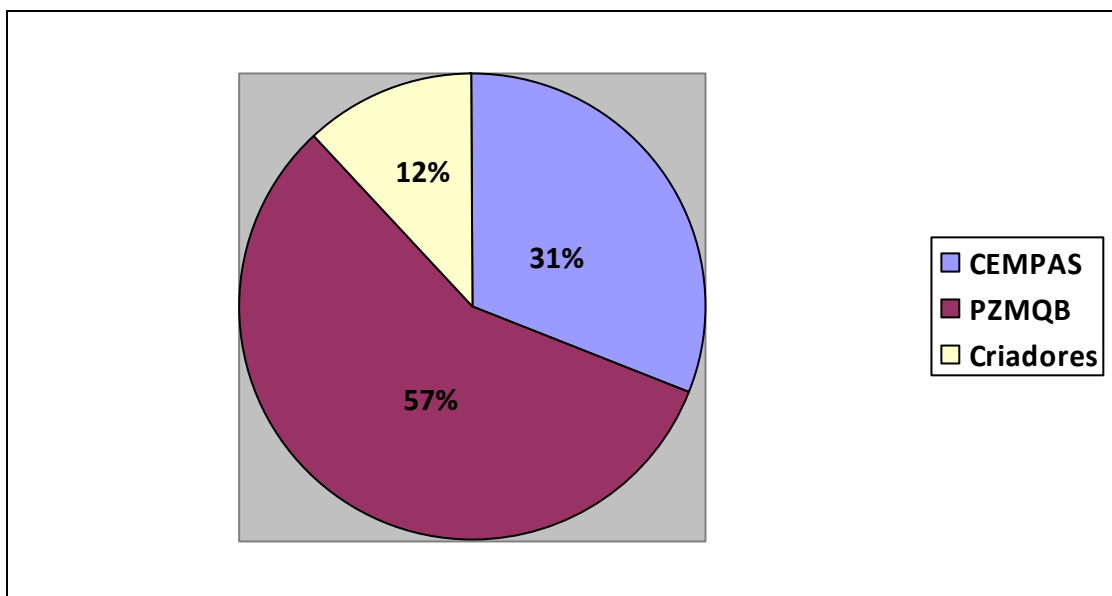


Figura 3: Porcentagem de isolamento de patógenos de eliminação fecal, segundo o local de colheita das amostras de aves da fauna nacional. Botucatu, SP, 2012-2013.

CEMPAS = Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres

PZMQB = Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros"

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a identificação de micro-organismos nas fezes das aves nos diferentes locais, com maiores valores no PZMQB em relação ao CEMPAS e aves amostradas de criadores de Botucatu, SP. A Tabela 5 ilustra a porcentagem de patógenos identificados, nos diferentes locais amostrados.

Tabela 5. Frequência de patógenos de eliminação entérica, segundo os diferentes locais de colheita de fezes de aves da fauna nacional. Botucatu SP, 2012-2013.

Espécie	CEMPAS	PZMQB	Criadores	Total
<i>Escherichia coli</i>	15/ 46 (32%)	25/46 (54%)	06/46 (14%)	100%
<i>Rhodococcus equi</i>	0%	02/ 02 (100%)	0%	100%
Rotavírus	0%	03/ 03 (100%)	0%	100%

A caracterização do perfil de virulência plasmidial (VapA, VapB) nas duas linhagens de *R. equi* revelou que em nenhum dos isolados foi detectado os genes *vapA* ou *vapB*, considerados avirulentos.

Na classificação em grupos filogenéticos das linhagens de *E. coli* foram obtidas 41 estirpes do grupo comensal A, 3 do grupo comensal B1 e 2 do grupo extraintestinal B2.

Dentre os marcadores de virulência das linhagens de *E. coli* isoladas das amostras de fezes das aves, em 27 (58,69%) linhagens foi detectado o gene da fímbria H (*fimH*) e em duas (4,34%) linhagens o gene *eae*. Os demais marcadores de virulência não foram identificados em nenhuma das linhagens de *E. coli*.

9. DISCUSSÃO

Houve a identificação incomum de *R. equi* e Rotavírus nas fezes das aves silvestres de cativeiro. *R. equi* são bactérias de comportamento oportunista, relacionadas à graves infecções piogranulomatosas nos humanos e animais. O micro-organismo é eliminado pelas fezes de aves silvestres/selvagens, principalmente de herbívoros e onívoros. Apesar da eliminação de *R. equi* pelas fezes principalmente por herbívoros, a bactéria não é considerada da microbiota entérica nestas espécies animais, transitando somente pelo trato intestinal após infecção oral, ou mesmo permanecendo no intestino por pequenos períodos, como em potros, nos dois primeiros meses de idade (PRESCOTT, 1991; TAKAI, 1997). Em animais selvagens e silvestres a doença clínica é rara, se manifestando sob a forma de enterite, linfadenite, abortamento, mastite, dermatite e/ou piometra (PRESCOTT, 1991).

