

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ENTEROBACTÉRIAS E
FATORES DE VIRULÊNCIA EM CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE PSITACÍDEOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa

**Santa Maria, RS, Brasil,
2012**

C824e Corrêa, Isadora Mainieri de Oliveira
 Enterobactérias e fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas
 de psitacídeos / por Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa. – 2012.
 54 f. ; il. ; 30 cm

 Orientador: Maristela Lovato
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
 Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2012

 1. Bactérias Gram negativas 2. Aves silvestres 3. *Amazona pretrei*
 4. Papagaio I. Lovato, Maristela II. Título.

 CDU 619:598.2

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

©2012

Todos os direitos autorais reservados a Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

**ENTEROBACTÉRIAS E
FATORES DE VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *Escherichia coli*
ISOLADAS DE PSITACÍDEOS**

Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^a. Maristela Lovato

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**ENTEROBACTÉRIAS E FATORES DE VIRULÊNCIA
EM CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS
DE PSITACÍDEOS**

elaborada por
Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Maristela Lovato, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Sônia de Avila Botton, Dr^a. (UFSM)

Benito Guimarães de Brito, Dr. (IPVDF)

Santa Maria, 17 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial ao meu avô João, que esteve sempre disposto a me ajudar e sem ele as minhas “idas” a Universidade seriam bem mais complicadas. À minha mãe, pelas inúmeras vezes que se dispôs, mesmo com todo o trabalho que já tem, a cuidar da Manu, da Jully, dos passarinhos...

À minha orientadora prof^a. Dr^a Maristela Lovato, por todos os ensinamentos e pelas suas palavras de motivação que sempre nos incentivam a seguir em frente.

Aos colegas do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias e Núcleo de Estudos e Pesquisas em Animais Selvagens, onde encontrei grandes amigos que, com certeza, levarei para toda vida.

Aos meus amigos que sempre estiveram por perto.

E é claro, agradeço a minha filha Manuela, por alegrar todos os meus dias e ser a razão para seguir em frente.

Aos proprietários do criadouro comercial e do criadouro conservacionista que não hesitaram em colaborar com a pesquisa, ao permitirem a coleta de amostras de suas aves.

Ao Dr. Benito Brito por permitir o uso da excelente estrutura de seu laboratório no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF).

Ao colega Médico Veterinário Flávio Silveira e seus orientadores na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela parceria e por interessar-se em seguir com a pesquisa de genes nas amostras de psitacídeos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI), pela concessão da bolsa.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ENTEROBACTÉRIAS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE PSITACÍDEOS

AUTORA: ISADORA MAINIERI DE OLIVEIRA CORRÊA
ORIENTADORA: MARISTELA LOVATO
Santa Maria, 17 de fevereiro de 2012.

A microbiota intestinal de Psitaciformes é composta principalmente por bactérias Gram positivas, não se considerando saudável a presença de bactérias Gram negativas. As aves silvestres possuem importância para a saúde pública por albergarem patógenos passíveis de transmissão zoonótica. O deslocamento territorial dessas aves, como o que ocorre no tráfico de animais selvagens, constitui um mecanismo de propagação de novos focos endêmicos de agentes infecciosos a grandes distâncias dos locais onde foram adquiridos. Neste trabalho analisamos a presença de enterobactérias em psitacídeos utilizando amostras de órgãos de aves recebidas para necropsia na rotina do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA) situado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) do Centro de Ciências Rurais (CCR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Também foi realizada coleta de suabes cloacais e de ingluvío em aves vivas mantidas em cativeiro visando monitorar a presença de possíveis bactérias patogênicas. *Escherichia coli* foi considerada a bactéria predominante na maioria das amostras, então após análise microbiológica e confirmação dos isolados de *E. coli*, selecionamos 28 colônias, as quais foram testadas para os fatores de virulência *iss*, relacionado com a capacidade da cepa em resistir aos efeitos líticos do soro, e *iutA*, sendo este gene um receptor de membrana externa dos compostos sideróforos da aerobactina (genes *iuc*) que é um sistema de captação de ferro pelo qual *E. coli* expressa afinidade. Espera-se que os dados obtidos nessa pesquisa contribuam no estabelecimento do estado sanitário de psitaciformes auxiliando na manutenção da espécie e prevenindo riscos à saúde pública.

Palavras-chave: *iss*, *iutA*, *Serratia odorífera*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp, *Klebsiela oxytoca*, *Salmonella* spp.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ENTEROBACTERIACEAE AND VIRULENCE FACTORS IN STRAINS OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM PSITTACINES BIRDS

AUTHOR: ISADORA MAINIERI DE OLIVEIRA CORRÊA
ADVISER: MARISTELA LOVATO
Santa Maria, February 17th 2012.

The microbiota intestinal of Psittaciformes is mainly composed of Gram positive bacteria, is considered a sign of illness the presence of Gram negative bacteria. Wild birds are important to public health by harboring pathogens able of zoonotic transmission. The displacement of these birds, such as occurs in the trafficking of wild animals, is a propagation mechanism of new endemic foci of infections agents to long distances from where they were acquired. In this study we examined the presence of enterobacteria in psittacines using samples of organs of birds received for necropsy at the Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA) situate in the Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) at Centro de Ciências Rurais (CCR) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). We also collected samples using swabs of cloaca and crop, in live birds, kept in captivity in order to monitor the possible presence of pathogenic bacteria. *Escherichia coli* was considered the predominant bacteria in most samples, then after microbiological analysis and confirmation of *E. coli* isolates, we selected 28 colonies, which were tested for virulence factors *iss*, this gen is associated with the strain's ability to resist the lytic effects of serum, and *iutA* an outer membrane receptor of involved in the high affinity binding of iron-aerobactin. It is hoped that the data obtained in this research will help in establishing the health status of psittacines helping maintain the species and preventing risks to public health.

Keywords: *iss*, *iutA*, *Serratia odorífera*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Providencia* sp, *Klebsiela oxytoca*, *Salmonella* spp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Estado nutricional ruim (A) e estado nutricional ótimo (B) constatado na necropsia de um papagaio-charão (*Amazona pretrei*).....47
- Figura 2 – Lesões de aerossaculite, pericardite e perihepatite observadas em exame de necropsia de um papagaio-charão (*Amazona pretrei*)48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Porcentagem de detecção de Enterobactérias em suabes cloacais de psitacídeos...32

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II

Quadro 1– Isolamento de <i>Escherichia coli</i> de suabes de Inglúvio e cloaca de psitacídeos.....	45
Quadro 2 – Resultados obtidos da análise para fatores de virulência (<i>iss</i> e <i>iutA</i>) em amostras de <i>E. coli</i> isoladas de psitacídeos	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Família Enterobacteriaceae	13
2.1.1 Gênero <i>Enterobacter</i>	14
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.3 Gênero <i>Klebsiella</i>	16
2.1.4. Gênero <i>Proteus</i>	17
2.1.5. Gênero <i>Serratia</i>	18
2.1.6. Gênero <i>Providencia</i>	19
2.1.7 Gênero <i>Salmonella</i>	19
3 CAPÍTULO I - PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE PSITACÍDEOS EM CRIADOURO CONSERVACIONISTA	22
Resumo	23
Introdução	24
Material e métodos	25
Resultados	26
Discussão	26
Conclusão	28
Referências bibliográficas	29
4 CAPÍTULO II - DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>Escherichia coli</i> E ANÁLISE DE <i>Salmonella</i> spp. EM PSITACÍDEOS	33
Abstract	34
Resumo	35
Introdução	35
Material e métodos	36
Resultados	38
Discussão	39
Referências	41
5 CONCLUSÃO	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

7 APÊNDICE A 54

1 INTRODUÇÃO

A ordem Psitaciformes compreende várias espécies como: araras, papagaios, periquitos, maritacas e calopsitas. Está entre as mais ameaçadas da classe das Aves (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2000). O Brasil é considerado o país com maior diversidade de psitacídeos do mundo, pois das 332 espécies reconhecidas 72 estão presentes no território brasileiro. Este fato levou o país a ser chamado no século XVI de “Terra dos papagaios”. Destas espécies 17 estão listadas no “Threatened Birds of the World”, sendo que duas foram extintas após a chegada dos europeus no Brasil a arara-azul-de-Glaucus (*Anodorhynchus glaucus*) e a ararinha-azul-de-Spix (*Cyanopsitta spixii*). Uma espécie encontra-se criticamente ameaçada arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*), sete ameaçadas, seis vulneráveis e a espécie tiriba-pérola (*Pyrrhura lepida*) encontra-se “quase ameaçada” (GALETTI et al., 2002).

Os exemplares pertencentes à ordem dos Psitaciformes são considerados as aves mais comumente mantidas em cativeiro no mundo todo, sendo a convivência entre psitacídeos e humanos datada há vários séculos. A manutenção e a criação de psitacídeos em cativeiro continua em expansão e, devido a destruição e fragmentação do habitat desta espécie no mundo todo, a reprodução em cativeiro tornou-se uma ferramenta de extrema importância para assegurar a sobrevivência destas aves, além disso deve promover a qualidade de vida das espécies cativas (LIGHTFOOT; NACEWICZ, 2009).

Enterobactérias são micro-organismos Gram negativos, aeróbicos, em forma de bastonetes e apresentam pleomorfismo. Podem ser móveis, por possuírem flagelos peritríquios, ou imóveis, com ou sem cápsula e fermentadores de açúcares (KARUNAMOORTHY et al., 1994). As enterobactérias são onipresentes e consideradas como parte da flora fisiológica de muitos mamíferos e algumas espécies de aves, mas em determinadas ordens, como a dos Psitaciformes e Falconiformes, as enterobactérias não são descritas como um componente normal da flora entérica. Elas estão associadas principalmente às infecções secundárias, mas em alguns casos são implicadas como patógenos primários. Dentro da família Enterobacteriaceae existem grandes diferenças na virulência e na resposta do hospedeiro às infecções (GERLACH, 1994).

