

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE *Salmonella* sp. EM PSITACÍDEOS DE CATIVEIRO
ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Mariangela da Costa Allgayer

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO DE *Salmonella* sp. EM PSITACÍDEOS DE CATIVEIRO
ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

AUTORA: Mariangela da Costa Allgayer
Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de Sanidade
Avícola do Programa de Pós-graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de
Veterinária da UFRGS

Orientador: Prof. Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre
2003

*Ao meu marido Marcelo e minha filha Renata pelo
constante estímulo, amor e compreensão.*

*Aos meus pais, Nando e Nita pelo amor e
oportunidades oferecidas.*

À Rose pela amizade e cumplicidade.

À Mara pelos conselhos astrais.

Aos amigos

*Aos que nasceram familiares,
aos que se tornaram familiares
e aos que conheci ontem.
Aos que me enlouquecem,
aos que enlouqueço.
Aos que me criticam em tudo,
e aos que me aturam.
Aos amigos que correm,
aos amigos que contemplam.
Aos que me consideram muito,
e aos muitos que fazem pouco.
Aos que conhecem o que penso,
e aos que só conhecem o que faço.
Aos que passam o dia todo comigo,
e aos que estão todo tempo em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal pela orientação, disponibilidade, confiança e financiamento deste trabalho.

À MSc. Sílvia Dias de Oliveira e ao MSc. Carlos André da Veiga Lima Rosa pela amizade, disponibilidade, orientação e auxílio técnico-científico.

Ao médico veterinário Antônio Faccenda Ávila pelos ensinamentos, filosofia de vida e auxílio estatístico.

Aos médicos veterinários José Luis Maria, Rosecler Alves Pereira, Mariane Feser e aos biólogos Simone de Fátima Nunes e Felipe Pippi Salle pelo auxílio durante a realização das coletas.

À futura colega de profissão Carla Rodenbusch pelo apoio inicial ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica Aline Kellermann e André Streck pelo auxílio na realização dos experimentos.

Aos professores, colegas e funcionários do CDPA pelo companheirismo, incentivo e presteza durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 População alvo	27
3.2 Coleta	29
3.3 Enriquecimento da amostra	29
3.4 Extração do DNA	30
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	31
3.6 Técnica Microbiológica Convencional (TMC)	32
3.7 Seqüenciamento dos produtos da PCR	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Detecção de <i>Salmonella</i> sp. pela PCR	34
4.2 Identificação de <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Gallinarum</i> e <i>S. Pullorum</i> pela PCR	37
4.3 Detecção de <i>Salmonella</i> sp. pela TMC	37
4.4 Seqüenciamento dos produtos da PCR	38
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Número de exemplares de cada espécie de psitacídeos do plantel dos criadouros e zoológico do Rio Grande do Sul.....	27
TABELA 2 – Descrição dos iniciadores utilizados para a detecção genérica e específica de <i>Salmonella</i> através da PCR.....	31
TABELA 3 - Número de indivíduos analisados, número e percentual de amostras positivas na PCR para detecção de <i>Salmonella</i> sp. nas 280 amostras das diferentes espécies de psitacídeos.....	35
TABELA 4 – Número de amostras analisadas, número e percentual de amostras positivas na detecção de <i>Salmonella</i> sp. através da PCR nas diferentes espécies de psitacídeos de cada plantel dos criadouros e zoológico do Rio Grande do Sul.....	36
TABELA 5 - Resultado da PCR realizada nas duplicatas das amostras positivas para <i>Salmonella</i> sp. nas diferentes espécies de psitacídeos do plantel dos criadouros e zoológico do Rio Grande do Sul.....	37
TABELA 6 - Resultado da identificação bioquímica preliminar realizada em duas colônias morfológicamente compatíveis com <i>Salmonella</i> sp. isoladas através da TMC de duas amostras de suabes cloacais dos psitacídeos e de <i>S. Typhimurium</i> utilizada como controle positivo.....	38

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Fotografias de algumas espécies amostradas neste trabalho: *Ara ararauna* (Painel A), *Ara chloroptera* (Painel B), *Anodorhynchus leari* (Painel C), *Amazona aestiva* (Painel D), *Amazona amazonica* (Painel E) e *Amazona pretrei* (Painel F)..... **28**
- FIGURA 2 – Fotografias mostrando a captura da ave com puçá (Painel A) e contenção com auxílio de luvas (Painel B)..... **28**
- FIGURA 3 – Fotografias da coleta de suabe cloacal de um psitacídeo (Painel A) e do acondicionamento do suabe em água peptonada 1% (Painel B)..... **29**
- FIGURA 4 – Fotografia de gel de agarose 1,2%. Marcador de peso molecular de 100 pb (linha 1). Controle negativo (linha 2). Produtos de amplificação de DNA com os iniciadores 139 e 141 de *S. Typhimurium* (linha 3) e da amostra 104 (linha 4), amostra 115 (linha 5) e amostra 164 (linha 6)..... **34**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BGN: Brilliant Green with Novobiocin (verde brilhante com novobiocina)

BHI: Brain Heart Infusion

CDPA: Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária

CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

cm: centímetro

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: deoxinucleotídeo trifosfatado

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

fg: fentograma

g: grama

g: unidade de força centrífuga relativa

°C: grau Celsius

H₂S: ácido sulfídrico

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

kg: quilograma

L: litro

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

m: metro

M: molar

µg: micrograma

µL: microlitro

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

pb: pares de bases

PBS: salina fosfatada tamponada

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pmol: picomol

PNSA: Programa Nacional de Sanidade Avícola

RENCTAS: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres

s: segundo

SDS: dodecil sulfato de sódio

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris-borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

TMC: Técnica Microbiológica Convencional

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

U: unidade

RESUMO

O interesse da Medicina Veterinária nas espécies silvestres tem aumentado gradativamente, principalmente no estudo dos contextos ecológicos de saúde. Dentro desse contexto, autores realizaram estudos com o objetivo de conhecer a importância de *Salmonella* sp. na saúde das aves silvestres e seu potencial de transmissão para humanos e outros animais. Informações sobre a prevalência 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 transmissão dessa zoonose. Este trabalho teve como objetivo a detecção de *Salmonella* sp. em psitacídeos clinicamente saudáveis por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram coletados suabes cloacais de 280 psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado do Rio Grande do Sul, pertencentes a treze espécies, provenientes de um zoológico, um criadouro conservacionista e um criadouro comercial. O DNA das amostras foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e examinados pela PCR com a utilização de um par de iniciadores que amplifica um fragmento de 284 pb do gene *invA* pertencente ao gênero *Salmonella*, resultando em 37 amostras positivas. Não houve diferença na prevalência de salmonela entre os três plantéis nem entre as 13 espécies analisadas. Não foi possível a detecção desse patógeno pela PCR com iniciadores para a identificação de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, nem através da Técnica Microbiológica Convencional nas amostras detectadas pela PCR genérica, provavelmente devido a maior sensibilidade e especificidade da PCR genérica. De acordo com a revisão bibliográfica realizada, este foi o primeiro trabalho de detecção direta de *Salmonella* em psitacídeos utilizando a PCR. Os resultados indicaram que aproximadamente 13,2% dos psitacídeos mantidos em cativeiro eram portadores assintomáticos ou eram transientemente infectados pelo gênero *Salmonella*.

ABSTRACT

The interest of Veterinary Medicine on wild species has increased gradually, mainly on the field of the health ecologic contexts. In this context, some authors carried out studies in order to know the importance of the *Salmonella* genus on the health of wild birds and its transmission potential for humans and other animals. Information on the prevalence and distribution of the *Salmonella* serovars into the population of wild and domestic animals are essential for relating the possible reservoirs that can be responsible for the transmission of this zoonosis. The objective of this research was the detection of *Salmonella* sp. into clinically healthy psittacines by using the Polymerase Chain Reaction (PCR) assay. Cloacal swabs were collected from 280 captive psittacines in the State of Rio Grande do Sul, belonging to 13 species, coming from a zoo, a maintenance and commercial aviculture. The DNA of the samples was extracted by the phenol-chloroform method and tested by PCR using a pair of primers that amplify a fragment of 284 pb of the *invA* gene from the *Salmonella* genus, resulting in 37 positive samples. There was no difference in the prevalence of *Salmonella* among the 13 species analyzed. The identification of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* and *S. Gallinarum* was not possible by using PCR with specific primers for this serovars. The Standard Microbiological Technique (SMT) did not detect any generic PCR positive sample. Accordingly to bibliographic review, this was the first research of direct detection of *Salmonella* into psittacines using the PCR assay. The results showed that approximately 13.2% of the captive psittacines were asymptomatic carriers or were transiently infected by the *Salmonella* genus.

1 INTRODUÇÃO

A perda global da diversidade biológica afeta o bem estar de animais e pessoas. A destruição e fragmentação de habitats, a extinção de espécies, o tráfico ilegal, a importação e exportação de animais silvestres, a criação em cativeiro de espécies nativas e exóticas, a manutenção de aves silvestres como animais de companhia, entre outros impactos, conduziram à alteração de transmissão de doenças, à acumulação de contaminantes tóxicos e à invasão de espécies exóticas. Assim, novas doenças estão aparecendo e doenças que estavam controladas estão ressurgindo. A presença de doenças em indivíduos e populações pode ser um indicador da saúde do meio ambiente, incluindo seus impactos locais e globais e as mudanças no ecossistema. Frente a esta realidade, é de extrema importância que a Medicina Veterinária trabalhe para a proteção da biodiversidade, estudando as implicações das mudanças ambientais na saúde humana e animal.

Tradicionalmente, a Medicina Veterinária limitava-se à clínica e à produção de animais domésticos. Nas últimas décadas, aumentou gradativamente o interesse para as espécies não domésticas, principalmente no estudo dos contextos ecológicos de saúde. Dentro deste novo estudo, surge a Medicina da Conservação, que congrega a saúde humana e animal, com a saúde do ecossistema e as mudanças ocorridas no meio ambiente (MAGALHÃES, 2001).