No presente estudo foram identificadas duas linhagens de *R. equi* nas fezes de Psitacíformes. Dentre a literatura consultada, não foi possível encontrar registros sobre o isolamento de *R. equi* das fezes de aves da fauna brasileira. O sucesso no isolamento de *R. equi* das fezes das aves amostradas pode ser creditado ao uso do meio seletivo CAZ-NB, indicado para o isolamento desta bactéria em materiais ou espécimes clínicos contaminados, como fezes, areia e solo (MUSCATELLO, et al., 2007).

Recentemente, a patogenicidade de *R. equi* foi relacionada à presença de marcadores de virulência de origem plasmideal. As estirpes virulentas (VapA) têm sido identificadas em potros e em pacientes humanos com Aids. As estirpes de virulência intermediária (VapB) são identificadas, em sua maioria, na linfadenite em suínos e em humanos coinfectados com o vírus da Aids. As linhagens avirulentas comumente são identificadas no ambiente de criação de animais domésticos, em solos/areia de parques de recreação e entretenimento humano e também em humanos com Aids (TAKAI, 1997).

Foi identificado no presente estudo a presença de duas linhagens de *R. equi* avirulentas (ausência dos genes *vapA* e *vapB*) nas fezes de Psitacíformes. Este resultado indicou que as fezes de aves da fauna nacional possam contribuir na contaminação por *R. equi*, do solo/areia de ambientes peridomiciliares, parques e praças públicos. O achado do presente estudo

confirmou as evidências de Fernandes et al. (2013), que descreveram linhagens avirulentas de *R. equi* na areia de praças e parques da região de Botucatu, SP, e aventaram a possibilidade da contaminação destes ambientes com *R. equi* pelas fezes de pássaros.

Apesar da ausência de linhagens virulentas (VapA) ou de virulência intermediária (VapB), a presença de *R. equi* nas fezes de aves da fauna nacional encontra reflexos em Saúde Pública. Estudos nos Estados Unidos da América (VERVILLE et al., 1994), Japão (TAKAI., 1997) e Tailândia (TAKAI et al., 2002) têm referido a rodococose em humanos por linhagens avirulentas. No Brasil, estudo recente identificou 11 dentre 20 estirpes de *R. equi* isoladas de humanos, identificadas como avirulentas (RIBEIRO et al., 2011b). Nas linhagens avirulentas, a presença de outros fatores de virulência seriam responsáveis pela patogenicidade da bactéria em humanos, como a presença de cápsula e enzimas (oxidase, fosfolipase B), além da multirresistência de *R. equi* aos antimicrobianos convencionais, causando doença clínica de difícil tratamento, particularmente em indivíduos com debilidade orgânica ou imunossuprimidos (PRESCOTT, 1991; TAKAI, 1997; RIBEIRO et al., 2011b).

Não foi encontrado na literatura internacional referências da detecção do perfil de virulência associado aos plasmídeos em isolados de *R. equi* obtidos das fezes de aves silvestres/selvagens. No entanto, a presença de *R. equi* nas fezes de aves da fauna nacional denota preocupação no contexto de Saúde Pública, posto que estes animais podem contaminar ambientes de recreação humana, ambientes peridomiciliares, ou mesmo domiciliares, em virtude da prática frequente de criação de aves nativas no domicílio, particularmente as espécies com habilidade de canto.

E. coli pertence à microbiota entérica de humanos e animais, incluindo aves (CAMPOS e TRABULSI, 1999). O micro-organismo se caracteriza pela complexidade de fatores de virulência, principalmente relacionados a adesão bacteriana às células epiteliais e à produção de toxinas. A presença e expressão destes fatores de virulência estão intimamente relacionados às afecções entéricas e extra-entericas nas diferentes espécies animais e em humanos (KAPER et al., 2004). Com efeito, o simples isolamento de *E. coli* das fezes das aves não significa, necessariamente, predizer que esta

linhagem apresenta potencial patogênico, necessitando investigar os principais fatores de virulência do isolado relacionados à espécie animal (SUSMANN, 1997).