Bactérias Gram negativas não fazem parte da flora autóctone de papagaios saudáveis, a qual é composta exclusivamente por bactérias Gram positivas, não esporuladas, em forma de cocos e bastonetes. Estudos com psitacídeos de vida livre demonstraram um percentual de 60% de isolamento de enterobactérias, mas este alto percentual foi atribuído ao estresse constante devido a presença de caçadores e seres humanos próximos aos ninhos e ao declínio do ambiente natural onde estas aves viviam. Outra pesquisa revelou que papagaios africanos alimentados com dieta à base de sementes tiveram sua flora bacteriana Gram negativa reduzida a níveis mínimos quando passaram a receber uma alimentação balanceada. Considera-se improvável que *E. coli* ou *Klebsiella* spp. colonizem o intestino de periquitos-australianos alimentados com dieta balanceada, pois a microflora local mantém o pH ácido, o que inibe a proliferação de bactérias Gram negativas e leveduras (HARRISON; McDONALD, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Enterobacteriaceae

Nesta família são relatados aproximadamente 28 gêneros e mais de 80 bactérias. Os gêneros e espécies desta família apresentam distinções bioquímicas, o que permite a identificação dos isolados clínicos (QUINN et al., 2005). Sendo que todas as enterobactérias são capazes de produzir toxinas (GERLACH, 1994). O grupo coliforme é formado pelos gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. As bactérias pertencentes a este grupo são comumente encontradas no trato intestinal do homem e animais (SIQUEIRA, 1995).

Segundo Trabulsi e Alterthum (2008) as bactérias pertencentes a esta família podem ocasionar infecções intestinais e extra-intestinais. Quando causam infecções intestinais são classificadas em enteropatogênicas, e incluem as bactérias: *E. coli*, todos os sorotipos de *Shigella*, quase todos os sorovares de *Salmonella* e alguns sorotipos de *Yersinia*. Estudos sugerem que *Providencia* spp., *Hafnia* spp. e *Citrobacter* spp. podem ser enteropatogênicas. As bactérias desta família são responsáveis por 50% das infecções nosocomiais, sendo as mais frequentes causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Serratia marsescens* (HOLT et al., 1994).

Segundo Quinn et al. (2005) a família Enterobacteriaceae pode ser dividida, de acordo com sua patogenicidade para os animais, em três grupos. O primeiro grupo é classificado como patogenicidade incerta e estão incluídas espécies de 17 gêneros, entre eles destacam-se: *Cedecea* spp., *Enterobacter agglomerans* e *Providencia* spp. Outro grupo é denominado de patógenos oportunistas, onde estão incluídas as espécies dos gêneros: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Morganella* e *Shigella*. No grupo classificado como de grande patogenicidade para animais encontramos as bactérias: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e algumas espécies de *Yersinia*.

2.1.1 *Enterobacter* spp.

As bactérias do gênero *Enterobacter* caracterizam-se por serem bacilos curtos, Gram negativos, móveis por flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos e fermentam glicose com produção de ácido e gás. A maior parte das amostras cresce a 37°C, mas a temperatura ótima para crescimento é de 30°C. Possuem, geralmente, reação positiva no teste de Voges-Proskauer e citrato de Simmons, são negativos no teste do vermelho de metila e, quase sempre, lisina positiva. Não produzem H₂S, pois o citrato e o malonato são usualmente usados como única fonte de carbono e energia. A espécie *Enterobacter aerogenes* é móvel e não hidrolisa a uréia (HOLT et al., 1994).

Enterobacter spp. é um habitante normal do trato digestório da grande maioria das espécies aviárias. Como outras bactérias da família Enterobacteriaceae, são capazes de infectar ovos e aves jovens, o que causa morte embrionária, onfalite, infecções no saco vitelino e mortalidade em aves jovens (BARNES, 2003b).

2.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo, fermentativo, geralmente móvel, com flagelos peritríquios e fimbrias (QUINN et al., 2005). Cresce rapidamente em meios bacterianos como ágar MacConkey, onde forma colônias lactose positiva grandes. *E. coli* é a principal bactéria anaeróbica facultativa presente no trato intestinal da maioria das espécies animais e é geralmente recuperada da cultura de fezes, mas em aves de estimação saudáveis é recuperada em apenas uma pequena porcentagem de indivíduos (GYLES; FAIRBROTHER, 2010).

Amostras patogênicas de *E. coli* possuem mecanismos de virulência específicos e de acordo com estes fatores são classificadas em patotipos. Os mais importantes patotipos em humanos e animais são a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* produtora de shigatoxina (STEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) (FERREIRA; KNÖBL, 2009; GYLES; FAIRBROTHER, 2010). Para a realização de sorotipagem de *E. coli* são usados os antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) e fimbriais (F) (BARNES et al., 2003a).

Colibacilose aviária tem distribuição mundial e é capaz de afetar todos os tipos de aves, a infecção é transmitida através da ingestão de *E. coli* presente no ambiente e nas fezes dos animais. Os fatores predisponentes incluem higiene deficiente, alimentação contaminada, fatores estressantes, deficiências nutricionais e doenças concomitantes (ZWART, 2010). Uma grande variedade de síndromes e doenças são associadas a infecção por *E. coli* em aves de estimação, estas incluem septicemia (pericardite, aerossaculite, poliserosite, pneumonia e artrite), infertilidade, ingluvite, coligranulomas, doenças respiratórias e enterites (FUDGE, 2001). Os sinais clínicos são variados e inconclusivos. Em aves jovens podem ser constatados sinais de onfalite, aumento dos refugos e mortalidade, já em aves adultas notam-se sintomatologia respiratória, com conjuntivite, rinite, espirros e dispneia e posteriormente observam-se sinais de depressão, anorexia, caquexia, penas arrepiadas ou empenamento deficiente (ANDREATTI FILHO, 2007).

A infecção por *E. coli* em aves é geralmente extra intestinal com início no epitélio da traqueia, em contraste com a maioria dos casos de doenças em humanos e outros mamíferos nos quais a bactéria inicialmente coloniza o epitélio intestinal ou urinário (VIDOTTO et al., 1997). Algumas cepas possuem a capacidade de colonizar e destruir o epitélio intestinal, causando uma enterite pseudomembranosa ou ulcerativa, as aves afetadas apresentam sinais digestórios ou morrem de forma aguda. Poderão ocorrer lesões nos sacos aéreos que determinam uma polisserosite fibrinosa, ocasionalmente observam-se lesões oculares, nervosas e artrite serofibrinosa. Os achados de necropsia incluem: atrofia do músculo do peito, penas sujas de fezes indicando diarreia, hepatomegalia com pontos amarelados distribuídos no parênquima, sacos aéreos opacos, mucosa intestinal hiperêmica e esplenomegalia associada a palidez deste órgão. Na histopatologia visualiza-se necrose hepática periportal, grave depleção linfóide com exsudato fibrinoso no baço e aerossaculite fibrinosa. Também se pode detectar pneumonia fibrinosa, ooforite, enterite catarral, pseudomembranosa ou ulcerativa e microgranulomas em vários órgãos como: fígado, baço, rim e na porção serosa do intestino (GODOY, 2007).

O diagnóstico é realizado através de exame bacteriológico com o isolamento da bactéria de exsudatos ou lesões e pelos achados clínicos e patológicos (GODOY, 2007). Os clínicos de aves, geralmente, não têm acesso a testes de sorotipagem, ensaio de toxicidade, sondas de DNA e técnica de PCR, e sem estes exames complementares não é possível obter informações sobre a patogenicidade da cepa isolada, dificultando o estabelecimento de protocolo terapêutico e prognóstico da ave avaliada (FUDGE, 2001). O tratamento geralmente é realizado com antibióticos de amplo espectro de ação, suplementos vitamínicos, dieta

balanceada e melhoras nas condições sanitárias e de manejo. Aves em estado crítico devem ser mantidas em local aquecido, com alimentação forçada e reposição eletrolítica (GODOY, 2007).

Estudos com aves de produção de granjas localizadas em Bangladesh demonstraram perfil de resistência elevado a antibióticos em isolados patogênicos de *E. coli*, pois dos 101 isolados testados 55% destes apresentaram algum tipo de resistência a um ou mais dos princípios testados. Os compostos que apresentaram maior resistência foram: tetraciclina, sulfa-trimetropim, ácido nalidíxico, ampicilina e estreptomicina (HASAN et al., 2011). Nakamura et al. (1980) observaram multirresistência a antibióticos em 75,1% de amostras isoladas em psitacídeos. Marietto-Gonçalves et al. (2010) analisaram a presença de *E. coli* e *Salmonella* spp. nas fezes de psitacídeos em fase de reabilitação para a vida livre e encontraram alta resistência de *E. coli* a antibióticos como sulfonamida (83%) e a cefaclor (71%).

A patogenicidade em amostras de *E. coli* está relacionada aos fatores de virulência que servem para diferenciar amostras patogênicas de não patogênicas (JOHNSON, 1991). Um grande número de fatores de virulência tem sido detectado em amostras de *E. coli* e outros provavelmente serão descobertos. O processo patogênico que ocorre em uma infecção quase sempre envolve mais de um fator relacionado à virulência (SUSSMAN, 1997). Algumas cepas de *E. coli* patogênicas para aves (APEC – “Avian Pathogenic *E. coli*”) apresentam aumento de resistência aos efeitos líticos do soro (“increased serum survival” – *iss*) sendo esta característica determinada por gene plasmidial (EWERS et al., 2007). Segundo Lynne et al. (2006) o gene *iss* está fortemente relacionado com APEC e não é detectado em *E. coli* comensais, o que torna este gene e a proteína que ele codifica (ISS) um candidato aos procedimentos de controle da colibacilose aviária.

E. coli também expressa alta afinidade por sistemas de captação de ferro que são compostos sideróforos da aerobactina (genes *iuc*) e seus receptores de membrana externa (gene *iutA*) (VIDOTTO et al., 1994; CHOUKHA et al., 2008). DELICATO et al. (2003) sugere que a associação entre *iut* e *iss* pode aumentar o potencial de virulência de APEC. YAGUCHI et al. (2007) descreveram que *iss* e *iutA* estavam amplamente distribuídos em APEC e diferiram significativamente dos índices de positivos em isolados de *E. coli* comensais.

2.1.3 *Klebsiella* spp.

As bactérias deste gênero são Gram negativas e em forma de bacilo. Podem estar arrançadas sozinhas, aos pares ou em cadeias curtas. Possuem cápsula, são imóveis, anaeróbicos facultativos e a maioria dos membros deste gênero são encapsulados. São bactérias oxidase negativas e a maioria dos sorotipos pode utilizar citrato e glicose como única fonte de carbono. Fermentam glicose, produzindo ácido e gás, geralmente são positivos no teste de Voges-Proskauer, hidrolizam uréia e produzem H₂S (GERLACH, 1994; HOLT et al., 1994; OLIVEIRA, 1995).