Dentro desse contexto ecológico de saúde, vários autores realizaram estudos objetivando o conhecimento da importância das aves silvestres na transmissão da *Salmonella* sp. para o homem e seus animais domésticos. Segundo Quessy e Messier (1992), acredita-se que as aves silvestres não tenham um papel importante na epidemiologia da salmonelose humana. Wilson e MacDonald (1967) e Euden (1990) relataram que salmoneloses em aves silvestres são um risco potencial para o homem e seus animais domésticos, mas a baixa prevalência desta doença na população dessas aves sugere que elas não são reservatórios importantes deste patógeno. Entretanto, um grande número de aves silvestres vivendo num

mesmo local, podem representar um grande potencial de risco para a saúde humana e de outros animais, principalmente nas cidades, onde um grande número de aves de vida livre dividem o mesmo espaço (WILSON e MACDONALD, 1967). Komorowski e Hensley (1973) relataram que recintos abertos de aves em zoológicos são um foco em potencial de transmissão de salmoneloses para humanos. Craven et al. (2000) sugeriram que as aves de vida livre ao redor dos galpões podem transmitir salmonela para frangos de corte. Goodchild e Tucker (1968) afirmaram que, sob condições adequadas de biosegurança, a transmissão de salmonelas entre aves silvestres e domésticas é insignificante. Palmgren et al. (1997), após estudarem as aves migratórias que chegam à Suíça, afirmaram que as mesmas eram carreadoras de salmonelas. Kirkpatrick e Trexler-Myren (1986) relataram que a prevalência de infecção por *Salmonella* em falconiformes de vida livre é de 1,9%. Quessy e Messier (1992) citaram uma prevalência de 8,7% em *Larus delawarensis* (gaiivotas). Wilson e MacDonald (1967), Brittingham et al. (1988), Mikaelian et al. (1997) e Hudson et al. (2000) revelaram prevalência de 0,6%, 0%, 0,9% e 6,8% em aves de vida livre, respectivamente. Panigrahy et al. (1979) e Dorrestein et al. (1985) citaram prevalências de 7,8% e 1,7%, respectivamente, nos psitacídeos encaminhados para necropsia. Grimes e Arizmende (1992), após avaliação sorológica de 2407 psitacídeos obtiveram 1,6% soropositivos para *S. Typhimurium*. Karesch et al. (1997) encontraram 32% das araras de vida livre soropositivas para *S. Pullorum* no Peru. Allgayer et al. (2002) avaliaram o soro de 60 psitacídeos mantidos em cativeiro para *S. Pullorum* no Brasil, sendo todas as aves negativas.

Kapperud et al. (1998) encontraram evidências de transmissão de *S. Typhimurium* de aves silvestres para humanos na Noruega. MacDonald e Brown (1974) e MacDonald e Bell (1980) sugeriram que as aves de vida livre eram fontes potencialmente importantes nos surtos de salmonelose nos animais das fazendas na Inglaterra. Madewell e McChesney (1975) relataram o isolamento de *S. Typhimurium* de uma criança, um gato e duas calopsitas numa mesma residência nos Estados Unidos. MacDonald e Bell (1980) e Tauni e Österlund (2000) relataram surtos de salmonelose humana e felina com sorovar *S. Typhimurium* no sul da Inglaterra e Suíça, associadas com infecções de aves de vida livre. Gerlach (1994) relatou que humanos portadores de salmonela podem infectar suas aves de companhia, sendo estas interações entre homens e aves responsabilizadas pela ocorrência de salmoneloses em muitas espécies de psitacídeos.

Como nas últimas décadas a salmonela tem sido reconhecida como um dos principais patógenos para as aves domésticas e um problema de saúde pública, este trabalho teve como

objetivo detectar *Salmonella* sp. em psitacídeos mantidos em cativeiro, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os psitacídeos são aves com ampla distribuição geográfica, são encontrados em áreas tropicais e, até, em regiões frias. Constituem 78 gêneros e 332 espécies, sendo 148 pertencentes ao Novo Mundo, cerca de 100 ocorrendo na América do Sul e 80 espécies no Brasil, que é considerado o país mais rico em representantes da família *Psittacidae*, tendo sido denominado nos primeiros mapas como “Terra dos Papagaios” (*Brasilia sive terra papagallorum*). No Brasil, são encontrados os maiores representantes dos psitacídeos, as araras. Dentre as espécies nativas podemos citar as araras azuis *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Anodorhynchus leari* e *Anodorhynchus glaucus* (extinta no início do século passado); as araras vermelhas *Ara macao* e *Ara chloroptera* e a arara azul-amarelo *Ara ararauna* (COLLAR, 1997; SICK, 1997).

Segundo Forshaw (1977) e Russel (1987), a ordem dos Psittaciformes está dividida em três grandes famílias: a Loridae, representada pelos lóris; a Cacatuidae, representada pelas cacatuas; e a Psittacidae composta pelos papagaios, araras, periquitos, jandaias e maracanãs. Collar (1997) e Sick (1997) relataram que esta ordem, embora apresente uma grande variação de tamanho, coloração e peso, possuiu características muito marcantes que facilitam seu reconhecimento imediato, como bico curto, alto, recurvado de base larga, arredondado, maxila bem móvel articulada ao crânio, com movimentos de extensão que aumentam a potência do bico, usado para partir sementes duras. Possuem língua grossa, sensível e riquíssima em papilas gustativas. Segundo Sick (1997), impressiona o peso da cabeça de uma arara, devido ao tamanho colossal do bico que, por exemplo, numa ave de 940 gramas atinge 180 gramas (19% do peso total da mesma).

Estas aves têm papo grande usado para armazenar durante horas a ceva que será dada aos filhotes. Os psitacídeos possuem duas fôveas na retina para focalizar, tornando sua visão mais apurada. Possuem patas hábeis e escamosas, tarso muito curto, com o quarto dedo (dedo externo) deslocado para trás, junto ao primeiro. A grande habilidade dos dedos é controlada

por uma musculatura peculiar. Possuem asas compridas e fortes, plumagem curta e dura. Glândula uropigeanas tendendo a atrofiar-se e, até desaparecer por completo nos psitacídeos neotropicais, não existindo nos gêneros *Amazona*, *Pionus* e *Brotogeris*. Nos representantes brasileiros, a pigmentação predominante é o verde, havendo freqüentes sinais vermelhos nas rêmiges (penas dorsais das asas), na borda das asas ou nas coberteiras (penas superiores que cobrem as demais com início na região escapular descendo pelo dorso da asa). A coloração verde chama muita atenção em cativeiro, mas serve de camuflagem no meio das folhagens onde muitas espécies vivem e se alimentam. A região perioftálmica é nua e de extensão variada. Um círculo estreito em volta da região é freqüentemente destacado por colorido vivo, que pode ser realçado ainda mais por um segundo círculo, de plumas vivamente coloridas (SICK, 1997; COLLAR, 1997).

Os psitacídeos são “adorados” pelo seu companheirismo, temperamento, coloração e em particular, pela sua habilidade de imitar a voz humana, e são odiados pelos impactos que causam sobre a agricultura. Entre estes dois extremos, eles são apanhados na natureza para suprir a demanda de aves de estimação, simplesmente como uma mercadoria, ou ainda exterminados como pragas nas regiões agrícolas que avançam sobre seus habitats naturais (COLLAR, 1997).

O tráfico de animais silvestres é o terceiro maior comércio ilegal do mundo, movimentando cerca de US\$ 10 milhões de dólares anuais, sendo o Brasil responsável por aproximadamente 10% desse mercado. Por se tratar de uma atividade ilegal e por não existir uma agência centralizadora das ações contra o tráfico no País, os dados reais sobre esse comércio ilegal são difíceis de serem calculados. Estimativas relatam que o tráfico de animais silvestres seja responsável pela retirada anual de 38 milhões de espécimes da natureza. Os psitacídeos são os animais que mais sofrem com o tráfico internacional, pois sua grande diversidade de cores e capacidade de imitar sons, desperta o interesse de pessoas em todo o mundo (RENCTAS, 2003). A Convenção Internacional sobre o Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora - CITES) reportou o tráfico internacional de psitacídeos entre 1982 e 1988 com uma média de 539.701 aves por ano. O Censo Mundial de Psitacídeos Ameaçados de Extinção, realizado em 1994, relatou que 86 das 332 espécies (26%) de psitacídeos estão ameaçadas de extinção, devido à contínua destruição de habitats e à calamitosa apanha de exemplares da natureza para o tráfico de animais silvestres (BIRDLIFE, 2000).

A CITES foi criada em 3 de março de 1973 em Washington - EUA e entrou em vigor em 1 de julho de 1975 com o objetivo de regularizar o comércio internacional e prevenir o declínio de espécies ameaçadas ou potencialmente ameaçadas de extinção. Atualmente, a Convenção protege mais de 27.000 espécies de animais e plantas, todas elas são espécies raras, ameaçadas de extinção ou cujos níveis de comércio internacional podem comprometer a sua sobrevivência. As espécies contempladas na CITES encontram-se inscritas em três apêndices. No apêndice I, estão as espécies proibidas para comercialização internacional, exceto se o objetivo forem fins científicos; no apêndice II, estão as espécies cujo comércio internacional é permitido, mas controlado (através de quotas anuais) para manter os níveis de sobrevivência das espécies; o apêndice III, contempla as espécies protegidas pelo menos por um país contratante, que solicitou aos demais contratantes a sua colaboração para controlar o comércio internacional. Desde 1981, todos os psitacídeos, com exceção dos periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*), calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) e periquitos de colar (*Psittacula krameri*) estão listados no apêndice II. A razão principal da aplicação desta medida deve-se ao fato de que muitos psitacídeos em extinção assemelham-se com outras espécies não ameaçadas e poderiam facilmente escapar da correta identificação nas fronteiras nacionais (MULLIKEN e THOMSEN, 1995).

O número de animais silvestres mantidos ilegalmente no Brasil como animais de estimação é muito grande e difícil de ser mensurado. O hábito de manter animais silvestres como mascotes vem desde o tempo da colonização do Brasil. Quando os portugueses aqui aportaram, incorporaram a prática dos índios de manter macacos e aves tropicais como seus animais de estimação, além de utilizarem o colorido das penas das aves brasileiras para adorno de chapéus e outras peças do vestuário. Durante os trinta primeiros anos após o descobrimento do Brasil, as naus portuguesas que deixavam o país, costumavam levar em seus porões aproximadamente três mil peles de onças (*Panthera onca*) e 600 papagaios (*Amazona* sp.). Ao serem desembarcadas na Europa, essas “mercadorias” estariam logo enfeitando vestidos e palácios do Velho Mundo. Usar chapéus ornados com penas coloridas de aves tropicais era considerado de muito bom gosto, e quase sempre era um luxo reservado apenas às classes mais abastadas (RENCTAS, 2003).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através das portarias 117 e 118 de 15 de outubro de 1997, que normatizam a criação de espécies silvestres nativas e comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna nativa, propiciou que, nos últimos anos, houvesse um incremento na criação e comercialização legal desses animais. Atualmente, é possível que lojas de animais,

cadastradas no IBAMA, comercializem psitacídeos reproduzidos em criadouros devidamente registrados neste Instituto. Estas portarias visam colaborar com a preservação de nossa fauna e combater o comércio clandestino de animais silvestres, pois acredita-se que o comércio ilegal deverá reduzir-se progressivamente à medida que exista a possibilidade de aquisição de animais de maneira lícita e confiável, com documentação correta, saúde e origem controlada e adaptados ao cativeiro.