Dentre os genes investigados, nas aves amostradas, relacionados aos fatores de virulência de *E. coli* foram encontradas 27 linhagens detentoras do gene *fim H*. As fímbrias H, G e F são subunidades da fímbria A, que compõem a fímbria tipo 1 ou pili tipo 1. Esta adesina fimbrial se adere a células da orofaringe, intestinais e principalmente do trato urinário de humanos e animais (TIBA, 2004).

FimH atua diretamente na adesão de *E. coli* às células alvo. Atua também estimulando a agregação bacteriana e formação de biofilme. Estas propriedades conferem maior resistência bacteriana frente às defesas do hospedeiro e a determinados antimicrobianos, particularmente em *E. coli* UPEC (SUSMANN, 1997; TRABULSI et al., 2002). A detecção de 27 linhagens detentoras de *fimH* indica que as espécies de aves amostradas podem atuar como carreadoras de *E. coli* detentoras de fatores de adesão relacionados a patogenicidade do trato urinário em animais e humanos. Não foram encontrados na literatura estudos similares que detectassem *fimH* em grande número de *E. coli* isoladas das fezes de aves silvestres, limitando confrontar os achados do presente estudo.

Dentre outros marcadores de virulência investigados nos isolados, foram detectadas, também, duas linhagens detentoras do gene *eae*. O gene *eae* codifica a intimina, proteína responsável pela junção íntima de EPEC às células epiteliais (TRABULSI et al., 2002). Este gene está presente na ilha de patogenicidade denominada “locus enterocyte effacement” (MCDANIEL et al., 1995). A adesão destas linhagens de *E. coli* está associada também ao plasmídio EAF, que codifica o pili BFP (bundle-forming pilus). O pili BFP estabiliza a bactéria em microcolônias favorecendo a infecção (NATARO e KAPER, 1998). As estirpes enteropatogênicas (EPEC) típicas detêm, simultaneamente, o gene *eae* e o plasmídio EAF. Em contraste, as linhagens EPEC consideradas atípicas possuem somente o gene *eae* (TRABULSI et al., 2002). Assim, no presente estudo, as duas linhagens de *E. coli* identificadas nas fezes de aves da fauna nacional podem ser consideradas EPEC atípicas.

E. coli EPEC é a principal causa de diarreia em crianças com menos de um ano de idade, particularmente em países emergentes (NATARO e KAPER, 1998). A detecção de linhagens EPEC nas fezes das aves amostradas é um achado relevante no contexto de Saúde Pública, devido a possibilidade de contaminação do ambiente peridomiciliar, por vezes até domiciliar, por linhagens enteropatogênicas eliminadas pelas fezes de pássaros.

E. coli é a bactéria mais frequentemente isolada das fezes e de tecidos obtidos na necrópsia de aves silvestres (DORRESTEIN et al., 1985). No presente estudo, pode-se observar a alta prevalência desta bactéria na microbiota entérica das aves. Houve também diferença significativa entre os dois grupos de aves pesquisados (Passeriformes e Psitaciformes) revelando maior frequência de isolamento de *E. coli* nos Psitaciformes se comparado aos Passeriformes. Tal achado poderia encontrar justificativa nos hábitos alimentares ou de proximidade com o solo, que favoreceriam a colonização intestinal por *E. coli* nos Psitaciformes.

A classificação filogenética das linhagens de *E. coli* isoladas das aves identificou o predomínio do grupo A (*E. coli* comensais) e linhagens pertencentes ao grupo B2 (infecções extra-intestinais) (BINGEN et al., 1998). O predomínio de *E. coli* comensais (grupo A) pode ser creditado a amostragem de animais sem sinais entéricos, visto que o micro-organismo possui como hábitat o trato intestinal, enquanto *E. coli* extra-intestinais na filogenia (grupo B2) poderia ser justificado pela presença de linhagens contendo *fimH* relacionada à infecções do trato urinário (SUSMANN, 1997).

Foi identificado material genético de rotavírus bovino, no entanto, na literatura consultada, não foram encontradas descrições no Brasil da detecção de rotavírus nas fezes das espécies das aves amostradas, dificultando confrontar este resultado do presente estudo. A presença de rotavírus nas aves amostradas sinaliza para o risco de contaminação pelo agente (com fezes de aves) do ambiente domiciliar e peridomiciliar dos humanos, e reforça a necessidade de adoção de medidas higiênico-sanitárias no contato direto ou com o ambientes destas aves silvestres, particularmente para criadores.

Não foi evidenciada a presença de *Salmonella* spp. e Coronavírus nas fezes das aves amostradas. Entretanto, à semelhança dos demais patógenos investigados, estes micro-organismos sempre devem ser considerados em estudos envolvendo patógenos entéricos em animais, devido ao potencial patogênico para humanos e a possibilidade de coinfeção na ocorrência de distúrbios entéricos.