Normalmente são contaminantes ambientais que ocasionalmente estão associados com mortalidade embrionária, infecções do saco vitelino e mortalidade em aves jovens, como frangos, avestruzes e perus. Também estão implicadas como potencial contaminante do sêmen, sendo necessário adotar rigorosas medidas de higiene no manuseio do sêmen, ovos para incubação e no processo de incubação, para diminuir ao máximo o risco de contaminação por *Klebsiella* spp. Além disso, podem estar associadas com infecções respiratórias e oculares, doenças reprodutivas e septicemia em aves (BARNES, 2003b). Essas bactérias são sensíveis ao calor e ao processo de secagem (GERLACH, 1994).

Aves doentes podem transmitir *Klebsiella* spp. para aves consideradas saudáveis através de suas excreções. Os sinais clínicos observados em pintinhos são: sonolência, debilidade, asas caídas, febre, penas arrepiadas, diarreia severa, prostração e inapetência. Ao nascerem infectados apresentam onfalite (LLEONART et al., 1991). A bacteremia induzida por *Klebsiella* spp. pode levar a falência renal devido a colonização dos rins e, em infecções crônicas, o pulmão também é afetado. Em muitas espécies aviárias, como pombos, gansos e psitacídeos, a infecção somente é detectada quando se iniciam os sinais respiratórios. Nos casos terminais nota-se encefalomielite. As infecções sistêmicas por *Klebsiella* spp. são as mais comuns, mas infecções locais nos seios da face, nas cavidade oral, ingluvío e na pele ocorrem particularmente em Psittaciformes (GERLACH, 1994).

2.1.4. *Proteus* spp.

São bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos, móveis, catalase positivos e oxidase negativos. Hidrolisam uréia, produzem H₂S, e são lisina descarboxilase e lactose negativos. Para a diferenciação entre as espécies (*Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilis*) devem ser analisadas as variações que ocorrem nos testes de indol, Voges-Proskauer e citrato de Simmons (HOLT et al., 1994; OLIVEIRA, 1995).

Proteus spp. fazem parte da microbiota do intestino grosso. Esta bactéria pode infectar os ovos, através da penetração do micro-organismo pela casca do ovo, a penetração é facilitada pela contaminação fecal. Inoculações experimentais demonstraram perdas de até 100% dos embriões de ovos contaminados por *Proteus* spp. Também pode causar infecções do saco vitelino, contaminação de sêmen e mortalidade em frangos, patos e perus jovens. Quadros de septicemia foram observados em codornas e faisões infectados com vírus apatogênico da influenza aviária. Em aves aquáticas é capaz de causar salpingite, artrite, aerossaculite e septicemia. Testes de sensibilidade antimicrobiana realizados com isolados clínicos e de necropsia de perus constataram a sensibilidade a enrofloxacin e ceftiofur (BARNES, 2003b).

2.1.5. *Serratia* spp.

São bacilos Gram negativos, geralmente móveis e anaeróbicos facultativos. Nos testes bioquímicos encontramos as seguintes características: reação de catalase positiva, oxidase negativa, produção variável de indol e os testes de Voges-Proskauer, lisina descarboxilase e citrato de Simmons são negativos. A uréia não é hidrolizada e não produzem H₂S (HOLT et al., 1994).

Serratia sp. é uma bactéria que frequentemente contamina equipamentos médicos e soluções com baixo poder de desinfecção. É um dos principais patógenos nosocomial e tem a capacidade de ocasionar infecções urinárias, respiratórias e bacteremias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). É um importante patógeno relacionado às infecções hospitalares, devido a sua múltipla resistência a antibióticos (CHMEL, 1988). Em aves é considerada um patógeno oportunista (SEGABINAZI et al. 2005).

Um estudo realizado com aves marinhas da ilha de Páscoa avaliou a presença de bactérias em amostras de fezes e a resistência a antibióticos. O principal foco da pesquisa era encontrar isolados com produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que é o principal mecanismo de resistência emergente entre as bactérias da família Enterobacteriaceae. Os pesquisadores encontraram duas bactérias que apresentavam ESBL e estas foram identificadas como *Serratia odorífera* biótipo 1, reforçando assim a importância zoonótica deste achado. Apesar do isolamento geográfico da ilha e mínima presença humana, estes resultados demonstraram que bactérias resistentes aos antibióticos estão distribuídas mundialmente (ARDILES-VILLEGAS et al., 2011).

2.1.6. *Providencia* spp.

A primeira descrição da bactéria é do ano de 1904, quando Rettgeri isolou um micro-organismo ainda não descrito de fezes de galinhas durante um quadro clínico similar a cólera aviária, mas ele não submeteu o isolado a estudos mais detalhados e somente 14 anos depois o isolado foi caracterizado. Este gênero é composto por cinco espécies: *P. alcalifaciens*, *P. heimbachae*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* e *P. stuartii*. O gênero *Providencia* apresenta as seguintes características bioquímicas: citrato de Simmons positivo, não produz H₂S, negativo no teste de lisina e ornitina descarboxilase, fermenta manose e a hidrólise da ureia é variável (O'HARA et al., 2000).

Estudos com aves consideradas clinicamente saudáveis da família Otidae, chamadas genericamente de abetardas, isolaram *P. rettgeri* da cavidade nasal destas aves, sendo assim concluiu-se que esta bactéria faz parte da flora bacteriana fisiológica da cavidade nasal desta família (SILVANOSE et al., 2001). Apesar de considerada uma bactéria da flora fisiológica de algumas espécies de aves, *Providencia* spp. já foi associada a nefrite devido a ascensão da bactéria a partir da cloaca (LUMEIJ, 1994).

2.1.7 *Salmonella* spp.

São bactérias Gram negativas em forma de bastonetes, geralmente móveis por flagelos peritríquios, exceto os sorotipos *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Podem ser aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e suas colônias variam de 2 a 4 mm de diâmetro. Geralmente produzem gás em meio com glicose, não fermentam a lactose e reduzem nitratos em nitritos. (HOLT et al., 1994; OLIVEIRA, 1995; SIQUEIRA, 1995; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A produção de ácido sulfídrico (H₂S) é positiva, podendo ser observadas nos meios TSI (“Triplíce Sugar Iron”) e SIM (Sulfeto Indol Motilidade) provocando coloração negra no fundo dos tubos. A reação de indol é negativa e o citrato é utilizado como fonte de carbono. A descarboxilação da lisina é quase sempre positiva. As provas de urease, triptofano e fenilalanina são negativas (JAWETZ et al., 1991; HOLT et al., 1994; OLIVEIRA, 1995; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Salmonella spp. continua sendo um patógeno de importância mundial para o homem e os animais. Um pequeno número de sorovares é capaz de produzir surtos em indivíduos adultos clinicamente saudáveis. A bactéria geralmente penetra no hospedeiro pela rota fecal-oral e a multiplicação bacteriana ocorre nas linhagens de células de macrófagos e monócitos

(GYLES; FAIRBROTHER, 2010). A morte de aves em decorrência da ingestão de ração contaminada com endotoxinas é rara, geralmente as aves se contaminam de maneira direta. Uma característica interessante é a possibilidade de cepas patogênicas e não patogênicas coabitarem simultaneamente um mesmo hospedeiro. A capacidade de penetrar no hospedeiro que apresente a mucosa intestinal íntegra é o que difere uma cepa patogênica de outra não patogênica, pois cepas não patogênicas necessitam de uma lesão na mucosa intestinal para invadirem a circulação sanguínea (GERLACH, 1994).

Em aves este patógeno é implicado em quadros clínicos agudos e crônicos de salmonelose. Frangos infectados são a causa mais comum de contaminação da cadeia alimentar sendo implicados como reservatórios de *Salmonella* spp. (GAST, 2003). Conforme a espécie afetada por esta bactéria a susceptibilidade do hospedeiro e o desenvolvimento de estado portador variam. As aves de vida-livre normalmente desenvolvem doença subclínica sendo implicadas como um potencial reservatório de *Salmonella* spp. para aviários (GERLACH, 1994).

As bactérias do gênero *Salmonella* spp., principalmente *Salmonella* Typhimurium, podem acometer papagaios. O quadro pode ser agudo com a morte súbita da ave, mas geralmente as aves apresentam sinais de septicemia generalizada com diarreia aquosa, polidipsia e poliúria, sinais respiratórios como dispneia, pneumonia, depressão inapetência e eventualmente a doença cursa com sinais neurológicos. Para a confirmação de salmonelose devem-se aliar os sinais clínicos com a detecção da bactéria através de exame bacteriológico. O tratamento é realizado com antibióticos de amplo espectro, escolhidos de acordo com a cultura e testes de sensibilidade, os antibióticos mais utilizados incluem sulfa-trimetoprim, enrofloxacina e marbofloxacina. A total eliminação da bactéria é muito difícil, por isso aliado ao tratamento clínico com antibióticos devem ser adotadas medidas rigorosas de higiene e desinfecção. Mesmo após o tratamento a ave pode manter-se como portadora, disseminando a bactéria no ambiente. Para descartar o estado de portador é necessário se obter três amostras de fezes livres de *Salmonella* spp. Em canários e pintassilgos a existência de indivíduos portadores nunca foi documentada (SANDMEIER; COUTTEEL, 2006; HARCOURT-BROWN, 2010).

Embora as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de aves de estimação não sejam consideradas importantes patógenos humanos, existe o potencial destas cepas afetarem indivíduos imunossuprimidos, idosos e crianças. Humanos infectados com esta bactéria também podem infectar suas aves de companhia. Tais interações, entre humanos e animais, já

foram documentadas em papagaios africanos, cacatuas, araras e papagaios do gênero *Amazona* (GERLACH, 1994).

Diante do exposto, o Capítulo I desta dissertação buscou analisar as principais enterobactérias de psitacídeos mantidos em criadouro conservacionista, sendo que muitas dessas aves foram vítimas do tráfico de animais silvestres. Para esta análise realizamos suabes cloacais e posterior análise microbiológica. No seguinte capítulo, o objetivo do trabalho foi pesquisar *Escherichia coli*, bem como de seus fatores de virulência (*iss* e *iutA*), em diferentes tipos de amostras como suabes de cloaca e inglúvio, e órgãos de aves submetidas a exame de necropsia que apresentassem lesões macroscópicas.

Os psitacídeos utilizados neste estudo eram em sua maioria papagaios-charão (*Amazona pretrei*) mantidos em cativeiro (Apêndice A), espécie classificada como vulnerável pela Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Também encontram-se na lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção (MMA/IBAMA), fato este que torna os resultados obtidos essenciais para a adoção de medidas profiláticas que visem assegurar a preservação desta espécie, ao melhorar os aspectos relacionados a biosseguridade e minimizar os riscos para a saúde pública.