Os psitacídeos são acometidos por várias patologias, porém poucos são os estudos nas aves brasileiras em cativeiro. As causas de morbidade e mortalidade dessas aves, freqüentemente, ficam sem um diagnóstico preciso devido à falta de conhecimento específico e da realização de exames complementares. As infecções que exigem tratamento são comumente encontradas especialmente em aves estressadas, com deficiência nutricional ou alojadas em condições de pouca higiene (GODOY, 2001).

A flora normal na maioria das espécies de psitacídeos de estimação consiste de bactérias Gram positivas incluindo *Lactobacillus*, *Streptococcus* não-hemolítico, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Streptomyces*. As bactérias Gram negativas são geralmente patógenos primários ou potencialmente oportunistas, sendo comumente encontrados *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pausturella*, *Campylobacter* e *Chlamydophila psittaci* (OGLESBEE e BISHOP, 1998).

Muitas são as doenças bacterianas que acometem os psitacídeos, determinando principalmente alterações gastrintestinais e respiratórias. Os principais agentes envolvidos nas doenças gastrintestinais são as enterobactérias, particularmente *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Yersinia* sp., que podem também afetar outras espécies de aves e mamíferos (DORRESTEIN et al., 1985; KEYMER, 2000; ZWART, 2000).

As salmoneloses são enfermidades provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*; são de grande importância mundial tanto na produção de carnes quanto em saúde pública, podendo apresentar-se clinicamente sob diferentes síndromes (ASHTON, 1990). A *Salmonella* é considerada um patógeno primário com muitos sorotipos aptos a ultrapassar a barreira imunológica das mucosas (REAVILL, 1996). Os membros deste gênero podem infectar uma grande variedade de mamíferos, aves e répteis (SCHIMIDT, 1993; REAVILL, 1996). Segundo Hofer et al. (1997), a salmonelose é uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública em todo o mundo, em razão da elevada endemicidade, alta morbidade e acima de tudo, pela dificuldade no controle.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e, com base em distintas características bioquímicas e capacidade do fago O1 em lisá-las, foi dividido em duas

espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* está dividida em seis subespécies: *S. enterica enterica*, *S. enterica salamae*, *S. enterica arizonae*, *S. enterica diarizonae*, *S. enterica houtenae* e *S. enterica indica*, subdivididas em 2.501 sorovares caracterizados por reações bioquímicas e sorológicas (POPOFF et al., 2001). Segundo os mesmos autores, os nomes das espécies e subespécies não precisam ser indicados, utilizando-se apenas o gênero e o sorovar, por exemplo, ao referir-se à *Salmonella enterica enterica* Enteritidis, usa-se apenas *Salmonella* Enteritidis.

Segundo Doyle e Cliver (1990), estes microrganismos apresentam-se sob a forma de bastonetes Gram negativos, não-esporogênicos, usualmente não-encapsulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, normalmente móveis, exceto os sorovares Pullorum e Gallinarum que não apresentam motilidade. Gálan et al. (1992) relataram que as salmonelas são parasitas intracelulares facultativos, podendo ser envolvidas por macrófagos, não serem destruídas e ainda multiplicarem-se, o que de certa forma explicaria a resistência do microrganismo à fagocitose, refletindo uma tendência de cronificação das doenças provocadas por estas bactérias por meses ou até anos.

Um dos primeiros passos do ciclo patogênico da *Salmonella* é a invasão de células intestinais, sendo uma característica comum à diferentes sorovares (GÁLAN et al., 1992). A aderência bacteriana e conseqüente penetração na mucosa intestinal, geralmente, são pré-requisitos para infecção, tanto que cepas desprovidas desta característica são consideradas avirulentas (CRICHTON et al., 1991 apud PONTES, 1999).

As salmonelas causadoras de diarreia invadem os tecidos epiteliais e sub-epiteliais do intestino delgado e grosso, multiplicam-se na lâmina própria destes e induzem a secreção de fluidos (KEUSH e THEA, 1994 apud PONTES, 1999). Doyle e Cliver (1990) citaram o trato intestinal de humanos e outros animais como ambiente natural para as salmonelas, sendo os alimentos de origem animal e a água associados à transmissão do organismo. Segundo Varnan e Evans (1991) o grau de adaptabilidade ao hospedeiro pode afetar a intensidade da patogenicidade, sendo que menos de 1% dos sorovares das salmonelas são específicos para uma determinada espécie animal.

Barrow e Duchet-Suchaux (1997) relataram que sorovares altamente adaptados como *S. Abortovis* (ovinos), *S. Choleraesuis* (suínos), *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (galinhas), *S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Sendai* (humanos) geralmente não produzem sinais clínicos graves em outras espécies. No entanto, sorovares como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* afetam tanto animais quanto humanos, com graus variados de patogenicidade gastrintestinal.

A salmonelose aviária é um termo que designa um grupo de doenças de caráter agudo ou crônico, produzida por uma ou mais bactérias do gênero *Salmonella*. Sob o aspecto clínico, as salmoneloses podem ser divididas em três formas de apresentação: pulorose, causada pela *S. Pullorum*; o tifo aviário, causada pela *S. Gallinarum*; e as infecções paratíficas provocadas por um grupo de diversos sorovares de *Salmonella* (espécies móveis não adaptadas às galinhas), sendo estas também relacionadas com infecções de origem alimentar em humanos (SNOEYENBOS e WILLIANS, 1991).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu, através da Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) com o objetivo de garantir a qualidade dos produtos de origem avícola, sanitariamente controlados, disponíveis nos mercados externo e interno. Este programa prevê normas de controle e/ou erradicação das principais doenças aviárias de transmissão vertical (salmoneloses e micoplasmoses aviárias) e horizontal como a doença de Newcastle (VILLA, 1998). Estas normas de controle e/ou erradicação estendem-se também aos estabelecimentos de exploração de aves silvestres e os seus incubatórios. Esta Portaria define as medidas de monitorização das salmoneloses em estabelecimentos avícolas de controle permanente e eventual, que procedam ao comércio nacional e internacional de seus produtos, destinados à reprodução e produção de aves e ovos férteis. Para tanto, o núcleo ou estabelecimento avícola deverá estar certificado como livre de *Salmonella Gallinarum* e de *S. Pullorum* e livre ou controlado para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (BRASIL, 2002).

A pulorose e o tifo aviário são doenças septicêmicas que afetam primariamente galinhas e perus. Codornas, patos e faisões, entre outras aves, também são suscetíveis (SNOEYENBOS e WILLIANS, 1991). Ocasionalmente, ocorreram infecções por *S. Pullorum* em humanos devido à ingestão de alimentos contaminados com alto número de células ou devido a desafio experimental (McCULLOUGH e EISELE, 1951; MITCHELL et al., 1946). Segundo Wilson e MacDonald (1967), foram isoladas *S. Gallinarum* de várias espécies de aves silvestres na Inglaterra, em áreas onde ocorreram surtos de tifo aviário em galinhas. Estes autores também relataram o isolamento de *S. Pullorum* em aves silvestres que estavam em contato com criações de frango que apresentavam pulorose. Okoh e Onazi (1980) relataram que, embora *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* sejam reconhecidamente importantes na determinação de doenças em aves domésticas, os índices de isolamento de aves silvestres são muito baixos, sendo que, quando ocorre isolamento destes sorovares, os mesmos estão associados a surtos em criações de aves domésticas.

Salmonelas paratíficas podem infectar uma grande variedade de hospedeiros, inclusive o homem, em alguns casos resultando em reservatórios assintomáticos e em outros produzindo sinais clínicos. 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 incidência 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 transmissão dessa zoonose (GAST, 1997). Vários sorovares de salmonelas paratíficas são responsáveis por infecções em aves silvestres. Aves jovens são, usualmente, as mais afetadas, ocorrendo alta taxa de mortalidade. Aves clinicamente normais podem ser portadoras, bem como aves infectadas que sobreviveram a um surto. Por isso, aves destinadas para programas de reintrodução devem ser testadas para a presença de salmonelas. Fontes potenciais de infecção para aves silvestres incluem depósitos de lixo, resíduos provenientes da avicultura e efluentes de esgotos não tratados (CUBAS, 1993).

Muitos vertebrados podem ser infectados com *Salmonella* sp. Entretanto, a suscetibilidade do hospedeiro e o desenvolvimento do estado de portador varia amplamente entre as espécies. Aves de vida livre podem ser portadoras subclínicas e servirem de reservatório para aviários. A prevalência das várias espécies de salmonela parecem variar de acordo com localização geográfica e o tipo de alimento consumido, particularmente com relação ao componente protéico da dieta. Aves e outros animais importados podem servir de reservatórios para espécies de salmonelas exóticas podendo causar surtos devastadores de salmoneloses (GERLACH, 1994; DORRESTEIN, 1997). As aves domésticas são os maiores reservatórios de *Salmonella* (SNOEYENBOS e WILLIAMS, 1991), sendo a *Salmonella* Typhimurium, o sorovar mais isolado em aves de estimação (DORRESTEIN, 1997) e aves de vida livre (REAVILL, 1996).

Uma ave ou um grupo de aves podem infectar-se com *Salmonella* sp. através da ingestão de alimentos e/ou água contaminados, contato com portadores (não necessariamente da mesma espécie), ou por transmissão vertical (DORRESTEIN, 1997). Phillips e Hatkin (1978) e Oros et al. (1998) relataram dois casos de salmonelose ocorridos em psitacídeos cuja possível origem foram répteis. A ingestão oral constitui a via de infecção mais comum da salmonela mas, também ocorre transmissão aerógena a partir da poeira contaminada originária da excreta e das penas (RUPLEY, 1999). O curso da doença nas aves depende do número de microrganismos presentes, sorotipo, idade, espécie e condições do hospedeiro (MOHAN, 1983).

Infecções agudas são caracterizadas por sinais clínicos inespecíficos incluindo letargia, anorexia, polidipsia e diarreia (PANIGRAHY e GILMORE, 1983; AMAND, 1986; GERLACH, 1994; MIKAELIAN, et al., 1997), poliúria, alterações respiratórias, oculares e nervosas (ZWART, 2000), emaciação, formação de abscessos, desidratação, paralisia do inglúvio e morte súbita (SPENCER, 1991; REAVILL, 1996; DORRESTEIN, 1997). Em casos crônicos, podem ser observadas alterações nervosas, artrite, dispnéia. Dermatite granulomatosa tem sido descrita em várias espécies e a infecção pode estar associada a picadas de insetos (GERLACH, 1994; DORRESTEIN, 1997). A doença crônica com dermatite granulomatosa, artrite e tenossinovite é típica no caso de infecções em papagaios (OGLESBEE e BISHOP, 1998). Os psitacídeos são altamente sensíveis às infecções por *Salmonella* sp. ocorrendo alta mortalidade (REAVILL, 1996).