A maioria dos estudos envolvendo a identificação de patógenos entéricos de potencial zoonótico em aves silvestres da fauna nacional estão restritos aos relatos de casos, ou enfocam um patógeno específico de origem bacteriana, viral ou parasitária. No entanto, não raras vezes estes micro-organismos atuam sob a forma combinada (coinfeções), potencializando o efeito dos distúrbios entéricos. Neste contexto, o presente estudo procurou abordar o diagnóstico dos principais patógenos de eliminação fecal em aves silvestres, devido ao potencial zoonótico e a complexidade destes agentes, envolvidos em afecções entéricas e, por vezes, extra-entericas em animais e humanos. Entretanto, não foi observada associação significativa na detecção de coinfeções nos animais amostrados apesar da presença conjunta destes patógenos encontrada nas fezes de algumas aves.

A presença de *E. coli*, *R. equi* e Rotavírus em amostras de fezes de aves da fauna nacional, sinaliza o potencial zoonótico destes animais para os humanos, alertando para a necessidade de orientar indivíduos que possuem contato direto com estes animais, ou com fezes, na limpeza de gaiolas ou viveiros, (particularmente criadores), quanto aos riscos de contaminação representada pelas fezes destes animais.

10. CONCLUSÕES

- ✓ A identificação de *R. equi*, *E. coli* e rotavírus indicam o potencial zoonótico das aves silvestres da fauna nacional amostradas na região do estudo, devido ao risco de contaminação de ambientes domiciliares e peridomiciliares, ou mesmo pelo contato direto com criadores destas espécies;
- ✓ A detecção incomum de linhagens de *R. equi* nas aves amostradas, ainda que sem a presença dos genes *vapA* e *vapB*, demanda preocupação em Saúde Pública, em virtude da ocorrência da rodococose em humanos por estirpes avirulentas, particularmente em indivíduos acometidos pela Aids, inclusive no Brasil;
- ✓ A detecção dos genes *fimH* e *eae* nos isolados de *E. coli* indica o potencial patogênico destas linhagens para outras aves ou mesmo humanos, devido à relação destes fatores de virulência, respectivamente, com estirpes UPEC e EPEC;
- ✓ A detecção de material genético de *Rotavírus* bovino em amostras fecais de aves silvestres da fauna nacional é um achado incomum na literatura consultada, e também sinaliza para o risco de contaminação ambiental ou por contato direto com estes animais;
- ✓ A presença de diferentes patógenos eliminados pelas fezes de Passeriformes e Psitaciformes denota a necessidade de conscientização da população em geral, particularmente criadores destas espécies, sobre o potencial zoonótico destes micro-organismos, mediante a contaminação do ambiente ou por contato direto com animais saudáveis, sem sinais entéricos;

11. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 3.ed., vols. 1,2 e 3. 2003.

ADAL, K.A.; SHINER, P.T.; FRANCIS, J.B. Primary subcutaneous abscess caused by *Rhodococcus equi*. *Annals of Internal Medicine*, v. 122, p. 317,1995.

AGUILAR, R. F.; HERNÁNDEZ, S. M.; HERNÁNDEZ, S. J. Medicina e patologia de aves de companhia. In: *Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos*. São Caetano do Sul, SP: Interbook, Cap. 08, p. 213-264, 2006.

AKASHI H.; INABA Y.; MIURA Y.; TOKUHISHA S.; SATO K.; SATODA K. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. *Vet. Microbiol.*, v.5, p.265-276, 1980

ALEJO, C. T. *Coronavírus em codornas: ocorrência, diversidade molecular e estudo do papel epidemiológico das codornas como reservatório para a bronquite infecciosa das galinhas*, 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo.

ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborn diseases. *Emerging Infectious Diseases*, v. 3, n. 3, p. 1-12, 1997.

ALLGAYER, M. C.; Detecção de *Salmonella* sp.em psitacídeos de cativeiro através da reação em cadeia da polimerase (PCR), *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, 2003.

ANDREWS, W.H.; JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; HAMMACK, T.S.; AMAGUANA, R. M. Salmonella. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bacteriological Analytical Manual*. Gaithersburg: AOAC International, 1998. p.5001-5020.

ASANO, K. M.; SOUZA, S. P; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. *Journal of Virological Methods*, v.169, p. 375-370, 2010.

BATTISTI, A.; GUARDO, G.; AGRIMI, U.; BOZZANO, A. I. Embryonic and neonatal mortality from salmonellosis in captive bred raptors. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 34, n. 1, p. 64-72, 1998.