3 CAPÍTULO I

PRINCIPAIS ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE PSITACIDEOS EM CRIADOURO CONSERVACIONISTA NO SUL DO BRASIL

Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa, Fernanda Flores, Gustavo Henrique Schneiders, Larissa
Quinto Pereira, Luana Ribeiro Vivian, Simone Didoné Rosa, Lauren Sagave, Maristela
Lovato

Principais enterobactérias isoladas de psitacídeos em criadouro conservacionista no Sul do Brasil

Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa, Fernanda Flores, Gustavo Henrique Schneiders, Larissa Quinto Pereira, Luana Ribeiro Vivian, Simone Didoné Rosa, Lauren Sagave, Maristela Lovato

RESUMO

As aves silvestres possuem importância para a saúde pública por albergarem patógenos passíveis de transmissão zoonótica. O deslocamento territorial dessas aves, como o que ocorre no tráfico de animais selvagens, constitui um mecanismo de propagação de novos focos endêmicos de agentes infecciosos a grandes distâncias dos locais onde foram adquiridos. Infecções bacterianas são causas frequentes de enfermidades que acometem aves em zoológicos e criadouros. Os animais infectados podem tornar-se um risco à saúde pública, uma vez que, em alguns locais, as aves estão expostas a visitação ou são mantidas como animais de estima o possibilitando um estreito contato com o homem. Este trabalho teve como objetivo relatar as principais enterobactérias isoladas de psitacídeos mantidos em criadouro conservacionista, para tanto foram realizados suabes cloacais em 36 aves e posterior análise microbiológica. As bactérias encontradas foram: *Escherichia coli* (40%), *Serratia odorífera* (26,9%), *Enterobacter aerogenes* (10%), *Salmonella* spp. (6,6%), *Proteus vulgaris* (6,6%), *Providencia* spp. (3,3%), *Serratia liquefaciens* (3,3%) e *Klebsiela oxytoca* (3,3%).

Palavras-chave: aves silvestres, análise microbiológica, suabe de cloaca, bactérias Gram negativas.

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal de Psitaciformes é composta principalmente por bactérias Gram positivas, destacando-se as do gênero *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptomyces* spp., *Gaffkya* spp., *Aerococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp., não hemolíticos; além de fungos e leveduras (BANGERT et al., 1988; FLAMMER; DREWES, 1988) não se considerando saudável a presença de bactérias Gram negativas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), sendo as bactérias Gram negativas a causa mais comum de doença bacteriana sintomática (OGLESBEE; BISHOP, 2003).

A principal causa de infecções bacterianas sistêmicas em psitacídeos pode estar associada com bactérias Gram negativas. As enterobactérias mais comumente isoladas incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp e *Yersinia pseudotuberculosis* e *Pseudomonas* spp. As infecções sistêmicas envolvendo estes micro-organismos geralmente resultam da invasão do intestino. Feridas contaminadas e infecções urinárias e respiratórias causadas por estas bactérias podem culminar com infecções sistêmicas envolvendo o fígado (SCHMIDT et al., 2003).

As aves silvestres tem importância para a saúde pública por albergarem patógenos passíveis de transmissão zoonótica. O deslocamento territorial dessas aves, como o que ocorre no tráfico de animais selvagens, é considerado um mecanismo de propagação de novos focos de agentes infecciosos para grandes distâncias dos locais onde foram adquiridos. Desta forma as enterobactérias podem persistir por longos períodos de tempo quando o ambiente é contaminado com as excretas das aves (BARNES et al., 2003b; IKUNO et al. 2008).

A determinação das bactérias presentes na microbiota intestinal pode servir como subsídio para determinar a etiologia de doenças, sendo uma ferramenta útil na elaboração de programas para o controle de infecções. Também se pode medir o potencial zoonótico dos agentes que acometem esses animais e assim elaborar medidas para a conservação destas espécies aviárias (CORRÊA, 2007; ALLGAYER et al., 2009).

No ambiente natural a pressão pela sobrevivência, a alimentação e a disputa territorial devem influir na flora fisiológica, assim como no cativeiro onde o alimento sofre as mais

diferentes fontes de contaminação o que pode favorecer alterações na flora oral e intestinal (LOVATO, 2012 – Informe verbal).

Este trabalho visa relatar as principais enterobactérias isoladas através de suabes cloacais de psitacídeos mantidos em um criadouro conservacionista no Sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletou-se suabes cloacais de 36 psitacídeos oriundos de criadouro conservacionista, dos quais: nove papagaios-galego (*Amazona xanthops*); 21 araras-canindé (*Ara ararauna*); quatro maritacas-de-cabeça-roxa (*Pionus menstruus*) e duas maritacas-roxa (*Pionus fuscus*). A maior parte destas aves foi vítima do tráfico de animais silvestres e não apresentavam sintomatologia de diarreia no momento da coleta. As amostras foram enriquecidas em caldo infusão cérebro-coração (BHI) por 24 horas a 37°C, após semeou-se em placas de Ágar MacConkey e foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C. Para o enriquecimento seletivo de *Salmonella* spp. utilizou-se a metodologia descrita por BRASIL (2003), com algumas modificações, onde alíquotas de 100µL e 1mL foram inoculadas em caldo Rapaport-Vassiliadis e Tetrionato respectivamente, e incubadas por 24 horas a 41°C. Após foram plaqueadas em Ágar Verde Brilhante (VB) e Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e incubadas por 24 horas a 37 °C. As placas que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas à caracterização física e bioquímica das colônias para identificação das bactérias presentes. Os meios utilizados na caracterização bioquímica foram “Triple Sugar Iron” (TSI), Citrato de Simmons, “Lysine Iron Agar” (LIA), meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM) e caldo Urease. A metodologia utilizada neste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (UFMS) com o seguinte número de parecer: 097/2011.

RESULTADOS

Das amostras analisadas, 30 apresentaram crescimento bacteriano significativo e seis delas foram negativas. Os papagaios-galegos avaliados seis aves (66,7%) foram positivas para *Serratia odorifera* e em três suabes cloacais (33,4%) não houve crescimento bacteriano. As bactérias isoladas nos suabes cloacais das araras-canindé foram *Escherichia coli* em dez aves (47,6%), *Enterobacter aerogenes* em três amostras (14,2%), duas amostras positivas para *Serratia odorifera* (9,5%), duas positivas para *Salmonella* spp. (9,5%) e uma amostra positiva para *Providencia* sp. (4,7%), outra para *Klebsiella oxytoca* (4,7%) e um isolamento de *Serratia liquefaciens* (4,7%). Em uma amostra (4,7%) não houve crescimento de enterobactérias. Nas amostras de maritacas-de-cabeça-roxa houve crescimento de *Proteus vulgaris* em duas amostras (50%); um suabe cloacal foi positivo para *Escherichia coli* (25%) e uma amostra (25%) foi negativa. Das maritacas-roxa analisadas houve crescimento de *Escherichia coli* na amostra de uma ave (50%) e em uma (50%) não houve crescimento bacteriano. As bactérias encontradas e seu percentual de isolamento encontram-se descritos na Tabela 1.

DISCUSSÃO

Segundo Fudge (2001) *Serratia* spp. causam infecções oportunistas em mamíferos, inclusive humanos. Apesar deste micro-organismo não fazer parte da flora fisiológica de psitacídeos e de rapinantes, não é comum a associação de *Serratia* spp. com doença nestas espécies, o que pode ocorrer é um comprometimento do status geral da ave. Siqueira et al. (2008) pesquisaram enterobactérias em ovos de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) e encontraram uma baixa prevalência, de 1,47%, para a bactéria *Serratia* spp. Gerlach (1994) afirma que bactérias *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Hafnia* spp. e *Proteus* spp. são micro-organismos de baixa patogenicidade para aves. Nosso estudo encontrou um alto percentual (26,9%) de isolamento de *Serratia odorifera* e *Serratia liquefaciens* (3,3%) o que indica a necessidade de acompanhamento constante das aves para verificar a presença do agente, pois

mesmo sendo descrito como pouco patogênico, o nível de detecção foi elevado e pode trazer riscos para o estado geral de saúde das aves.

O isolamento de *E. coli* em psitacídeos pode ser atribuído a erros no manejo das aves, como aglomeração de espécies diferentes em um mesmo recinto, alimentos contaminados, sementes inadequadas para a espécie e deficiência no controle de roedores, insetos e outras aves que possam servir como carreadoras do agente (MARIETTO-GONÇALVES et al., 2004). *E. coli* foi a enterobactéria mais isolada de suabes cloacais em anseriformes da espécie asa-branca (*Dendrocygna autumnalis*) (AGUIRRE et al., 1992) e também em amostras de fezes de marabu (*Leptoptilos crumeniferus*), uma espécie de cegonha africana, a provável causa deste isolamento foi atribuída a fontes de alimento e água contaminados (NYAKUNDI; MWANGI, 2011). Concordando com estes estudos, encontramos o predomínio de *E. coli* nos suabes analisados o que reforça a necessidade de adoção de medidas que visem impedir a manifestação de doença clínica, pois esta bactéria é potencialmente patogênica sobretudo para psitacídeos.

Enterobacter spp. é usualmente isolado do trato alimentar de aves consideradas saudáveis. Bactérias deste gênero são frequentemente encontradas no ambiente e em alimentos frescos. É considerada incomum a manifestação de doença relacionada a este micro-organismo em aves de estimação, mas este pode ser um patógeno oportunista em pacientes imunossuprimidos (FUDGE, 2001). Como as aves deste estudo são, na sua maioria, oriundas de apreensões do tráfico de animais silvestres esta bactéria não deve ser depreciada devido à possibilidade das aves serem imunossuprimidas o que pode favorecer infecções oportunistas.

Somente nos suabes cloacais de maritacas-de-cabeça-roxa identificamos amostras positivas para *Proteus vulgaris*. Apesar deste micro-organismo fazer parte da microbiota fisiológica do intestino grosso, ele é capaz de infectar ovos. Inoculações experimentais demonstraram perdas de até 100% dos embriões de ovos contaminados por *Proteus* spp. Quadros de septicemia por *Proteus* spp. já foram observados em codornas e faisões infectados com vírus apatogênico da influenza aviária, o que indica tratar-se de um patógeno oportunista. Em aves aquáticas esta bactéria é implicada em casos de salpingite, artrite, aerossaculite e septicemia. Testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados com isolados clínicos e de necropsia de perus, sendo constatada a sensibilidade a enrofloxacina e ceftiofur (BARNES, 2003b).