Dentre os sorovares isolados de aves silvestres no Jardim Zoológico de Kano na Nigéria, foram encontrados *S. Typhimurium* no fígado de três pombos; *S. Gallinarum* dos fígados de um pavão e um abutre, *S. GIVE* do intestino delgado de um papagaio cinza, *S. Apeyeme* do conteúdo intestinal de um flamingo e *S. Tilene* do intestino delgado de um pelicano (OKOH e ONAZI, 1980). Panigrahy e Gilmore (1983) isolaram *S. Typhimurium* do fígado, rins e pulmões de um papagaio cinza (*Psittacus erithacus*) e *S. Heidelberg* do exudato caseoso dos nódulos cutâneos de um canário (*Serinus canarius*). Komorowski et al. (1973) relataram um surto de salmonelose causada por *S. Typhimurium* num zoológico americano. Entre novembro de 1977 e novembro de 1978, Panigrahy et al. (1979) isolaram 16 *S. Typhimurium* e uma *S. enterica arizonae* do fígado, coração e intestino de psitacídeos encaminhados para diagnóstico. Orosz et al. (1992) isolaram *S. Enteritidis* de *Amazona finschi* e *Pyrrhura molinae* domiciliados na mesma casa. Phillips e Hatkin (1978) relataram o isolamento *S. enterica houtenae* do fígado e dos sacos aéreos de uma calopsita. Oros et al. (1998) isolaram *S. enterica arizonae* do fígado de uma *Cacatua galerita galerita*. Em um estudo realizado nos Estados Unidos com cerca de 300 aves de estimação, foram isoladas *S. Typhimurium* de 18 psitacídeos de diferentes espécies e *S. Stanleyville* em uma ave (MOHAN, 1983). No sudeste dos Estados Unidos, Howerth (1985) e Davidson et al. (1985) relataram o isolamento de *S. Typhimurium* em perus selvagens (*Meleagris gallopavo*). Selbitz (1986) apud Lemos et al. (1999) relatou o isolamento de *S. Typhimurium* em 92 aves de espécies diferentes provenientes de diversos zoológicos da Alemanha. Flugger (1991) apud Lemos et al. (1999) analisou aves oriundas do Jardim Zoológico de Hannover na Alemanha, e encontrou 12 aves positivas para *Salmonella*, sendo isoladas *S. Typhimurium* e *S. Copenhagen*. Segundo Cubas (1993), *S. Typhimurium* tem sido isolada de pingüins da

Antártica e da Patagônia e de psitacídeos originários da América do Sul. Kulka et al. (1994) apud Lemos et al. (1999) relataram o isolamento de *S. Enteritidis* em três aves no Jardim Zoológico de Erfurt na Alemanha. Na Suíça, foram isoladas *S. Typhimurium* de aves migratórias (PALMGREN et al., 1997). Investigações sobre a distribuição de salmonela em aves de vida livre revelaram que os sorovares predominantes na Índia foram Typhimurium, Thompson, Heidelberg, Bareilly e Oranienburg (SAMBYAL e SHARMA, 1972) e em Israel, Typhimurium, Blockley, Sofia, Newport e Emek (GERICHTER e SECHTER, 1970).

No Brasil, Xavier e Wilwerth (1968) apud Lemos et al. (1999) relataram a presença de *S. Typhimurium* em papagaio chauá (*Amazona rhodocorytha*) no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro. Freitas et al. (1977) isolaram neste mesmo zoológico, *S. Typhimurium* de uma garça-branca-grande (*Egretta alba*) e da água do lago existente dentro do zoológico durante o surto entre essas aves, que resultou no óbito de 9 garças. Um surto de salmonelose em aves marinhas, na Baía do Paranaguá, no Paraná, causou a morte de aproximadamente 500 aves de diferentes espécies. O sorovar isolado foi Enteritidis e a provável causa da contaminação foram efluentes de esgoto (GARCIA e SCHÖNHOFEN, 1982). Vilela et al. (2001) relataram a presença do sorovar Bredney em um filhote de arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre, proveniente do pantanal do Mato Grosso do Sul. Kanashiro et al. (2002) isolaram *Salmonella* sp. de *Agapornis roseicollis*, *Chloebia gouldiae* (diamante gold) *Stagonoplura guttata* (bivate) de um criadouro comercial no Estado de São Paulo.

Os procedimentos para detecção das salmonelas, nos trabalhos referenciados nesta revisão foram realizados através de técnicas microbiológicas convencionais e sorologia. Segundo Gardner et al. (1996), a realização de testes de diagnóstico sorológico usados para animais de produção, em animais silvestres, apresentam problemas, já que a maioria dos testes existentes não têm sido adequadamente validados para animais silvestres. Desta forma, presumir que um teste sorológico terá performance idêntica em animais de produção e silvestres pode não estar correto devido às diferenças de patogenicidade das cepas e sorovares, à resposta sorológica do hospedeiro e à exposição a organismos de estrutura antigênica similar com produção de anticorpos por reação cruzada. Blackburn (1993) afirmou que a técnica microbiológica é capaz de detectar uma célula, somente de forma teórica, já que o limite real depende da qualidade dos procedimentos adotados, dos meios de cultura utilizados, dos equipamentos disponíveis e do conhecimento do pessoal responsável, que são fatores bastante variáveis entre diferentes laboratórios. Segundo Oliveira et al. (2002), a técnica microbiológica convencional necessita de um grande número de células viáveis, para isolamento de salmonelas.

Vários autores (PHILLIPS, 1986; BRITTINGHAM et al., 1988; HOPKINS et al., 1990; McFARLANE, 1996) relataram dificuldade no isolamento de salmonela em aves aparentemente saudáveis devido ao pequeno número dessa bactéria na microbiota normal. Stone et al. (1994) relataram que o diagnóstico de infecções por *Salmonella* sp., baseado primariamente no método tradicional de cultivo e de identificação, não detecta este microrganismo em certas amostras clínicas com poucas células.

Dentre as limitações da técnica microbiológica está o tempo requerido para cultivo e para as caracterizações bioquímicas e antigênicas que podem levar cinco dias ou mais dependendo dos meios de cultura utilizados, habilidade dos técnicos do laboratório (WARD et al., 1990) e a pressão de seleção devido ao crescimento em meio artificial, que nem todos os microrganismos são capazes de ultrapassar (LIESACK e STACKEBRANDT, 1992).

Muitos fatores podem interferir no isolamento de salmonelas oriundas de amostras clínicas, como a competição com outros microrganismos, administração de antimicrobianos que podem retardar o seu crescimento e a sua eliminação de maneira intermitente em baixo número, particularmente no caso de portadores (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 1988 apud STONE et al., 1994).

A expectativa de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* é a substituição do processo biológico de multiplicação pela amplificação enzimática de seqüências específicas de ácidos nucleicos. A técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) possui uma significativa vantagem sobre o cultivo *in vitro*. As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos não são limitadas pela capacidade do organismo crescer em cultura, e a caracterização do *amplicon* pode prover importantes informações epidemiológicas e evolutivas (OLIVEIRA, 2000). Segundo Rahn et al. (1992), Cohen et al. (1993) e Ikuta (2000), a utilização de técnicas de biologia molecular, como a PCR, diminuiu o tempo necessário para a detecção e identificação de salmonela de vários dias para poucas horas. Técnicas como a PCR têm permitido grande evolução nas análises de rotina de laboratórios clínicos e industriais, pois organismos não adaptados ao cultivo tornaram-se passíveis de serem analisados. Novos patógenos estão sendo descobertos e os mecanismos de associação com doenças elucidados (IKUTA, 2000).

Segundo Bennet et al. (1998), existe dificuldade de detectar salmonelas consideradas atípicas, pois produzem colônias que não apresentam característica de *Salmonella* sp. e podem ser descartadas pela técnica microbiológica. Acredita-se que tais isolados atípicos não ocorram freqüentemente, porém isto pode denotar a incapacidade em detectá-los. Além de características morfológicas incomuns, as salmonelas podem apresentar variações quanto à

utilização de substratos bioquímicos podendo induzir a resultados falso-negativos. Hoorfar et al. (1999) relataram que a PCR independe de variações fenotípicas, não é vulnerável a tais reações atípicas evitando os resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica.

Segundo Gálan et al. (1992), o *invA* é um gene de *Salmonella* sp. que codifica uma proteína de invasão celular, sendo altamente conservado dentro do gênero *Salmonella*. Conforme as pesquisas de Rahn et al. (1992) e Oliveira et al. (2002), a PCR é uma técnica efetiva, rápida e sensível para detecção do gene *invA* de *Salmonella* sp. Tuchili et al. (1995), utilizando órgãos de pintos experimentalmente infectados com *Salmonella* sp., relatou que a PCR foi mais sensível do que o isolamento bacteriano em amostras oriundas de infecções na fase inicial, intermediária e tardia. Seus dados indicaram que a PCR foi muito mais eficaz para detectar infecções latentes. Hudson et al. (2000) examinaram o potencial de virulência das salmonelas isoladas de aves silvestres e relataram a presença do gene de invasão *invA* em todas as amostras.

Um dos fatores limitantes para a detecção de microrganismos através da PCR em amostras de alimentos, clínicas e ambientais é a presença de substâncias que inibem ou reduzem a eficiência da amplificação. A presença de sais biliares nas fezes, o grupo heme no sangue, substâncias húmicas no solo, proteinases no leite e uréia na urina, têm sido descritas como substâncias que inibem a PCR. Diferentes técnicas estão sendo empregadas para reduzir os efeitos inibidores da PCR e/ou para separar os microrganismos dos inibidores da PCR (AL-SOUD E RADSTÖM, 1998). Santos et al. (1999) relataram que a extração do DNA de *Salmonella* sp. pelo método fenol-clorofórmio não inibe a PCR e apresenta resultados satisfatórios na análise de amostras com vários interferentes.

Segundo Oliveira et al. (2002), a PCR associada ao caldo Rappaport Vassiliadis para detecção genérica de salmonela em amostras de campo detectou 128% mais amostras positivas que a técnica microbiológica convencional, além de proporcionar resultados em até 48 horas enquanto a técnica convencional pode levar até 5 dias. Este autor ainda afirma que a PCR para detecção genérica de salmonela é 100% específica e muito sensível.

No presente trabalho, utilizou-se a PCR estabelecida por Oliveira et al. (2002) para a detecção de *Salmonella* sp. em psitacídeos de cativeiro. Desta forma, utilizou-se uma técnica sensível e específica para determinar a prevalência de *Salmonella* em aves silvestres.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População alvo

Para a realização deste trabalho, foram utilizados psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado do Rio Grande do Sul, pertencentes a treze espécies, provenientes de um zoológico, um criadouro conservacionista e um criadouro comercial (TABELA 1) registrados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

TABELA 1 - Número de exemplares de cada espécie de psitacídeos do plantel dos criadouros e zoológico do Rio Grande do Sul.