BERCHIERI JR, A. Salmoneloses aviárias. In: Berchieri Júnior, A. e Macari, M. (Eds.). *Doença das aves*. Campinas: FACTA, 2000. P.185-195.

BINGEN, E., PICARD, B., BRAHIMI, N., MATHY, S., DESJARDINS, P., ELION, J., DENAMUR, E. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis*, v.177, p.642-650, 1998.

BIRNBOIM, T.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, v.7, p.1513–1523, 1979.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; MORA, A.; BALSALOBRE, C.; MUNOIA, F.; JUAREZ, A.; BLANCO, J. Detection of pap, sfa and afã adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. *Research Microbiology*. v. 148, n. 9, p. 745-55, 1997.

BRASIL. *Ministério da Saúde. Dados e Pesquisas em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS*. Net. set. 2007. Disponível em: www.aids.gov.br/ Acesso em: 10 set. 2013.

BROWN, A.E. Other *Corynebacteria* and *Rhodococcus*. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4.ed. New York: Churchill Livingstone, p.1872-1877. 1995.

BROWN, N. H. H. Psittacine birds. In: TULLY, JR, T. N.; LAWTON, M. P. C. DORRESTEIN, G. M. *Avian medicine*. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltda, p. 116-120, 2000.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, p. 215-228. 1999.

CARDOSO D.D.; MARTINS, R.M.B; KITAJIMA, E.W.; BARBOSA, A.J.; CAMAROTA, S.C.T.; AZEVEDO, M.S.P. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-05 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia – GO, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; v.34, p.433-439, 1992.

CARTER, G. R. *Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária*. 3 Ed. Roca: São Paulo, 2005. p. 144.

CATERINO-DE-ARAÚJO, A.; DE LOS SANTOS-FORTUNA, E.; ZANDONA-MELEIRO, M.C.; CALORE, E.E.; PEREZ CALORE, N.M. Detection of the 20- kDa virulence-associated antigen of *Rhodococcus equi* in malakoplakia lesion in pleural tissue obtained from an AIDS patient. *Pathology Research Practice*, v.196, n.5, p.321-327, 2000.

CASTRO, A. F. P.; YANO, T. Principais doenças entéricas dos bezerros de origem bacteriana. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. *Diarreia dos bezerros*. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p. 1-38. 1992.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Rotavirus surveillance: United States, 1989-1990. *MMWR Morb Mort Wkly Rep*, v.40, p. 80-81, 87, 1991.

CERQUEIRA, A. M. F.; GUTH, B. E. C.; JOAQUIM, R. M.; ANDRADE, J. R. C. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 70, n. 1, p. 111-121, 1999.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *App. Environ. Microbiol.*, v.66, n.10, p.4555-4558, 2000.

Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2014) *Listas das aves do Brasil*. 10ª Edição, 25/01/2011, Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em 20/01/14.

DAIGLE, F., HAREL, J., FAIRBROTHER, J.M., LEBEL, P. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa- encoded fimbrial adhesion system among uropathogenic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, v.40, n.4, p.286-291, 1994.

D'ALOIA, M.; BAILEY, T. A.; SAMOUR, J. H.; NALDO, J.; HOWLETT, J. C. Bacterial flora of captive houbara (*Chlamydotis undulata*), kori (*Ardeotis kori*) and rufous-crested (*Eupodotis ruficrista*) bustards. *Avian Pathology*. v. 25, p. 459-468, 1996.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COLUMBIER, D. et al. Epi Info Version 6. *A Word Processing, Database and Statistical Program for Epidemiology on Microcomputers*. Atlanta: CDC, 1994. 601p.

DE LEENER, K.; RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; HOOVELS, L. V.; GOEGEBUER, T.; VAN DER DONCK, I.; VAN RANST, M. Human infection with a P[14], G3 lapine rotavirus. *Virology*, v.325, p. 11-17, 2004.

DE SOUZA, R. L.; NISHIMURA, L. S.; GUTH, B. E. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiology Infectious Diseases*. Jul 25, 2007.

DOHOO, I., W. MARTIN, & H. STRYHN. 2010. *Veterinary Epidemiologic Research*. Segunda Edição. VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá.

DORRESTEIN, G. M.; BUITELAAR, M. N.; VAN DER HAGE, M. H.; ZWART, P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. *Avian Diseases*, v. 29, n. 4, p. 951-962, 1985.

DOYLE, M. P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 289-302, 1991.