Estudos com aves consideradas clinicamente saudáveis da família Otidae, chamadas genericamente de abetardas, isolaram *Providencia rettgeri* da cavidade nasal destas aves,

sendo assim inferiu-se que esta bactéria faz parte da flora bacteriana fisiológica da cavidade nasal desta família (SILVANOSE et al., 2001). *Providencia* spp. foi isolada de apenas uma arara-canindé, mas apesar de considerada uma bactéria da flora fisiológica de muitas espécies de aves, já foi associada a quadros de nefrite devido a ascensão da bactéria a partir da cloaca (LUMEIJ, 1994).

Klebsiella oxytoca, que foi isolada de uma arara-canindé, é considerada um contaminante ambiental que ocasionalmente está associado à mortalidade embrionária, infecções do saco vitelino e mortalidade de aves jovens, como frangos, avestruzes e perus. Além disso, pode ser implicada com infecções respiratórias e oculares, doenças reprodutivas e quadros de septicemia em aves (BARNES, 2003b).

Segundo Daoust e Prescott (2007) infecções por *Salmonella* spp. em aves silvestres são em sua maioria adquiridas do ambiente e geralmente, com algumas exceções, essas aves tem pouca implicância na transmissão da bactéria para o homem e outros animais. Pesquisas demonstram que o transporte de *Salmonella* spp. por meio de aves de vida livre, migratórias e não migratórias, é raro nas aves que não tem acesso a fontes de água e alimentos contaminados. Allgayer et al. (2009) detectaram, por meio de suabes cloacais, *Salmonella* Braenderup em um filhote de arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) e alertaram sobre o alto potencial zoonótico desse sorovar e sobre a necessidade de adoção de medidas de controle sanitário para psitacídeos em seu ambiente natural. Gaukler et al. (2009) analisaram 434 amostras de fezes de *Sturnus vulgaris* e detectaram três amostras positivas (0,69%) para *Salmonella* spp. Marietto-Gonçalves et al. (2010) avaliaram 103 aves e detectaram *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis em três (2,9%) papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*). Mesmo com um baixo percentual de detecção na maioria dos estudos, e neste em questão, é imprescindível a realização de exames microbiológicos específicos que possibilitem o isolamento desta bactéria, pois, mesmo sendo baixo, existe risco de transmissão para humanos e outras aves.

CONCLUSÃO

As enterobactérias com maior ocorrência nos psitacídeos estudados foram *Escherichia coli* e *Serratia odorífera*, além da detecção de duas amostras positivas para *Salmonella* spp.

Alguns destes micro-organismos isolados são potencialmente patogênicos para aves e humanos tornando-se um risco para saúde pública.

Estes resultados indicam a necessidade de medidas preventivas que visem melhorar as condições sanitárias, como por exemplo, reduzir a contaminação dos alimentos e controlar roedores. Também se confirmou a importância da monitoria para enterobactérias em psitacídeos, devido ao elevado percentual de detecção de bactérias, pois apenas seis amostras não demonstraram crescimento de bactérias Gram negativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, A. A. et al. Cloacal flora isolated from wild black-bellied whistling ducks (*Dendrocygna autumnalis*) in Laguna La Nacha, Mexico. **Avian Diseases**, v. 36, n. 2, p. 459-462, 1992.

ALLGAYER, M. C. et al. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2542-2545, 2009.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J-P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Org.) **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2003a. p. 631-656.

BARNES, H. J. Other bacterial diseases. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Org.) **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2003b. p. 797-862.

BANGERT, R. L. et al. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 32, n. 1, p.46-52, 1988.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da defesa Agropecuária. **Instrução Normativa SDA n.62, de 26 de agosto de 2003**. Métodos analíticos

oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 2003.

CORRÊA, S. H. R. **Estudo epidemiológico de doenças infecciosas em anatídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo**. São Paulo, 2007. Tese (Doutorado em epidemiologia experimental aplicada à zoonoses) – Universidade de São Paulo – Medicina Veterinária, 89p.

DAOUST, P-Y; PRESCOTT, J. F. Salmonellosis. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 270-288.

FLAMMER, K.; DREWES, L. A. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. **Avian Diseases**, v.32, n. 32, p. 79-83, 1988.

FUDGE, A. M. Diagnosis and treatment of avian bacterial diseases. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, p.3-11, 2001.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Org.) **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p. 949-983.

IKUNO, A. A. et al. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. **Anais 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado. 2008.

LOVATO, M. Informe verbal. Informação recebida de maristelalovato@gmail.com em 05 de jan. de 2012.

LUMEIJ, J. T. Nephrology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Org.) **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p. 538-555.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A. et al. Colisepticemia em Papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p. 56-60, 2007.

NYAKUNDI, W. O.; MWANGI, W. Isolation and characterization of pathogenic bacteria and fungi from *Leptoptilos crumeniferus* (Marabou Stork) droppings. **Journal of Applied Technology in Environmental Sanitation**, v.1, p. 93-106, 2011.

OGLESBEE, B. L.; BISHOP, C. L. Doenças infecciosas aviárias. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – Clínica de pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 1540-1555.

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of Pet and Aviary Birds**. Ames: Blackwell Publishing, 2003. p. 67-93.

SILVANOSE, C. D. et al. Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. **Avian Diseases**, v.45, p.447-451, 2001.

SIQUEIRA, A. A. et al. Identificação de enterobactérias em ovos de codornizes japonesas (*Coturnix japonica*) na Região Metropolitana de Fortaleza – Ce, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 103, p. 78-82, 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

Tabela 1. Porcentagem de detecção de Enterobactérias em suabes cloacais de psitacídeos

Bactérias Isoladas	Número de Amostras	Percentual de amostras
	Positivas	positiva
<i>Escherichia coli</i>	12	40%
<i>Serratia odorífera</i>	8	26,9%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	10%
<i>Proteus vulgaris</i>	2	6,6%
<i>Salmonella</i> spp.	2	6,6%
<i>Providencia</i> spp.	1	3,3%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	3,3%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	3,3%
Total	30	100%

4 CAPÍTULO II

DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* E ANÁLISE DE *Salmonella* spp. EM PSITACÍDEOS

Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa, Fernanda Flores, Gustavo Henrique Schneiders,
Larissa Quinto Pereira, Benito Guimarães de Brito, Maristela Lovato

Artigo enviado para publicação na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*

Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos

Corrêa I.M.O., Flores F., Schneiders G.H., Pereira L.Q., Brito B.G. e Lovato M.

ABSTRACT.- Corrêa I.M.O, Flores F., Schneiders G.H., Pereira L.Q., Brito B.G. & Lovato M. 2012. [Detection of virulence factors in *Escherichia coli* and analysis of *Salmonella* spp. in psittacines] Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima, 1000. Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: nepas.ufsm@gmail.com

The enteric flora of psittacines is mainly composed of Gram positive bacteria. The presence of Gram negative bacteria is considered environmental contamination and a sign of illness. The objective of this study was to evaluate the presence of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and the virulence factors *iss* and *iutA* of *E. coli* isolates. Forty-four samples were analyzed from parrots submitted to necropsy and also cloacal and crop swabs of red-spectacled parrots (*Amazona pretrei*) living in captivity. No samples were positive for *Salmonella* spp. In the samples in which *E. coli* was detected, both virulence factors (*iss* and *iutA*) were present, indicating a high virulence of strains isolated from psittacines.

INDEX TERMS: *iss*, *iutA*, *Amazona pretrei*, PCR.

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Av. Roraima, 1000. Prédio 44, sala 5152, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: nepas.ufsm@gmail.com

³ Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS, Brasil.

RESUMO.- A flora entérica dos psitacídeos é composta principalmente por bactérias Gram positivas, sendo que a presença de bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., é um indicativo de doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e os fatores de virulência *iss* e *iutA* dos isolados de *E. coli*. Analisou-se um total de 44 amostras provenientes de psitacídeos criados em cativeiro, sendo estas 15 fragmentos de órgãos de aves submetidas a exame de necropsia e também 29 amostras de suabes de cloaca e ingluvío de papagaios-charão (*Amazona pretrei*) criados em cativeiro. Nenhuma amostra foi positiva para *Salmonella* spp. Nas amostras de *E. coli* detectou-se ambos os fatores de virulência pesquisados, indicando alto percentual de virulência das cepas isoladas de psitacídeos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *iss*, *iutA*, *Amazona pretrei*, PCR.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior número de espécies de aves da família Psittacidae, pois das 344 espécies existentes no mundo, 72 são brasileiras, sendo esse grupo aviário um dos principais alvos do comércio ilegal da fauna silvestre (Sigrist 2006). As aves domésticas são os maiores reservatórios de *Salmonella* spp. (Gast 2003), sendo *Salmonella* Typhimurium o sorovar mais isolado em aves de estimação (Menão et al. 2000).

Encontradas em todas as partes do mundo, as salmonelas infectam e são transportadas por uma grande variedade de hospedeiros, incluindo humanos, animais silvestres e domésticos. Informações sobre a ocorrência e distribuição dos sorovares de salmonelas na população de animais silvestres e domésticos são essenciais para relacionar os possíveis reservatórios que possam ser responsáveis pela sua transmissão (Gast 2003).

Na grande maioria das espécies aviárias *Escherichia coli* é descrita como sendo um patógeno mais frequentemente isolado que *Salmonella* spp., sendo a enterobactéria mais descrita no mundo (Gerlach 2004). Durante o processo evolutivo algumas cepas de *E. coli* adquiriram diferentes conjuntos de genes que lhe conferiram a capacidade de ocasionar doença, fato que determina a grande versatilidade patogênica dessa espécie (Hirsh 2004).

A microbiota intestinal de psitacídeos é composta principalmente por bactérias Gram positivas, não sendo considerada saudável a presença de bactérias Gram negativas (Bangert et al. 1988, Flammer & Drewes 1988, Harrison & McDonald 1996). Segundo Marietto-Gonçalves et al. (2010) o monitoramento para a presença de bactérias Gram negativas da microbiota entérica de psitacíformes deve ser incluído na rotina de criação destas aves, pois não pertencem à flora fisiológica havendo risco de disseminação de possíveis patógenos para o homem e outros animais.