Espécie	Zoológico	Criadouro conservacionista	Criadouro comercial	Total
<i>Anodorhynchus leari</i>	04			04
<i>Ara ararauna</i>		04	52	56
<i>Ara macao</i>		02	01	03
<i>Ara chloroptera</i>		03	05	08
<i>Amazona aestiva</i>	18	08	137	163
<i>Amazona amazonica</i>		02	23	25
<i>Amazona pretrei</i>	04		06	10
<i>Amazona vinacea</i>			01	01
<i>Amazona farinosa</i>		04		04
<i>Myiopsitta monachus</i>	01			01
<i>Pyrrhura frontalis</i>	01			01
<i>Pionus maximiliani</i>	03			03
<i>Pionus menstruus</i>		01		01

TOTAL	31	24	225	280
-------	----	----	-----	-----

Foram coletados 100% dos psitacídeos do plantel de cada criadouro, totalizando 280 aves. Exemplares das espécies coletadas em maior número, podem ser visualizadas na FIGURA 1. A captura das aves foi realizada com auxílio de puçá e luvas para contenção (FIGURA 2). Cada ave coletada possuía um tipo de marcação individual (anilha ou identificação eletrônica), possibilitando sua identificação.

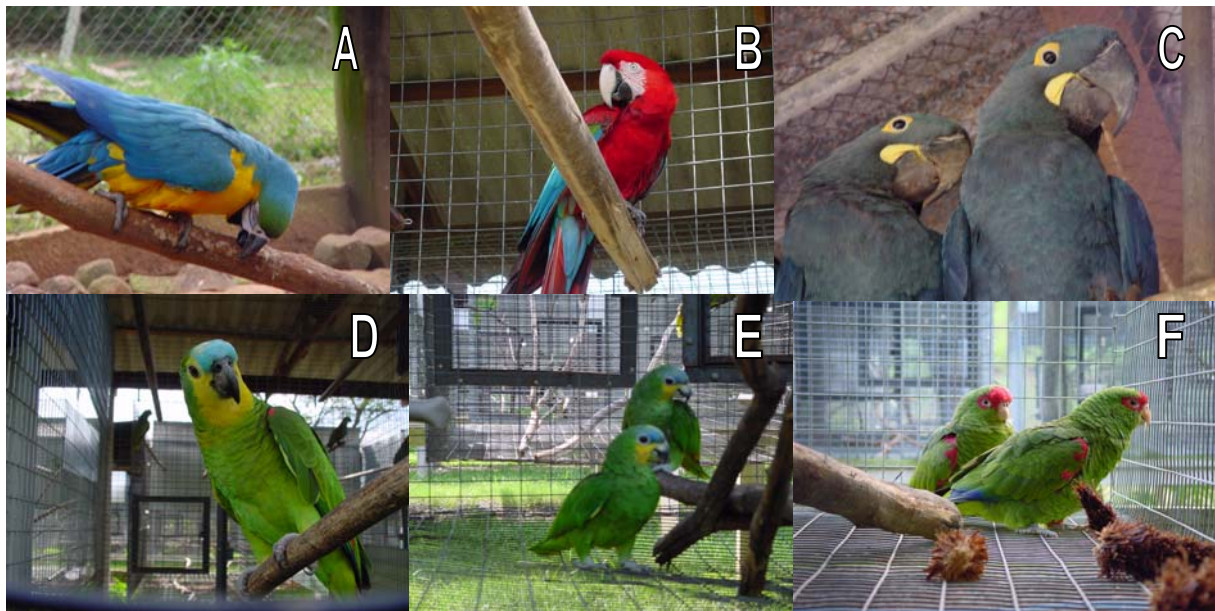


FIGURA 1 – Fotografias de algumas espécies amostradas neste trabalho: *Ara ararauna* (Painel A), *Ara chloroptera* (Painel B), *Anodorhynchus leari* (Painel C), *Amazona aestiva* (Painel D), *Amazona amazonica* (Painel E) e *Amazona pretrei* (Painel F).

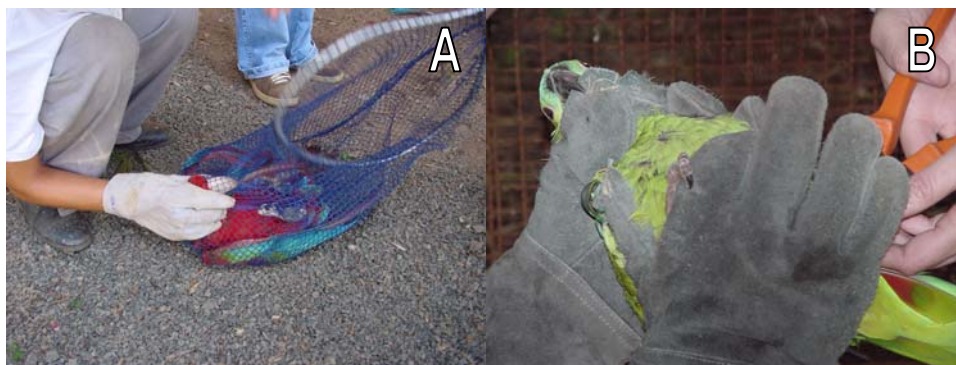


FIGURA 2 – Fotografias mostrando a captura da ave com puçá (Painel A) e contenção com auxílio de luvas (Painel B).

3.2 Coleta

Foram coletados suabes cloacais individuais dos psitacídeos. As amostras foram coletadas com suabe estéril e imediatamente colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de água peptonada tamponada a 1% (Merck) (FIGURA 3), também utilizada como meio de transporte, e enviadas para o Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA).

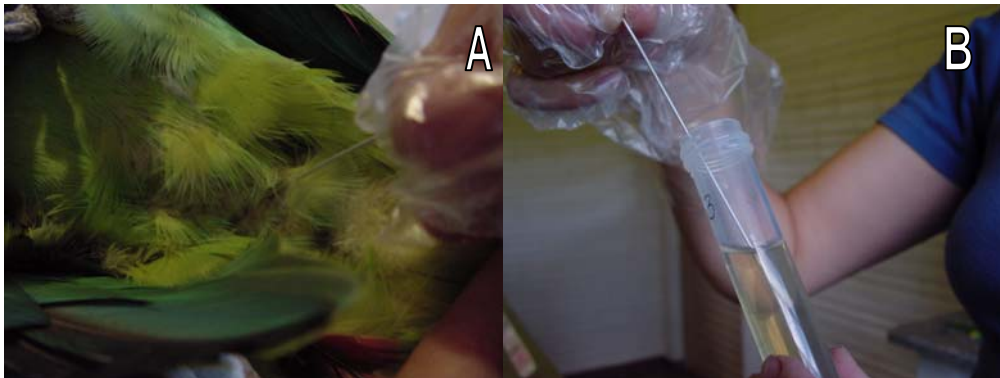


FIGURA 3 – Fotografias da coleta de suabe cloacal de um psitacídeo (Painel A) e do acondicionamento do suabe em água peptonada 1% (Painel B).

3.3 Enriquecimento da amostra

No Laboratório de Bacteriologia do CDPA, as amostras foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica durante 18-24 horas. Após este procedimento, 100 µL deste material foi transferido para 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (Merck), que foi incubado em banho-maria à 42°C por um período de 24 horas. Posteriormente, um mL do cultivo com Caldo Rappaport Vassiliadis foi coletado em duplicata para a PCR. Também foram semeadas culturas bacterianas puras de *S. Typhimurium* e de *S. Enteritidis* como controles positivos da PCR e de *Staphylococcus epidermidis* como controle negativo. Estas culturas, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do CDPA, eram mantidas em ágar estoque à 4°C e foram inoculadas em caldo BHI (Merck) e incubadas aerobiamente à 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica.

3.4 Extração do DNA

O DNA das amostras dos suabes cloacais foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio, de acordo com OLIVEIRA et al. (2002).

A extração foi realizada a partir de 1 mL do caldo Rappaport Vassiliadis que foi transferido para um tubo de reação com capacidade para 1,5 mL. Estes tubos foram centrifugados à 2000 g por 4 minutos em uma microcentrífuga Eppendorf à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em TE (10mM de Tris HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0) e agitado por 5 a 10 segundos em um agitador de tubos. A amostra foi centrifugada novamente e o sobrenadante foi desprezado, conforme descrito anteriormente. Nesta fase, o sedimento de cada duplicata foi armazenado a -20°C. A amostra encaminhada para extração teve seu sedimento ressuspenso em 444 µL de TE, onde foram adicionados 30 µL de lisozima (50 mg/mL, Pharmacia Biotech). Foi realizada a homogeneização em um agitador de tubos e posteriormente incubação por 30 minutos a 4°C. Após, acrescentou-se 25 µL de SDS a 10% (concentração final de 0,5%) e 1,25 µL de proteinase K 20 mg/mL (concentração final de 5µg/mL) e a amostra foi homogeneizada e incubada a 55°C em banho-maria por 30 minutos. A seguir, os tubos foram retirados do banho-maria, homogeneizados e adicionados 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1), pH 8,0. Homogeneizou-se por 5 a 10 segundos em um agitador de tubos e centrifugou-se a 16000 g por 4 minutos a temperatura ambiente. Transferiu-se 450 µL da fase aquosa para um novo tubo, adicionou-se um igual volume (450 µL) de fenol-clorofórmio, homogeneizou-se e centrifugou-se a 16000 g por 2 minutos à temperatura ambiente. Foram transferidos 400 µL da fase aquosa para um novo tubo, onde foi adicionado um igual volume de clorofórmio (400 µL), homogeneizou-se e centrifugou-se a 16000 g por 2 minutos à temperatura ambiente. Em um tubo novo, adicionou-se 1/10 do volume (35 µL) de acetato de sódio 3 M, pH 7,0 e 1 volume (350 µL) de isopropanol gelado, onde foram colocados os 350 µL da fase aquosa que foi incubada por 30 minutos a -20 °C. Decorrido este período, centrifugou-se por 10 minutos a 16000 g a 4°C numa centrífuga Sorvall modelo Super T21. Desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de etanol 80% gelado e centrifugou-se por 4 minutos a 16000 g à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento em 50 µL de TE que foi mantido a 4°C por 2 horas ou a -20°C até a execução da PCR.

Em todas as extrações realizadas, foram utilizadas as culturas bacterianas puras de *S. Typhimurium* e de *S. Enteritidis* como controles positivos e de *Staphylococcus epidermidis* como controle negativo.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nas 280 amostras extraídas, utilizou-se um par de iniciadores que amplifica um fragmento de 284 pb do gene *invA* pertencente ao gênero *Salmonella* (RAHN et al.,1992 e GÁLAN et al.,1992). Nas amostras positivas na detecção genérica de *Salmonella*, foi utilizado um par de iniciadores que amplifica uma região de 620 pb do gene *fliC*, específico de *S. Typhimurium* (SOUMET et al.,1999) e outro par de iniciadores que amplifica um fragmento de 488 pb do gene *sefA*, que está presente na *S. Enteritidis*, na *S. Pullorum* e na *S. Gallinarum* (DORAN et al.,1996). Os iniciadores utilizados (TABELA 2) foram sintetizados pela empresa Bio-Synthesis.