ESCUTENAIRE, S.; MOHAMED, N.; ISAKSSON, M.; THORÉN, P.; KLINGEBORN, B.; BELÁK, S.; BERG, M.; BLOMBERG, J.; SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Arch Virol*, v.152, p. 41-58. 2006.

FAITH, N. G.; SHEER, J. A.; BROSH, R. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Applied Environmental Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 1519-1525, 1996.

FARIAS, M.R.; TAKAI, S.; RIBEIRO, M.G.; FABRIS, V.E.; FRANCO, S.R.V.S. Cutaneous pyogranuloma in a cat caused by virulent *Rhodococcus equi* containing an 87-kb type I plasmid. *Australian Veterinary Journal*, v.85, n.1-2, p.29-31, 2007.

FERNANDES, M.C.; TAKAI, S.; LEITE, D. S.; PINTO, T.P.A.N.; BRANDÃO, P.E.; SANTARÉM, V.A.; LISTONI, F.J.P.; DA SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013 (in press).

FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*, Santa Maria: Ed da UFSM, 888p, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, p. 33-81, 1996.

FRIEND, M. Bacterial diseases. In: *Field manual of wildlife diseases: General field procedures and diseases of birds*. USGS – National Wildlife Health Center, University of Nebraska – Lincoln, 1999. Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/zoonoticpub/12>> Acesso em: 20 set 2013.

GALLETTI, M. C. M.; RIBEIRO, S. A. M.; REIS, E. M. F.; DORETTO JR., L.; ORSI, M. A. Isolamento de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Kottbus em aves importadas. *Brazilian Journal of Poultry Science*. Suplemento. p. 87, 1999.

GLASS, R.I.; LEW, J.F.; GANGAROSA, R.E. Estimates of morbidity and mortality rates for diarrheal in American children. *J. Pediatrics*, v.118, p.27-33, 1991.

GODOY, S.N. Psitaciformes. In: *Tratado de animais selvagens - medicina veterinária*. São Paulo: Roca, p.222 - 251, 2007.

GOMES, V. T.; *Caracterização genotípica e fenotípica de cepas de Escherichia coli associadas à doença do edema em suínos*, 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo.

GREENE, C.E. *Infectious disease of the dog and cat*. 4. ed., St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012. 1354p.

GUNDY, P.M.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Survival of coronaviruses in water and wastewater. *Food Environ. Virol.*, p.14-14, 2009.

HELM, J. D.; HINES, R. K.; HILL, J. E.; CAVER, J. A. Multiple drug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 and DT104b isolated in bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Diseases*. v. 43, p. 788-791, 1999.

HINES, S.A.; KANALY, S.T.; BYRNE, B.A.; PALMER, G.H. Immunity to *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, v. 56, p. 177-185, 1997.

HOEFER, H.L. et al. Diseases of the gastrointestinal tract. In: ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORESTEIN, G.M.; QUSENBERY, K. *Avian Medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders Company, p. 419-453. 1997.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev.*, v.2, p.123-140, 2004.

KARKKAINEN, U.M.; KAUPPINEN, J.; IKAHEIMO, R.; KATILA, M.L.; SIITONEN, A. - Rapid and specific detection of three different G adhesin classes of P-fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Method.*, v.34, n.1, p.23-29, 1998.

KETZ - RILEY. C.J. Salmonellosis and Shigelosis. In: FOWLER, M.E.; MILLER, R.E. *Zoo and wild animal medicine*. 5. Ed. St. Louis: Saunders, p. 686-688. 2003.

KIMPE, A.; DECOSTERE, A.; MARTEL, A.; HAESBROUCK, F.; DEVRIESE, L. A. Prevalence of antimicrobial resistance among pigeon isolates of *Streptococcus gallolyticus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Avian Pathology*. v. 31, p. 393-397, 2002.

KNÖBL, T.; GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R.; GUIMARÃES, M. B.; FERREIRA, A. J. P. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo, v.45, suplemento, p. 54-60, 2008.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 984 p.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*, v. 155, n. 3, p. 377-389, 1987.

LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium haemolyticum*: Two "Coryneform" bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerging Infectious Diseases*, v. 3, p. 1-10, 1997.

LIOW, T. M. Pullorum disease in a black palm cockatoo (*Probosciger aterrimus*). *Singapore Vet. J.* v. 2, p.37-38, 1978.