O conceito de patogenicidade em amostras de *E. coli* está relacionado com o impacto de um ou vários fatores de virulência que servem para diferenciar amostras patogênicas de não patogênicas (Johnson 1991). Muitos genes que codificam estes fatores são encontrados em plasmídeos conjugativos, por causa da ocorrência de resistência bacteriana nestes mesmos plasmídeos é possível que o uso de agentes antimicrobianos possa selecionar a persistência de *E. coli* que os contem (Johnson 2004). Algumas cepas de *E. coli* patogênicas para aves (APEC – Avian Pathogenic *E. coli*) apresentam aumento de resistência aos efeitos líticos do soro (increased serum survival – *iss*) sendo esta característica determinada por gene plasmideal (Ewers et al. 2007).

E. coli também expressa alta afinidade por sistemas de captação de ferro que são compostos sideróforos da aerobactina (genes *iuc*) e seus receptores de membrana externa (gene *iutA*) (Vidotto et al. 1994, Chouikha et al. 2008). Delicato et al. (2003) sugerem que a associação entre *iut* e *iss* pode aumentar o potencial de virulência de APEC. Yaguchi et al. (2007) descreveram que *iss* e *iutA* estavam amplamente distribuídos em APEC e diferiram significativamente dos índices de positivos em isolados de *E. coli* comensais.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e dos fatores de virulência para *E. coli*, *iss* e *iutA*, através da análise de suabes cloacais e de inglúvio de psitacídeos mantidos em cativeiro e também de amostras coletadas de diferentes órgãos em exames de necropsia de papagaios-charão (*Amazona pretrei*) da mesma procedência.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* utilizaram-se 44 amostras divididas em: 29 amostras de suabes, sendo 14 suabes de inglúvio e 15 suabes de cloaca de psitacídeos, utilizando-se um total de 15 aves amostradas, a maior parte destes papagaios-charão (*Amazona pretrei*), uma arara-canindé (*Ara ararauna*) e uma maitaca-verde (*Pionus maximiliani*). Também foram analisados 15 órgãos provenientes de exames necroscópicos de oito papagaios-charão, que tiveram morte espontânea e eram oriundos do mesmo local. O critério de escolha dos órgãos para análise microbiológica foi conforme observação de lesões macroscópicas. Os órgãos avaliados foram: sete fragmentos de intestino, quatro amostras de fígado, uma porção do proventrículo, uma de ventrículo, uma de cloaca e também uma amostra de fezes.

Os fragmentos de órgãos, suabes cloacais e de ingluvío foram incubados em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”) a 37°C por 24 horas. Após foi realizada semeadura em placa de Ágar Sangue e Ágar MacConkey e incubação a 37°C por 24 horas. Para análise de *Salmonella* spp. utilizou-se a metodologia descrita por BRASIL (2003) com algumas modificações, onde alíquotas de 100µL e 1mL do caldo BHI foram inoculadas em caldos de enriquecimento seletivo, Rapaport Vassiliadis e Tetracionato respectivamente, e incubadas por 24 horas a 41°C. Após foram plaqueadas em Ágar Verde Brilhante (VB) e Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e incubadas por 24 horas a 37°C. As placas que apresentaram crescimento bacteriano foram submetidas à caracterização morfológica e bioquímica das colônias. Os meios utilizados na caracterização bioquímica foram “Triple Sugar Iron” (TSI), Citrato de Simmons, “Lysine Iron Agar” (LIA), meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM) e caldo Urease, após a identificação final as colônias bacterianas foram semeadas em Ágar Nutriente e estocadas a 5°C.

Posteriormente foram selecionadas quatro amostras de *E. coli*, sendo estas representativas de duas aves submetidas a necropsia e de dois isolados de aves clinicamente saudáveis, e remetidas para o Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), para a realização de antibiograma pelo teste de disco-difusão e identificação final. Foram testados os seguintes antimicrobianos: Fosfomicina, Cloranfenicol, Cefoxitina, Ciprofloxacina, Ampicilina, Gentamicina, Ácido Nalidíxico, Imipenem, Nitrofurantoína, Cefepime, Streptomina, Ceftazidima, Tetraciclina, Sulfametoxazol Trimetoprim.

Um total de 28 amostras positivas no exame microbiológico para *Escherichia coli* foram submetidas à reação da polimerase em cadeia (PCR) para detecção dos fatores de virulência *iss* e *iutA*. Para a reação da polimerase em cadeia (PCR), o DNA foi extraído por fervura e quantificado em NanoDrop™ 1000 “spectrophotometer” (Thermo Scientific). A amplificação do DNA foi feita em solução com volume final de 25µL contendo 14,3µL de DNA e mistura para PCR com 2mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTPs, 10pmol de cada “primer” *iss* (5'- GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC- 3' e 5'- CGC CTC GGG GTG GAT AA - 3') ou *iutA* (5'- GGC TGG ACA TGG GAA CTG G -3' e 5'- CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG - 3') e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Milan, Italy).

Para a análise do gene *iss* (760pb) a mistura foi submetida, em um termociclador (Mastercycler – Eppendorf, Hamburg, Deutschland), a uma temperatura de 94°C por cinco minutos e 30 ciclos de amplificação, compreendidos por desnaturação a 94°C durante um minuto, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C durante dois minutos. Após esses ciclos procedeu-se etapa final de 72°C por sete minutos. Para gene *iutA* (300pb) a

amplificação consistiu de ciclo inicial de 94°C por cinco minutos, 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C durante um minuto, pareamento a 63°C por um minuto e extensão a 72°C por dois minutos. Após seguiu-se etapa final de 72°C por dois minutos.

Os resultados foram obtidos após a corrida dos amplificadores por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE (1X), a 90V, durante aproximadamente 45 minutos, corados com GelRed (Uniscience) e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador. Foi utilizado marcador de peso molecular Ladder 100pb (Promega, Madison, WI).

RESULTADOS

Das 29 amostras de suabes cloacais e de ingluvío analisadas obteve-se isolamento e caracterização bioquímica compatível com *E. coli* em 14 amostras (Quadro 1). As aves analisadas nesta etapa eram consideradas saudáveis e não apresentavam sinais clínicos de colibacilose no período da coleta. Das 14 amostras onde se confirmou o isolamento de *E. coli* 13 delas, correspondentes a dez aves, foram testadas para os fatores de virulência *iss* e *iutA*. Sendo que, dos oito suabes cloacais testados sete foram positivos para o gene *iss* (87,5%) e cinco foram positivos para o gene *iutA* (62,5%). Os cinco suabes de ingluvío analisados tiveram 100% de detecção do gene *iss*, e para o gene *iutA* obtivemos quatro amostras positivas o que representou 80%.

Todos os papagaios-charão necropsiados, em número de oito, tiveram o diagnóstico confirmado de colibacilose, pois além dos sinais clínicos compatíveis, a bactéria foi isolada de todas as amostras. No exame de necropsia constatou-se que as aves apresentavam estado nutricional que variou de ótimo a péssimo (Figura 1), para esta avaliação foi realizada inspeção visual da musculatura peitoral e gordura de cobertura do esterno, também se constatou aerossaculite, pericardite, perihepatite, lesões hemorrágicas na mucosa do intestino e tamponamento de cloaca (Figura 2). A análise dos órgãos das aves submetidas a necropsia demonstrou a detecção do gene *iss* em sete aves (85,7%) e do gene *iutA* em seis psitacídeos necropsiados. Dos sete isolados de *E. coli* do intestino detectamos o gene *iss* em seis fragmentos (85,7%) e o gene *iutA* em cinco (71,4%). Das quatro amostras de fígado testadas três (75%) foram positivas para *iss* e gene *iutA*. Os isolados do proventrículo, ventrículo e cloaca demonstraram expressão dos genes *iss* e *iutA* representando 100%. Já a amostra de fezes somente expressou o gene *iss* sendo negativa para *iutA*.

Todos os isolados encaminhados para a Fiocruz obtiveram a confirmação para a bactéria *E. coli* e três deles foram classificados em *Escherichia coli* (rugosa) e uma amostra

não aglutinou nos antissoros EPEC/EIEC. Com relação ao perfil de resistência uma amostra de suabe cloacal foi resistente a cloranfenicol e cefoxitina e uma amostra de material analisado em necropsia mostrou-se resistente a ampicilina, tetraciclina, estreptomicina e sulfametoxazol-trimetropim. Os demais isolados foram sensíveis a todos os antibióticos testados.

Os órgãos avaliados e o percentual de detecção dos genes de virulência, bem como a análise dos suabes cloacais e de ingluvío, se encontram descrito no Quadro 2. Em nenhuma etapa deste estudo isolou-se *Salmonella* spp. nas amostras analisadas.

DISCUSSÃO

Neste estudo a bactéria *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma amostra submetida ao enriquecimento seletivo concordando com o demonstrando por Gopee et al. (2000) que relataram a baixa frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em aves silvestres de cativeiro quando comparada a mamíferos e répteis. Gaukler et al. (2009) analisaram 434 amostras de fezes de *Sturnus vulgaris* e encontrou *Salmonella* spp. em apenas três (0,69%) amostras. Marietto-Gonçalves et al. (2010) avaliaram 103 aves, em sua maioria psitacídeos, e detectaram a presença de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis em três (2,9%) psitacídeos. Apesar de este estudo confirmar a baixa frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em aves silvestres não devemos menosprezar este patógeno, pois uma vez presente poderá determinar sinais clínicos severos e mortalidade elevada. Segundo Allgayer et al. (2009) informações sobre a ocorrência e distribuição de *Salmonella* spp. em animais selvagens e domésticos são fundamentais para detectar os possíveis reservatórios que possam ser responsáveis pela manutenção e disseminação deste agente.

Uma hipótese para a elevada taxa de detecção de *E. coli* nas aves analisadas se deve ao fato de serem aves silvestres criadas em cativeiro passíveis de estresse crônico. Godoy (2007) relata que a colibacilose é frequente em psitacídeos mantidos em local com grande número de indivíduos, onde há facilidade na dispersão da bactéria pela contaminação fecal da água, do alimento e ambiente onde as aves vivem. A não manifestação de sinais clínicos e o isolamento de *E. coli* nos psitacídeos submetidos a suabes cloacais e de ingluvío pode ser atribuído ao fato desta patologia apresentar início repentino e sinais clínicos inespecíficos, como postura sonolenta da ave, eriçamento de penas, diarreia, poliúria e anorexia (Friend & Frason, 1999).