TABELA 2 – Descrição dos iniciadores utilizados para a detecção genérica e específica de *Salmonella* através da PCR.

Iniciadores	Gene alvo	Número de bases	Seqüência das bases (5'→3')	Número de pares de bases (pb) do produto amplificado
139 (1)	<i>invA</i>	26	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	284
141 (1)	<i>invA</i>	22	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
Fli15 (2)	<i>fliC</i>	22	CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT	620
Typ04 (2)	<i>fliC</i>	16	ACTGGTAAAGATGGCT	
A058 (3)	<i>sefA</i>	21	GATACTGCTGAACGTAGAAGG	488
A01 (3)	<i>sefA</i>	24	GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	

(1) *Salmonella* sp; (2) *S. Typhimurium*; (3) *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*

Fonte: Oliveira et al. (2002).

As amplificações foram realizadas em um volume final de 25 µL em um tubo de reação com capacidade para 200 µL. Este volume foi composto por 15,55 µL de água milliQ; 2,5 µL de um tampão concentrado 10 vezes (100 mM de Tris HCl pH 8,3 e 50 mM de Cloreto de Potássio), 0,75 µL 50 mM de Cloreto de Magnésio; 2 µL dos quatro dNTPs (2,5 mM de cada nucleotídeo Gibco-BRL); 1 µL de cada iniciador (20 pmol); 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL (Cenbiot^{Enzimas}, Porto Alegre), onde foram acrescentados 2 µL do DNA obtido após a extração com fenol-clorofórmio.

As amostras preparadas foram levadas a um termociclador modelo GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Instruments) para que o DNA fosse amplificado através de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (94°C, 1 minuto), anelamento (54°C, 30 segundos) e extensão (72°C, 30 segundos) (adaptado de RAHN et al., 1992).

Para a eletroforese, foram adicionados 2 µL de tampão de amostra (solução de azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30% na proporção de 1:1) a 10 µL da reação de PCR. A amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,2% com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo em tampão de TBE 0,5 vezes concentrado (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0) (SAMBROOK et al., 1989). A visualização foi realizada sob lâmpada ultravioleta, onde foram comparados os produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen®).

3.6 Técnica Microbiológica Convencional (TMC)

Após realização da PCR, as aves que tiveram suas amostras positivas foram coletadas novamente para o isolamento e identificação de *Salmonella* através da TMC. A TMC foi adaptada do anexo intitulado “Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmoneloses aviárias” da portaria nº 126/95 de 03 de novembro de 1995, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1995).

Os suabes cloacais foram inoculados primeiramente em água peptonada tamponada a 1%, também utilizada como meio de transporte, e, após 24 horas de incubação a 37°C, transferiu-se 100 µL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e 1 mL para 10 mL de caldo tetracionato, incubando-se por 18 a 24 horas à 42°C e 37°C, respectivamente. Após, fez-se o isolamento e a seleção de colônias em meios sólidos (Rambach e verde brilhante com Novobiocina - BGN) e, posteriormente, a caracterização bioquímica e antigênica.

A caracterização bioquímica preliminar baseou-se nas propriedades fisiológicas e metabólicas das colônias

suspeitas através da verificação da utilização de citocromo oxidase, fermentação da glicose, lactose e sacarose, descarboxilação da lisina, produção de gás a partir da fermentação da glicose, H₂S e indol, motilidade e produção de urease. A caracterização bioquímica complementar das colônias suspeitas baseou-se na verificação da utilização do citrato como fonte única de carbono, fermentação do manitol, sacarose, glicose, lactose, maltose e dulcitol, descarboxilação da ornitina e lisina e desidrolização da arginina, desaminação da fenilalanina e da habilidade em formar produtos finais neutros e/ou manter produtos ácidos finais estáveis a partir da fermentação da glicose.

A caracterização antigênica foi baseada na reação antígeno-anticorpo, com conseqüente aglutinação do antígeno frente aos soros anti-somáticos de *Salmonella* polivalente “O”, B e D e aos soros anti-flagelares de *Salmonella*.

3.7 Seqüenciamento dos produtos de PCR

Os produtos da PCR de uma *Ara ararauna*, um *Amazona aestiva* e um *Amazona amazonica* foram purificados por métodos enzimáticos utilizando-se o PCR Product Pre-Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Life Science).

O seqüenciamento dos fragmentos amplificados e purificados foi realizado no seqüenciador automático ABI Prism 310 com a utilização ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), que consiste na marcação com terminadores fluorescentes. As duas fitas de DNA foram seqüenciadas e as seqüências obtidas foram alinhadas com seqüências da literatura utilizando-se o Programa ClustalX (THOMPSON et al., 1997).

4 RESULTADOS

4.1 Detecção de *Salmonella* sp. pela PCR

A PCR, a partir do caldo Rappaport Vassiliadis incubado à 42°C, detectou a presença de *Salmonella* sp. em 37 das 280 amostras (13,2%) analisadas originadas de suabes cloacais de psitacídeos. Na FIGURA 4, encontra-se a fotografia de um gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo com a eletroforese dos produtos da PCR de algumas das amostras analisadas.

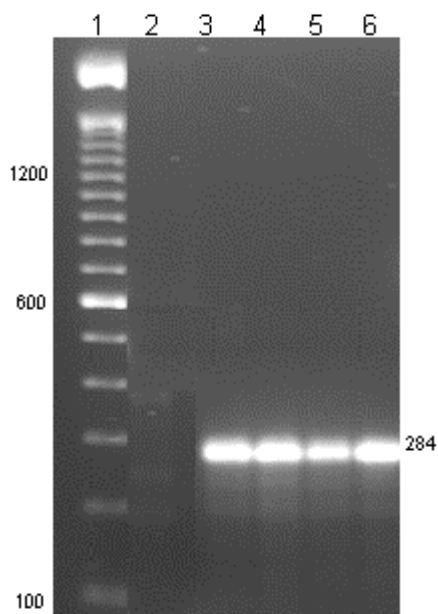


FIGURA 4 – Fotografia de gel de agarose 1,2%. Marcador de peso molecular de 100 pb (linha 1). Controle negativo (linha 2). Produtos de amplificação de DNA com os iniciadores 139 e 141 de *S. Typhimurium* (linha 3) e da amostra 104 (linha 4), amostra 115 (linha 5) e amostra 164 (linha 6).

Na TABELA 3, observam-se os resultados obtidos na PCR nas diferentes espécies. Estes dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado e não mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de amostras positivas por espécie na PCR.

TABELA 3 - Número de indivíduos analisados, número e percentual de amostras positivas na PCR para detecção de *Salmonella* sp. nas 280 amostras das diferentes espécies de psitacídeos.

Espécie	Número de indivíduos	PCR positivas	%
<i>Anodorhynchus leari</i>	04	01	25,0*
<i>Ara ararauna</i>	56	04	7,1*
<i>Ara macao</i>	03		
<i>Ara chloroptera</i>	08	01	12,5*
<i>Amazona aestiva</i>	163	22	13,4*
<i>Amazona amazonica</i>	25	07	28,0*
<i>Amazona pretrei</i>	10	02	20,0*
<i>Amazona vinacea</i>	01		
<i>Amazona farinosa</i>	04		
<i>Myiopsitta monachus</i>	01		
<i>Pyrrhura frontalis</i>	01		
<i>Pionus maximiliani</i>	03		
<i>Pionus menstruus</i>	01		
TOTAL	280	37	13,2

* $\chi^2 = 7,086$ $p < 0,05$ (valores sem diferença significativa).

O percentual de amostras positivas na PCR para detecção de *Salmonella* sp. no plantel do zoológico e dos criadouros conservacionista e comercial foi, respectivamente, 9,6%, 12,5% e 13,7% (TABELA 4), não apresentando diferença significativa após análise pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

TABELA 4 – Número de amostras analisadas, número e percentual de amostras positivas na detecção de *Salmonella* sp. através da PCR nas diferentes espécies de psitacídeos de cada plantel dos criadouros e zoológico do Rio Grande do Sul.

Espécie	Zoológico			Criadouro conservacionista			Criadouro comercial		
	Total	Positivas	%	Total	Positivas	%	Total	Positivas	%
<i>A. leari</i>	04	1	25,0						
<i>A. ararauna</i>				4	0	0,0	52	4	7,6
<i>A. macao</i>				2	0	0,0	1	0	0,0
<i>A. chloroptera</i>				3	0	0,0	5	1	20,0
<i>A. aestiva</i>	18	2	11,1	8	3	37,5	137	17	12,4
<i>A. amazonica</i>				2	0	0,0	23	7	30,4
<i>A. pretrei</i>	04	0	0,0				6	2	33,3
<i>A. vinacea</i>							1	0	0,0
<i>A. farinosa</i>				4	0	0,0			
<i>M. monachus</i>	1	0	0,0						
<i>P. frontalis</i>	1	0	0,0						
<i>P. maximiliani</i>	3	0	0,0						
<i>P. menstruus</i>				1	0	0,0			
TOTAL	31	3	9,6*	24	3	12,5*	225	31	13,7*

* $\chi^2 = 0,411$ $p < 0,05$ (valores sem diferença significativa).

O DNA da maioria das duplicatas das amostras positivas para *Salmonella* sp. foram extraídas pelo método fenol-clorofórmio conforme descrito no item 3.4 e amplificadas conforme item 3.5. A PCR de 34 duplicatas resultou em 18 amostras positivas (52,9%) (TABELA 5). A maior parte das duplicatas negativas estavam estocadas há aproximadamente 9 meses à -20°C .

TABELA 5 - Resultado da PCR realizada nas duplicatas das amostras positivas para *Salmonella* sp. nas diferentes espécies de psitacídeos do plantel dos criadouros e zoológico do Rio Grande do Sul.

Espécie	Número de duplicatas	PCR positivas	%
<i>Anodorhynchus leari</i>	01	01	100,0
<i>Ara ararauna</i>	02	02	100,0
<i>Amazona aestiva</i>	22	08	36,3
<i>Amazona amazonica</i>	07	05	71,4
<i>Amazona pretrei</i>	02	02	100,0
TOTAL	34	18	52,9

4.2 Identificação de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* pela PCR

As 37 amostras positivas na PCR para detecção genérica de *Salmonella* foram testadas frente a pares de iniciadores específicos para *S. Typhimurium* ou específicos para *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, conforme descrito anteriormente no item 3.5. Todas as amostras foram negativas, frente aos dois pares de iniciadores.