MARCIANO, J. A. *Pesquisa de Salmonella sp., Cryptococcus neoformans e anticorpos anti-Toxoplasma gondii em pombos urbanos (Columba livia) no município de Jaboticabal-SP*. 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

MATTES, B. R.; CONSIGLIO, S. A. S.; ALMEIDA, B. Z.; GUIDO, M. C.; ORSI, R. B.; SILVA, R. M.; COSTA, A.; FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Influência da biossegurança na colonização intestinal por *Escherichia coli* em psitacídeos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 1, p. 13-16, 2005.

MCDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.92, n.5, p.1664-8, 1995.

MONTASSIER, M. F. S; TEIXEIRA, F. C; BARBOZA, K. B; WERTHER, K; ÁVILA, F. A; MONTASSIE, H. J. R. Detecção de coronavírus em aves silvestres da região nordeste do estado de São Paulo, Brasil, por técnicas moleculares de rt-pcr e nested-pcr / detection of coronavirus by rt-pcr and nested-pcr in wild birds from northeastern São Paulo state, Brazil. *Ars Veterinária*, v. 29, 2013.

MUSCATELLO, G.; GILKERSON, J.R.; BROWNING, G.F. Comparison of two selective media for the recovery, isolation, enumeration and differentiation of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, v.119, p.324-329, 2007.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studies from the perspective of Genogroup. *Microbiol. Immun.*, v.37, p.337-348, 1993.

NAKANO, M.; YAMAMOTO, S.; TERAII, A.; OGAWA, O.; MAKINO, S.; HAYASHI, H.; NAIR, G.B.; KURAZONO, H. Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.205, p.71-76, 2001.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NETO, O.C.F.; Search for *Salmonella* spp. In ostrich productive chain of Brazilian southeast region. *Tropical Animal Health and production*, Vol. 41, n. 8, p 1607-1614. 2009.

ORÓS, J.; RODRÍGUEZ, J. L.; FERNÁNDEZ, A.; HERRÁEZ, P.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; JACOBSON, E. R. Simultaneous occurrence of *Salmonella arizonae* in a sulfur crested cockatoo (*Cacatua galerita galerita*) and Iguanas. *Avian Diseases*. v. 42, p. 818-823, 1998.

PEDERSEN, K. Prevalence of shiga toxin–producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in rock pigeons captured in Fort Collins, Colorado. *J. Wildl. Dis*, v.42, n.1, p.46–55, 2006.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. *Centre Collaborateur OMS de référence et de recherches pour les Salmonella*, 1992. p.145.

PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 4, p. 20-34, 1991.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe, 1994. p. 137– 143.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K; CARTER, M. E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. In: *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. Porto Alegre: Artmed 2005. p.71–73.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2.ed. UK: Wiley-Blackwell, 2011. p.290-299.

RADOSTITS, O.M., GAY, M.E., HINCHCLIFF, K.W., CONSTABLE, P.D., *Veterinary Medicine. A Textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. WB Saunders, London. 2156p. 2007.

REFSUM, T.; VIKOREN, T.; HANDELAND, K.; KAPPERUD, G.; HOLSTAD, G. Epidemiologic and pathologic aspects of *Salmonella* Typhimurium infection in passerine birds in Norway. *Journal of Wildlife Diseases*. v. 39, n. 1, p. 64-72, 2003.

RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; FERNANDES, M.C. Fatores de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicações na epidemiologia e controle da rodococose nos animais e no homem. *Veterinária e Zootecnia*, v. 14, p. 1-8, 2007.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; LEITE, D. S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTORIA, C.; LISTONI, F. J. P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 5, p. 724-731, 2006.

RIBEIRO, M. G.; BRITO, C. J. C.; PAES, A. C.; MEGID, J.; PINTO, J. P. A. N.; LISTONI, F. J. P. Infecção do trato urinário em cão por *Salmonella* entérica sorotipo Enteritidis. Relato de caso. *Clínica Veterinária* (São Paulo), São Paulo, SP, v. 8, n. 43, p. 30-37, 2003.

RIBEIRO, M.G.; TAKAI, SHINJI, GUAZZELLI, A.; LARA, G.H.B.; SILVA, A.V. et al. Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. *Research in Veterinary Science*, v. 91, p. 478-481, 2011a.

RIBEIRO, M.G.; TAKAI, S.; VARGAS, A.C.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; CAMELLO, T.C.F.; SILVA, A.V. Identification of virulence associated plasmids in *Rhodococcus equi* from humans with and without acquired immune deficiency syndrome in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, p. 510-513, 2011b.

RITCHIE, B. W.; HARRISON G. J.; HARRISON L. R. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth, Wingers Publishing, 1384p, 1994.