Segundo Silveira et al. (1994) somente a detecção do plasmídeo contendo o gene *iss* não é suficiente para caracterizar uma cepa de *E. coli* como patogênica, mas este gene pode

ser considerado como marcador de virulência, pois o gene *iss* é o mais prevalente em cepas provenientes de isolados de aves doentes (Delicato et al. 2003, Foley et al. 2003, Nolan et al. 2003, Ozawa et al. 2008). Na avaliação dos fatores de virulência presentes nos isolados provenientes de suabes encontraram-se resultados semelhantes, pois os suabes de inglúvio foram todos positivos para o gene *iss* e somente em um isolado não foi demonstrado o gene *iutA*. Apesar de estas aves terem sido classificadas como saudáveis, não descartamos a possibilidade de cepas patogênicas de *E. coli* estarem circulando nesta população de psitacídeos, uma vez que foi detectado ambos os fatores de virulência e serem aves da mesma procedência das aves submetidas a necropsia, nas quais colibacilose foi confirmada como causa da morte.

Gaukler et al. (2009) avaliaram 206 isolados de *E. coli* em amostras de fezes de *Sturnus vulgaris* selvagens e não encontraram nenhuma amostra positiva para o gene *iutA* embora ele seja comumente isolado de APEC. O mesmo ocorreu na amostra de fezes deste estudo a qual foi negativa para o gene *iutA* e positiva para o gene *iss*, corroborando que o gene *iutA* não seja comumente detectado em amostras de fezes de aves. Já o gene *iss* foi detectado em todos os isolados classificados como patogênicos, indicando que o gene *iss* é mais comum em aves selvagens e tem maior correlação com a patogênese da doença.

Abreu et al. (2010) detectaram a presença do gene *iss* em 55% das cepas de *Escherichia coli* isoladas da traqueia de codornas destinadas ao abate. Delicato et al. (2003) encontraram 38,5% de positivos em isolados traqueais e de fígado de aves com colibacilose quando testadas para o gene *iss*. Ewers et al. (2007) detectaram o gene *iss* em 84% dos isolados de APEC. Ikuno et al. (2008) avaliaram 57 isolados de *E. coli* provenientes de aves silvestres submetidas à quarentena e encontraram 26,6% de positivos para gene *iss*. Estes resultados reforçam a alta taxa de positividade para o gene *iss* encontradas no presente artigo, onde 93,3% das amostras de órgãos apresentaram este gene e 92,3% das amostras de suabes foram positivas.

O gene *iutA* foi positivo para 73,3% das amostras de órgãos estudadas e em 69,2% das amostras de suabes cloacais e em 92,3% dos suabes de inglúvio, resultado semelhante aos trabalhos de Delicato et al. (2003) que encontraram 63% de amostras positivas para o gene *iutA* em isolados de galinhas com colibacilose e Trampel et al. (2007) que descreveram a presença deste gene em quatro galinhas, de um total de cinco, com lesões de peritonite. Yaguchi et al. (2007) avaliaram 125 amostras de *E. coli* de frangos de corte com lesões de colisepticemia e encontraram o gene *iutA* em 74,4% destes isolados.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os psitacídeos avaliados não apresentam potencial de disseminação de *Salmonella* spp., uma vez que a bactéria não foi isolada de nenhuma amostra analisada.

Comprovou-se o elevado potencial de virulência de *E. coli*, tanto das amostras de aves consideradas saudáveis como das aves mortas em decorrência da colibacilose, uma vez que o gene *iss* e *iutA* foram expressos na maior parte dos isolados de *E. coli* testados. É fundamental a monitoria para *E. coli* e outras enterobactérias em criadouros de aves silvestres, especialmente psitacídeos, devido ao risco de disseminação desta bactéria nos recintos e elevada taxa de mortalidade que possa vir a ocorrer em decorrência da patogenicidade desta bactéria para as aves.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/REUNI), pela concessão de bolsa de mestrado ao autor Isadora Mainieri de Oliveira Corrêa. Aos proprietários do Criadouro Comercial que permitiram a realização das coletas. À equipe do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias (LCDPA/UFSM). Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) pela parceria no processamento das amostras.

REFERÊNCIAS

- Abreu D.L.C., Franco R.M., Nascimento E.R., Pereira V.L.A, Alves F.M.X. & Almeida J.F. 2010. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene *ISS* pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 30: 406-410.
- Allgayer M.C., Oliveira S.J., Mottin V.D., Loiko M.R., Abilleira F., Guedes N.M.R., Passos D.T. & Weimer T.A. 2009. Isolamento de *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). *Ciência Rural*. 39: 2542-2545.
- Brasil, Portaria número 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Ministério da agricultura do abastecimento e da reforma agrária. Brasília.
- Bangert R.L., Cho B.R., Widders P.R., Stauber E.H. & Ward A.C.S. 1988. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. *Avian Diseases*. 32: 46-52.
- Chouikha I., Bree A., Moulin-Schouleur M., Gilot P. & Germon P. 2008. Differential expression of *iutA* and *ibeA* in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. *Microbes and Infection*.10: 432-438.

- Delicato E.R., Brito B.G., Gaziri L.C.J., Vidotto M.C. 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*. 94: 97–103.
- Ewers C., Li G., Wilking H., Kiebling S., Alt K., Antão Esther-Maria, Laturnus C., Diehl I., Glodde S., Homeier T., Böhnke U., Steinrück H., Philipp H. & Wieler L.H. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*. 297: 163-176.
- Flammer K. & Drewes L.A. 1988. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. *Avian Diseases*. 32: 79-83.
- Foley S.L., Horne S.M., Giddings C.W., Gustad T.R., Handegard E.D., Robinson M. & Nolan L.K. 2003. Monoclonal Antibodies to avian *Escherichia coli* Iss. *Avian Diseases*. 47: 79-86.
- Friend M. & Frason J.C. 1999. Field manual of wildlife diseases, general field procedures and diseases of birds. USGS, Madison, 440p.
- Gast R.K. 2003. *Salmonella* infections, p.567-613. In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E. (Eds), *Diseases of Poultry*. 11 ed. Iowa State Press, Iowa.
- Gaukler S.M., Linz G.M., Sherwood J.S., Dyer N.W., Bleier W.J., Wannemuehler Y.M., Nolan L.K. & Logue C.M. 2009. *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Wild European Starlings at a Kansas Cattle Feedlot. *Avian Diseases*. 53: 544-551.
- Gerlach H. 1994. Bacteria, p. 949-983. In: Ritchie B.W., Harrison G. J. & Harrison L.R. (Eds) *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing, Lake Worth.
- Godoy S.N. 2007. Psittaciformes (arara, papagaio, periquito), p.222-251. In: Cubas, Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds). *Tratado de Animais Selvagens*. Roca, São Paulo.
- Gopee N.V., Adesiyun A.A. & Caesar K. 2000. Retrospective and longitudinal study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. *Journal of Wildlife Disease*. 36: 284-293
- Harrison G.J. & McDonald D. 1996. Nutritional considerations-section II: nutritional disorders, p.108-140. In: Harrison G.J. & Lightfoot T.L. *Clinical Avian Medicine*. Vol.1. Spix Publishing, Palm Beach.
- Hirsh D.C., MacLachlan N.J. & Walker R.L. 2004. *Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Massachusetts. 536p.

- Ikuno A.A., Gama N.M.S.Q, Guastalli E.A.L, Guimarães M.B. & Ferreira V.C.A. 2008. Características de isolados de *Escherichia coli* provenientes de aves silvestres quanto a genes de virulência e resistência a antibióticos. Anais 35° Conbravet, Gramado, RS. (Resumo)
- Johnson J.R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clinical Microbiology Reviews. 4: .80-128.
- Johnson T.J., Skyberg J. & Nolan L.K. 2004. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. Avian Diseases. 48: 351–360.
- Marietto-Gonçalves G.A., Almeida S.M., Lima E.T., Okamoto A.S., Pinczowski P. & Andreatti Filho R.L. 2010. Isolation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*). Avian Diseases. 54: 151-155.
- Menão M.C., Bottino J.A., Biasia I., Ferreira C.S.A., Calderaro F.F., Tavechio A.L., Fernandes S & Ferreira A.J.P. 2000. Infecção por *Salmonella* Typhimurium em Arara Azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). Arquivos Instituto Biológico. 67: 43-47.
- Nolan L.K., Horne S.M., Giddings C.W., Foley S.L., Johnson T.J., Lynne A.M & Skyberg J. 2003. Resistance to Serum Complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. Veterinary Research Communications.27: 101-110.
- Ozawa M., Harada K., Kojima A., Asai T. & Sameshima T. 2008. Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. Avian Diseases. 52: 392-397.
- Sigrist T. 2006. Aves do Brasil – Uma Visão Artística. Avis Brasilis, São Paulo, 672p.
- Silveira W.D., Fantinatti F. & Castro A.F.P. 1994. Transposon mutagenesis and membrane protein studies in an avian colisepticaemic *Escherichia coli* strain. Revista Brasileira de Genética. 17: 9-14.
- Trampel D.W., Wannemuehler Y. & Nolan L.K. 2007.Characterization of *Escherichia coli* isolates from peritonitis lesions in commercial laying hens. Avian Diseases. 51: 840-844.
- Vidotto M.C., Terra V.A., Lima G.S., Alfieri A.F., Goes C.R. & Cação J.M. 1994. Iron-regulated outer-membrane proteins of strains of avian septicemic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 27: 1291-1297.
- Yaguchi K., Ogitani T., Osawa R., Kawano M., Kokumai N., Kaneshige T., Noro T., Masubuchi K. & Shimizu Y. 2007. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia*

coli strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. Avian Diseases. 51: 656-662.

Quadro 1. Isolamento de *Escherichia coli* de suabes de Inglúvio e cloaca de psitacídeos

	Positivos	Negativos	Total de Amostras
Suabe de Cloaca	8	7	15
Suabe de Inglúvio	6	8	14
Total	14	15	29

Quadro 2. Resultados obtidos da análise para fatores de virulência (*iss* e *iutA*) em amostras de *E. coli* isoladas de psitacídeos

	Total de Isolados Analisados	Isolados Positivos para os Fatores de Virulência	
		<i>iss</i>	<i>iutA</i>
ISOLADOS DE NECROPSIA			
Intestino	7	6 (85,7%)	5 (71,4%)
Fígado	4	3 (75%)	3 (75%)
Proventrículo	1	1 (100%)	1 (100%)
Ventrículo	1	1 (100%)	1 (100%)
Cloaca	1	1 (100%)	1 (100%)
Fezes	1	1 (100%)	-
TOTAL NECROPSIA	15	14(93,3%)	11 (73,3%)
ISOLADOS POR SUABE			
Suabe de Cloaca	8	7 (85,5%)	5 (62,5%)
Suabe de Inglúvio	5	5 (100%)	4 (80%)
TOTAL SUABES	13	12 (92,3%)	9 (69,2%)
TOTAL GERAL	28		



Figura 1. Estado nutricional ruim (A) e estado nutricional ótimo (B) constatado na necropsia de *Amazona pretrei*.