4.3 Detecção de *Salmonella* sp. pela TMC

Sedimentos de 10 duplicatas das amostras positivas na PCR para detecção de *Salmonella* sp. foram ressuspensos em água peptonada a 1%, descongelados em banho-maria 37°C e incubados por 18 a 24h em estufa bacteriológica à 37°C e encaminhados para a TMC, conforme descrito no item 3.6. Duas amostras apresentaram crescimento de colônias com morfologia distinta de *Salmonella* sp.

Um total de 37 aves positivas na PCR foram coletadas novamente e suas amostras examinadas pela TMC. Destas, 15 apresentaram crescimento bacteriano sendo que apenas duas amostras possuíam colônias morfológicamente semelhantes a *Salmonella* sp. A colônia I isolada do ágar Rambach era circular, pequena, bordos regulares e coloração vermelha. A

colônia II isolada do ágar BGN era circular, pequena, transparente, mudando a coloração do meio para rosa. As mesmas foram testadas nas provas bioquímicas (TABELA 6).

TABELA 6 - Resultado da identificação bioquímica preliminar realizada em duas colônias morfologicamente compatíveis com *Salmonella* sp. isoladas através da TMC de duas amostras de suabes cloacais dos psitacídeos e de *S. Typhimurium* utilizada como controle positivo.

Protocolo		Colônia I	Colônia II	<i>S. Typhimurium</i>
TSI	Base	Alcalina	Ácida	Ácida
	Gás	-	+	+
	Bisel	Alcalino	Ácido	Alcalino
	H ₂ S	-	-	+
LIA	Base	Alcalina	Ácida	Alcalina
	Bisel	Alcalino	Alcalino	Alcalino
	H ₂ S	-	-	+
SIM	H ₂ S	-	-	+
	Indol	-	+	-
	Motilidade	-	+	+
Urease		-	-	-

Todas as 15 amostras que apresentaram crescimento bacteriano tiveram colônias isoladas e inoculadas em caldo BHI (Merck) e incubadas aerobiamente à 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica, sendo extraídas e amplificadas conforme descrito nos itens 3.4 e 3.5. Todas as colônias foram negativas na PCR para detecção de *Salmonella* sp.

As mesmas 37 amostras coletadas novamente para a TMC, também foram testadas novamente por PCR. Apenas uma amostra foi positiva na PCR para detecção de *Salmonella* sp.

4.4 Seqüenciamento dos produtos da PCR

Ambas as fitas de DNA do produto de amplificação com 284 pb de três amostras distintas (uma *Ara ararauna*, um *Amazona aestiva* e um *Amazona amazonica*) foram seqüenciadas. As seqüências obtidas não foram boas, resultando em 5% das bases não determinadas. O alinhamento das seqüências obtidas mostrou um maior grau de homologia com as seqüências existentes de *Salmonella* sp.

5 DISCUSSÃO

O Brasil é considerado o mais rico em representantes da família Psittacidae, abrigando dentro de suas fronteiras aproximadamente 30% das espécies conhecidas atualmente no mundo. Apesar de toda diversidade da avifauna brasileira, e do grande número de aves mantidas em cativeiro, poucas pesquisas veterinárias são desenvolvidas visando a sua proteção. Muitas são as causas de morbidade e mortalidade que acometem os psitacídeos porém, devido à falta de informação científica adequada às aves nacionais, muitos diagnósticos deixam de ser realizados e as patologias de nossas aves, frequentemente, permanecem desconhecidas.

A manutenção de aves silvestres em cativeiro requer conhecimentos do animal sadio e dos processos mórbidos a que estes indivíduos possam ser submetidos, devido à exacerbação desses processos em populações mantidas num espaço restrito. Dessa forma, a detecção de patógenos adquire suma importância no esclarecimento das causas de morbidade e mortalidade nas aves cativas. O conhecimento das doenças do cativeiro torna-se imprescindível nos programas de conservação para evitar que animais doentes ou portadores sejam reintroduzidos no ambiente natural, disseminando doenças exóticas. Munson e Cook (1993) afirmaram que o conhecimento das doenças dos animais de cativeiro pode servir como modelo para o estudo das respostas dos animais em seu ambiente natural frente a um desafio. As afecções dos animais de cativeiro são comparáveis aos de vida livre e, portanto, programas de conservação ambiental podem se beneficiar das pesquisas veterinárias realizadas em cativeiro.

A falta de informações sobre a prevalência de *Salmonella* sp. em psitacídeos mantidos em cativeiro motivaram a realização desta pesquisa pois a salmonelose é considerada uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde pública no mundo, em razão da elevada morbidade e pela dificuldade no controle; podendo infectar uma grande variedade de mamíferos, aves e répteis (SCHIMIDT, 1993; REAVILL, 1996; HOFER et al., 1997).

Dentre as 13 espécies de psitacídeos nativos da fauna brasileira amostradas, os papagaios *Amazona aestiva* totalizaram 58% das aves analisadas, seguida por 20% de exemplares de *Ara ararauna* e de 8,9% de *Amazona amazonica*. O maior número de exemplares examinados da

espécie *Amazona aestiva* ocorreu devido à sua ampla distribuição geográfica e fama de “falador”, o que o torna um dos psitacídeos mais capturados na natureza. Segundo Birdlife (2000), o impacto do tráfico sobre esta população não está claro, mas sabe-se que o número de papagaios retirados da natureza tem aumentado o que determinará um declínio considerável nesta população. As espécies *Anodorhynchus leari* (arara azul de lear), *Ara macao* (arara vermelha), *Amazona pretrei* (papagaio charão) e *Amazona vinacea* (papagaio do peito-roxo) coletadas para a realização deste trabalho, fazem parte do apêndice I da CITES, ou seja, são espécies proibidas para o comércio internacional devido ao reduzido número de indivíduos em seu ambiente natural. As outras espécies analisadas encontram-se listadas no apêndice II da CITES.

Neste trabalho, houve a detecção de *Salmonella* sp. por PCR em 37 das 280 amostras analisadas originadas de suabes cloacais de psitacídeos mantidos em cativeiro, determinando uma prevalência de 13,2% (TABELA 3), sendo este valor maior do que os citados na literatura para aves mantidas em cativeiro. Não houve diferença significativa, após análise estatística, entre o percentual de amostras positivas no plantel do zoológico e dos criadouros conservacionista e comercial. Embora o objetivo desta pesquisa não fosse a determinação da prevalência entre as espécies de psitacídeos, devido ao pequeno número de algumas espécies amostradas, os resultados obtidos na PCR foram analisados e não mostraram diferença significativa no percentual de amostras positivas entre as espécies analisadas (TABELA 4).

A literatura cita várias pesquisas realizadas para determinar a prevalência de *Salmonella* sp. em aves silvestres utilizando a técnica microbiológica convencional (TMC) ou a sorologia. Wilson e MacDonald (1967), Goodchild e Tucker (1968), MacDonald e Brown (1974), Panigrahy et al. (1979), Okoh e Onazi (1980), Euden (1990), Quessy e Messier (1992), Mikaelian et al. (1997) e Hudson et al. (2000) utilizaram vísceras de aves que apresentaram alterações clínicas para o isolamento de *Salmonella* sp. através da TMC obtendo uma prevalência que variou de 0,6% a 8,7%. Goodchild e Tucker (1968), Brittingham et al. (1988), Kirkpatrick e Trexler-Myren (1986) e Palmgren et al. (1997) pesquisaram *Salmonella* sp. através da TMC em aves clinicamente sadias utilizando suabes cloacais como amostras obtendo prevalências que variaram de 0% a 4%. Panigrahy et al. (1979) e Dorrestein et al. (1985) citaram prevalência de 7,8% e 1,7%, respectivamente, nos psitacídeos necropsiados analisados pela TMC. Grimes e Arizmendi (1992) analisaram 2403 soros, obtendo 1,6% dos psitacídeos soropositivos para *S. Typhimurium*. Karesh et al. (1997) testaram 25 soros de araras de vida livre resultando em oito soropositivas para *S. Pullorum*. Allgayer et al. (2000)

examinaram 60 soros de psitacídeos mantidos em cativeiro, sendo todos negativos para *S. Pullorum*. Estes mesmos psitacídeos fizeram parte do presente trabalho e resultaram em três aves positivas na PCR.

As diferenças encontradas na prevalência dos autores citados e do presente trabalho, provavelmente estão relacionadas com a susceptibilidade das espécies analisadas, estado nutricional, condições clínicas das aves (doentes ou clinicamente sadias), habitat das aves (urbano ou natural, vida livre ou cativeiro), tipo de amostra clínica utilizada (vísceras, fezes ou soro) e a especificidade e sensibilidade da metodologia utilizada (sorologia, TMC ou PCR).

A avaliação sorológica em silvestres deve ser realizada somente se a espécie avaliada tiver sua resposta imune contra o patógeno de interesse conhecido. Gardner et al. (1996) salientaram as diferenças de patogenicidade das cepas e sorovares e a reação cruzada que pode ocorrer devido a exposição à organismos de estrutura antigênica similar, como problemas no uso de teste sorológicos validados para espécies domésticas em espécies silvestres. Os trabalhos relatados não mencionaram se houve validação do teste sorológico utilizado para aves silvestres, dessa forma, as prevalências obtidas podem ter sofrido as interferências citadas.

Para verificar se as amostras positivas não eram falso-positivas, o DNA das duplicatas foi novamente extraído e re-testado. Três duplicatas das amostras positivas foram extraviadas, impossibilitando sua análise. A PCR das 34 duplicatas resultou em 18 amostras positivas (52,9%). Esta redução no número de amostras positivas, provavelmente, deve-se ao fato de que a maior parte das duplicatas negativas estavam estocadas há aproximadamente 9 meses à -20°C , o que pode ter propiciado a degradação do DNA e, conseqüentemente, um menor número de amostras foram positivas nesta segunda PCR. Outra possibilidade é que as amostras negativas nesta segunda PCR sejam realmente negativas e que as primeiras amostras analisadas tenham sido contaminadas de alguma forma durante a primeira manipulação, embora todos os controles utilizados tenham gerado os resultados esperados.

As 37 amostras positivas na PCR para detecção genérica de *Salmonella* foram testadas frente a pares de iniciadores específicos para *S. Typhimurium* ou específicos para *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Todas as amostras foram negativas. Segundo Oliveira et al. (2002), os limites de detecção obtidos pela PCR para a detecção genérica de *Salmonella* foram 1,6, 7,2, $1,1 \times 10^3$ e $1,8 \times 10^5$ células para *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, respectivamente. O limite de detecção, obtido com os iniciadores

selecionados para identificar a *S. Typhimurium*, foi de 6,4 células. Já a PCR para identificar *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* possuiu limites de detecção de $1,2 \times 10^3$, $4,4 \times 10^7$ e $1,8 \times 10^6$, respectivamente. Devido ao maior número de células necessárias para a detecção específica de *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, não se pode afirmar que as salmonelas identificadas genericamente não pertençam a estes sorovares. Em relação à *S. Typhimurium*, provavelmente não foi detectada por não estar presente nas amostras analisadas, pois o limite de detecção da técnica para identificação deste sorovar é bastante baixo.