SANDER, J.; HUDSON, C. R.; DUFOUR-ZAVALA, L.; WALTMAN, W. D.; LOBSINGER, C.; THAYER, S. G.; OTALORA, R.; MAURER, J. J. Dynamics of *Salmonella* contamination in a commercial quail operation. *Avian Diseases*. v. 45, p. 1044-1049, 2001.

SATO, Y.; FUKUI, S.; KURUSU, H.; KITAZAWA, I.; KUWAMOTO, R.; AOYAGI, T. *Salmonella typhimurium* infection in domesticated fowl in a children's Zoo. *Avian Diseases*. v. 43, p. 611-615, 1999.

SCHUBERT, M. A. R., Isolamento de *Salmonella* spp de amostras fecais de aves silvestres mantidas em cativeiro, *Faculdades Metropolitanas Unidas*, 2008.

SCHUTZE, G. E.; SIKES, J. D.; STEFANOVA, R.; CAVE, M. D. The home environment and Salmonellosis in children. *Pediatrics*, v. 103, n. 1, p. 1-5, 1999.

SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Rodococoses. *In: VERONESI, R; FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, 2v, 1996. p.1032-1033.*

SILVA, R. R.; BEZERRA, D. A. M.; KAIANO, J. H. L. Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in Amazon Region, Brazil,. *Rev Pan-Amaz Saude*, , v.4, n.2, p.55-62. 2013.

STEYER, A.; POLJISAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; MARIN, J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interpecies transmission and genome reassortment. *J. Gen. Virol.*, v.89, p.1690-1698, 2008.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. United Kingdom: *Cambridge University*, 1997. 639p

TAKAI, S.; THARAVICCHITKUL, P.; SASAKI, C.; ONISHI, Y.; YAMANO, S.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TRINARONG, C.; ROJANASTHIEN, S.; SIRIMALAISUWAN, A.; TESAPRATEEP, T.; MANEEKARN, N.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, v.66, n.1, p.52-55, 2002.

TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. *Vet Microbiol* 56: 167–176. 1997.

TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y.; WATANABE, Y.; OSAWA, T.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15–to 17–kilodalton antigens. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, n.6, p.1624–1627, 1995a.

TAKAI, S.; IMAI, Y.; FUKUNAGA, N.; UCHIDA, Y.; KAMISAWA, K.; SASAKI, W.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, v.172, n.5, p.1306–1311, 1995b.

TAKAI, S.; WATANABE, Y.; IKEDA, T. et al. Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.1726–1729, 1993.

TARR, P. I. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 1-10, 1995.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne diseases: An evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, v. 3, n. 4, p. 1-13, 1997.

TIBA, M.R. *Determinação genotípica dos fatores de virulência em amostras de Escherichia coli isoladas de cistites*. 2004. 72p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TRABULSI, L.R. ALTERTHUM, F. GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia*. 2Ed. Atheneu. 2002.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N.; *Microbiologia*, 3ed. Atheneu: São Paulo, 1999.

TREVEJO, R. T.; COURTNEY, J. G.; STARR, M.; VUGIA, D. J. Epidemiology of Salmonellosis in California, 1990-1999: morbidity, mortality, and hospitalization costs. *American Journal of Epidemiology*. v. 157, n. 1, p. 48-57, 2003.

VERONESI, Ricardo & FOCCACIA, Roberto. *Tratado de Infectologia – VOL.I*. 2ª reimpressão. Atheneu: São Paulo, 1996.

VERVILLE, T.D.; HUYCKE, M.M.; GREENFIELD, R.A.; FINE, D.P.; KUHL, T.L.; SLATER, L.N. *Rhodococcus equi* infections in humans. *Medicine*, v.73, p.119-132, 1994.

WARD, M. P.; RAMER, J. C.; PROUDFOOT, J.; GARNER, M. M.; JUAN-SALLES, C.; WU, C. C. Outbreak of salmonellosis in a zoologic collection of lorikeets and lorries (*Trichoglossus*, *Lorius*, and *Eos* spp.). *Avian Diseases*. v. 47, n. 2, p. 493- 498, 2003.

WHITE, R.G.; MEBUS, C.A.; TWIEHAUS, M.J. Incidence of herds infected with a neonatal Calf Diarrhea Virus (NCDV). *Vet. Med. Small Anim. Clin.*,v.65, p.487-490, 1970.

WOOLCOCK, J.B.; FARMER, A.M.T.; MUTIMER, M.D. Selective medium for *Corynebacterium equi*. *J. Clin. Microbiol.*, v.9, p.640–642, 1979.

YAMAMOTO, S.; TERAJ, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA,O. Detection of urovirulence factors in Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.12, n.2, p. 85-90, 1995.