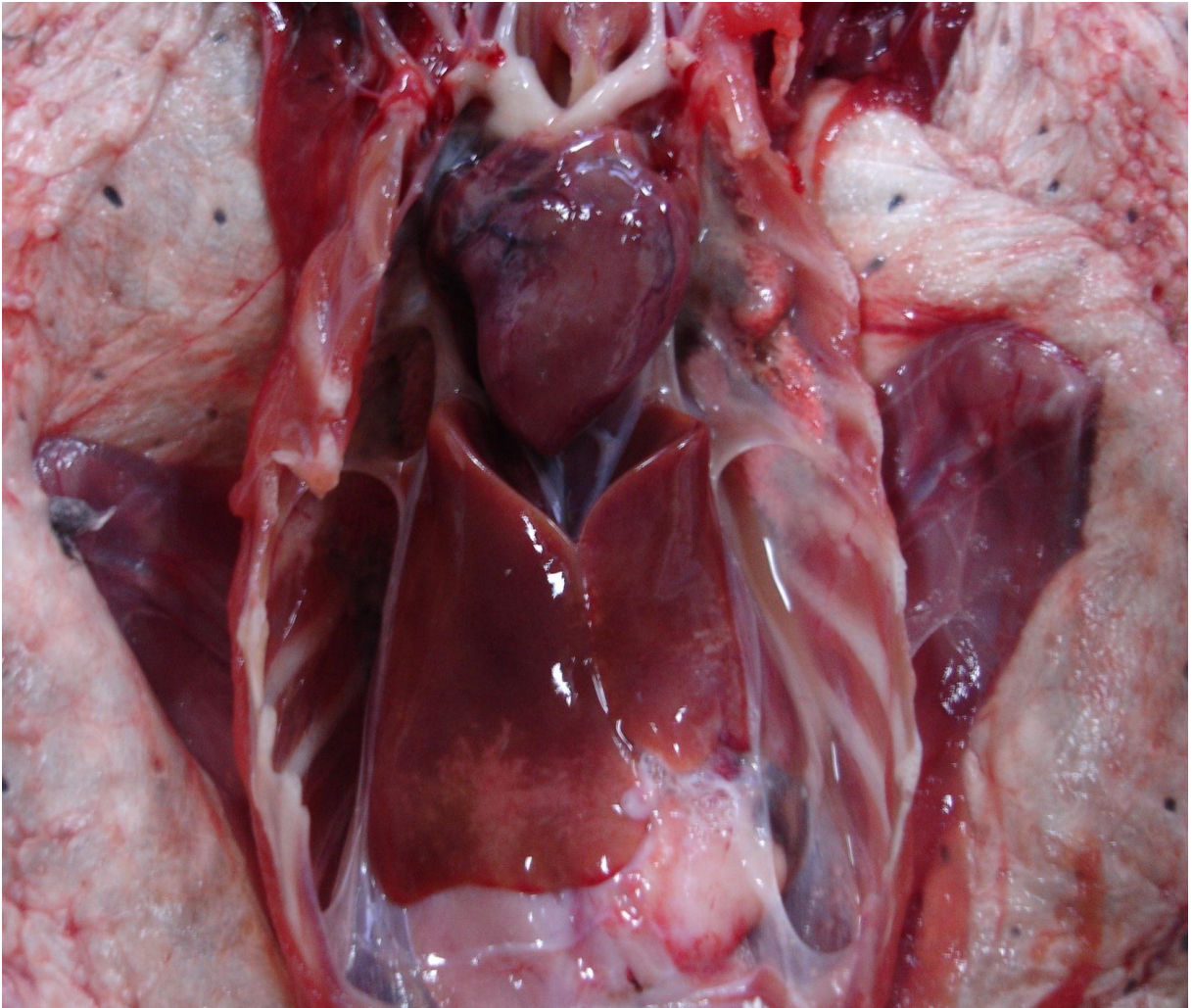


Figura 2. Lesões de aerossaculite, pericardite e perihepatite observadas em exame de necropsia de um papagaio-charão (*Amazona pretrei*).

5 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível comprovar a importância da bactéria *E. coli* em psitacídeos, pois foi detectado nos isolados avaliados os fatores de virulência *iss* e *iutA*, sendo estes os principais fatores de virulência relacionados com a patogenicidade de amostras APEC. Também foi isolada *Salmonella* spp. em psitacídeos de um dos criadouros avaliados, indicando que, apesar da baixa detecção, sempre deve ser preconizado a realização de testes microbiológicos específicos que visem a detecção deste micro-organismo potencialmente patogênico para aves e humanos.

Em virtude destes resultados podem-se traçar metas para elaboração de programas de manejo em criadouros de psitacídeos que visem minimizar e eliminar o risco de infecções decorrentes de *E. coli* patogênicas, através de monitoramento constante das aves e análise da virulência de isolados, auxiliando na preservação de espécies ameaçadas, como por exemplo, o papagaio-charão.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDILES-VILLEGAS, K. et al. Antibiotic resistance patterns in fecal bacteria isolated from Christmas Shearwater (*Puffinus nativitatis*) and Masked Booby (*Sula dactylatra*) at Remote Easter Island. **Avian Diseases**, v.55, p. 486–489, 2011.

ANDREATTI FILHO, R. L. Colibacilose Aviária. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca Cap.10, p. 112-117, 2007.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J-P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Org.) **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2003a. p. 631-656.

BARNES, H. J. Other bacterial diseases. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Org.) **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2003b. p. 797-862.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Threatened Birds of the World**. Barcelona e Cambridge: Lynx Edicions e BirdLife International, 2000.

CHMEL, H. *Serratia odorífera* Biogroup 1 causing an invasive human infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, p.1244-1245, 1988.

CHOUIKHA, I. et al. Differential expression of *iutA* and *ibeA* in the early stages of infection by extra-intestinal pathogenic *E. coli*. **Microbes and Infection**, v.10, p.432-438, 2008.

DELICATO, E.R. et al. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p.97–103, 2003.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 163-176, 2007.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIRI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Org.) **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2009. p. 457-471.

FUDGE, A. M. Diagnosis and treatment of avian bacterial diseases. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, p. 3-11, 2001.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Org.) **Diseases of Poultry**. 11 ed. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 567-613

GALETTI, M. et al. Padrões de riqueza, risco de extinção e conservação dos psitacídeos neotropicais. In: GALETTI, M.; PIZO, M. A. (Org.) **Ecologia e conservação de psitacídeos no Brasil**. Belo Horizonte: Melopsittacus Publicações Científicas, 2002. p. 17-26.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Org.) **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p. 949-983.

GODOY, S. N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. p.222-251.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. (Org.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p. 267-308.

HARCOURT-BROWN, N. H. Aves psitaciformes. In: TULLY Jr. T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. **Clínica de Aves**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 122- 149.

HARRISON, G. J ; McDONALD, D. Nutritional considerations: Section II Nutritional disorders. In: HARRISON, G. J; LIGHTFOOT, T. (Org.) **Clinical Avian Medicine**. Palm Beach: Spix Publishing, 2006. p. 108-140.

HASAN, B. et al. High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic escherichia coli from large- and small-scale poultry farms in Bangladesh. **Avian Diseases**, v. 55, p. 689-692, 2011.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.787.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia Médica**. 18 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 519p.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

KARUNAMOORTHY, G. et al. The life history of *Subulura brumpti* in the *Alphitibius diaperinus*. **Indian Veterinary Journal**, v.71, p.12-15, 1994.

LIGHTFOOT, T.; NACEWICZ, C. L. Comportamento de Psitacídeos. In: BAYS, T. B.; LIGHTFOOT, T.; MAYER, J. (Org.). **Comportamento de Animais Exóticos de Companhia: aves, répteis e mamíferos**. São Paulo: Roca, 2009. p. 43-87.

LLEONART, F. et al. **Higiene y patologia aviares**. Barcelona: Real Escuela de Avicultura, 1991. 421p.

LUMEIJ J. T. Nephrology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Org.) **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p. 538-555.

LYNNE, A. M.; FOLEY, S. L.; NOLAN, L. K. Immune response to recombinant *Escherichia coli iss* protein in poultry. **Avian Diseases**, v. 50, p. 273-276, 2006.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A. et al. Detecção de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em microbiota intestinal de Psittaciformes em fase de reabilitação para soltura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 185-189, 2010.

NAKAMURA, M.; FUKAZAWA, M.; YOSHIMURA, H.; KOEDA, T. Drug resistance and R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from imported pet birds. **Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 12, p. 1131-1138, 1980.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p. 534-546, 2000.

OLIVEIRA, S. J. **Guia bacteriológico prático: Microbiologia Veterinária**. Canoas: ULBRA, 1995. 142p.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

SANDMEIER, P.; COUTTEEL, P. Management of canaries, finches and Mynahs. In: HARRISON, G. J.; LIGHTFOOT, T. (Org.) **Clinical Avian Medicine**. Palm Beach: Spix Publishing, 2006. p. 879- 913.

SEGABINAZI, S. D. et al. Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 51-55, 2005.

SILVANOSE, C. D. et al. Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. **Avian Diseases**, v.45, p.447-451, 2001.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995. 159p.

SUSSMAN, M. **Escherichia coli – Mechanisms of virulence**. Cambridge: Cambridge University, 1997. 639p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

VIDOTTO, M. C. et al. Iron-regulated outer-membrane proteins of strains of avian septicemic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, p.1291-1297, 1994.

VIDOTTO, M. C.; NAVARRO, H. R.; GAZIRI, L. C. J. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 79-87, 1997.

YAGUCHI, K. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Japan. **Avian Diseases**, v.51, p.656-662, 2007.

ZWART, P. Enfermedades infecciosas y parasitarias. In: SAMOUR, J. (Org.) **Medicina Aviaria**. Barcelona: Elsevier, 2010. p. 346-358.

7 APÊNDICE A



Figura 1 - Papagaio-charão (*Amazona pretrei*).