Rahn et al. (1992) e Hudson et al. (2000) relataram a presença do gene de invasão *invA* em todas as amostras analisadas de salmonelas isoladas de aves domésticas e silvestres, respectivamente. Estes resultados indicam a adequada utilização do gene *invA* como alvo para detecção genérica de *Salmonella* no presente trabalho. Hudson et al. (2000) também demonstraram a ausência do gene fimbrial *sefC*, presente na *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e que as *S. Typhimurium* isoladas dessas aves não apresentaram diferenças dos sorovares isolados de outros animais com relação à adesão e ocorrência de genes de invasão. O sorovar *Typhimurium* tem sido o mais frequentemente isolado de vísceras de aves silvestres de estimação e de vida livre (DORRESTEIN, 1997; REAVILL, 1996), já os sorovares *Enteritidis*, *Gallinarum* e *Pullorum* foram isolados somente de casos clínicos em que houve contato com dejetos humanos e aves domésticas (GARCIA e SCHÖNHOFEN, 1982; OKOH e ONAZI, 1980).

Na tentativa de isolar as salmonelas detectadas na PCR genérica para futura caracterização, sedimentos de 10 duplicatas foram ressuspensos em água peptonada 1%, descongelados e encaminhados para a TMC. Duas amostras apresentaram crescimento de colônias com morfologia distinta de *Salmonella* sp. Estes sedimentos estavam estocados à -20°C , o que pode ter gerado uma redução no número de células bacterianas viáveis. O processo de descongelamento pode lisar bactérias devido à formação de cristais e, conseqüentemente diminuir o número de bactérias viáveis. Devido a este fato, decidiu-se por uma nova coleta das aves que haviam sido positivas na PCR. Um total de 37 aves foram coletadas novamente e suas amostras examinadas pela TMC e PCR. Destas, 15 amostras apresentaram crescimento bacteriano sendo que apenas duas geraram colônias morfológicamente semelhantes à *Salmonella* sp. As mesmas foram testadas nas provas bioquímicas preliminares (TABELA 6), resultando não serem compatíveis com *Salmonella* sp. A ausência de crescimento bacteriano em 22 amostras está relacionado com o uso de uma

técnica seletiva para *Salmonella*, que dificulta o crescimento de outras bactérias, principalmente as Gram positivas que, segundo Gerlach (1994) são predominantes na flora normal dos psitacídeos.

Vários fatores podem ser responsáveis pelo não isolamento de salmonela neste trabalho. O pequeno número de *Salmonella* na microbiota de aves clinicamente saudáveis (PHILLIPS, 1986; BRITTINGHAM et al., 1988; HOPKINS et al., 1990; MCFARLANE, 1996), o diagnóstico através da TMC não detecta este microrganismo em amostras clínicas com poucas células (STONE et al., 1994), a pressão de seleção devido ao crescimento em meio artificial (LIESACK e STACKEBRANDT, 1992), a competição com outros microrganismos, administração de antimicrobianos que podem inibir o seu crescimento e a eliminação intermitente no caso de portadores. Nenhum dos trabalhos referenciados no presente estudo, relatou o isolamento de *Salmonella* através da TMC em psitacídeos clinicamente saudáveis, o que vem a corroborar os resultados obtidos nesta pesquisa.

Todas as 15 amostras que apresentaram crescimento bacteriano foram testadas na PCR. Todas as colônias foram negativas na PCR para detecção de *Salmonella* sp. As mesmas 37 amostras coletadas novamente para a TMC, também foram testadas pela PCR. Apenas uma amostra foi positiva na PCR para detecção de *Salmonella* sp. A não detecção do DNA desta bactéria em amostras anteriormente positivas, pode estar relacionado com a liberação intermitente deste patógeno. O isolamento de *Salmonella* sp. somente do conteúdo intestinal, sem lesões na parede do intestino, geralmente indica que a ave é um portador assintomático (MIKAELIAN et al., 1997); sendo que salmonelas não virulentas, frequentemente, colonizam o intestino resultando em uma infecção assintomática com liberação intermitente desta bactéria (GERLACH, 1994). Segundo Hofer et al. (1997), infecções paratíficas aviárias são quase sempre inaparentes.

Como não houve isolamento de *Salmonella* foi realizado o seqüenciamento de três amostras positivas para verificar se os produtos de amplificação da PCR eram específicos deste gênero. As seqüências geraram dúvidas em algumas posições devendo ser refeitas. Mesmo assim, estas seqüências foram alinhadas com seqüências do Genbank, mostrando um maior grau de homologia com o gênero *Salmonella*.

A maior prevalência de *Salmonella* em psitacídeos aparentemente saudáveis encontrada neste trabalho deve-se a maior sensibilidade e especificidade da PCR utilizada para a detecção deste patógeno. Tuchili et al. (1995), Pontes (1999) e Oliveira et al. (2002) determinaram que

a PCR foi mais sensível do que a TMC. Oliveira et al. (2002) afirmaram que a PCR para detecção genérica de salmonela de galinhas foi 100% específica e muito sensível.

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, este foi o primeiro trabalho de detecção de *Salmonella* diretamente de aves silvestres utilizando a PCR. Os resultados do presente trabalho indicam que aproximadamente 13,2% dos psitacídeos mantidos em cativeiro podem ser portadores assintomáticos ou serem transientemente infectados pelo gênero *Salmonella*. Desta forma a utilização da PCR aqui descrita pode ajudar na diminuição do número de resultados falso-negativos, evitando que aves potencialmente disseminadoras deste patógeno sejam reintroduzidas no ambiente natural ou sejam fontes de infecção para o homem e outros animais. Outros estudos serão necessários para elucidar os sorovares envolvidos e esclarecer detalhes da dinâmica desta infecção.

6 CONCLUSÕES

1. Psitacídeos clinicamente sadios mantidos em cativeiro podem estar infectados por *Salmonella* sp.
2. A prevalência de *Salmonella* sp., determinada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em psitacídeos clinicamente sadios mantidos em cativeiro foi de 13,2%.
3. Não foi possível o isolamento e posterior caracterização de *Salmonella* em psitacídeos clinicamente sadios mantidos em cativeiro através da Técnica Microbiológica Convencional.
4. As amostras positivas na PCR genérica para *Salmonella*, foram negativas na PCR específica para *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, indicando que, provavelmente, estes sorovares não estavam presentes nas amostras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLGAYER, M.C.; MORAES, H.L.S.; ANDELIERI, S.L.; PEREIRA, R.A.; MARIA, J.S.; SALLE, F.O.; KELLERMANN, A.; SALLE, C.T.P. Avaliação sorológica para verificação de infecção natural de *Salmonella* Pullorum em psitacídeos do criadouro Asas do Brasil. In: 26º CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL. 2002, Porto Alegre-RS. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2002. p.128.
- AL-SOUD, W.A; RADSTRÖM, P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.10, p. 3748-3753, 1998.
- AMAND, W.B. Miscellaneous avian infectious diseases.. In: FOWLER, M.E. **Zoo & wild animal medicine**. 2ed. Philadelphia: WB Saunders. p.227-231, 1986.
- ASHTON, W.L.G. Enterobacteriaceae. In: JORDAN, F.T.W. **Poultry diseases**. London: Bailliere Tindall, 1990. p.11-32.
- BARROW, P.A.; DUCHET-SUCHAUX, M. *Salmonella* carriage and the carrier state. **Proceedings of Salmonella and salmonellosis'97 Symposium**. Plougragan France. p.241-249, 1997.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. **Threatened birds of the world**. Lynx Editions and Birdlife. Barcelona and Cambridge, 2000.
- BLACKBURN, C.W. Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods. A review. **Journal of Applied Bacteriology**. v.75, p.199-214, 1993.
- BRITTINGHAM, M.C.; TEMPLE, S.A.; DUNCAM, R.M. A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. **Journal of Wild Life Diseases**. v.24, n.2, p.299-307, 1988.
- BENNET, A.R.; GREENWOOD, D.; TENNANT, C.; BANKS, J.G.; BETTS, R.P. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**. v.26, p.437-441, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 126, de 03 de novembro de 1995. Normas para Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da [República Federativa do Brasil]**. Brasília, n.212, p.17694-17698. Seção 1. 06 nov 1995
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 3, de 03 de novembro de 2002. Normas técnicas para controle e certificação de

núcleos e estabelecimentos avícolas como livre de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e livre e controlado para de *Salmonella Enteritidis* e de *Salmonella Typhimurium* **Diário Oficial da [República Federativa do Brasil]**. Brasília, n.11, p.14-15. Seção 1. 16 jan 2002.

COHEN, N.D.; NEIBERGS, H.L.; McGRUDER, E.D.; WHITFORD, H.W.; BEHLE, R.W.; RAY, P.M.; HARGIS, B.M. Genus-specific detection of *Salmonellae* using the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**. n.5, p.368-371, 1993.

COLLAR, N.J. Family Psittacidae (parrots). In: DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J. EDS. **Handbook of the birds of the world**. v.4. Sandgrouse to Cuckoos. Barcelona: Lynx Edicions, 1997. p.280-447.

CRAVEN, S.E.; STERN, N.J.; LINE, E.; BAILEY, J.S.; COX, N.A.; FEDORKA-CRAY, P. Determination of the incidence of *Salmonell* spp., *Campylobacter jejuni*, and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. **Avian Diseases**. v.44, n.3, p.715-720, 2000.

CUBAS, Z.S. Natural diseases of free-ranging birds in south america. In: FOWLER, M.E. **Zoo & wild animal medicine: current therapy 3**. Colorado: Saunders Company, p.166-172, 1993.

DAVIDSON, W.R.; NETTLES, V.F.; COUVILLION, C.E.; HOWERTH, E.W. Diseases diagnosed in wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) of the southeastern united states. **Journal of Wildlife Diseases**. v.21, n.4, p.386-390, 1985.

DORAN, J.L., COLLINSON, S.K., CLOUTHIER, S.C., CEBULA, T.A., KOCH, W.H., BURIAN, J., BANSER, P.A., TODD, E.C.D., KAY, W.W. Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. **Molecular and Cellular Probes**, n.10, p.233-246, 1996.

DORRESTEIN, G.M. Bacteriology. In: ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORRESTEIN, G.M.; QUESENBERY, K. **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders Company, p.255-280, 1997.

DORRESTEIN, G.M.BUITELLAAR, M.N.; VANDERHAGE, M.H.; ZWART, P. Evaluation of a bacteriological and mycological examination of psittacine birds. **Avian Diseases**. v.29, p.951-962, 1985.

DOYLE, M.P.; CLIVER, D.O. Salmonella. In: CLIVER, D.O. **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press. p.185-204, 1990.

EUDEN, P.R. Salmonella isolates from wild animals in Cornwall. **British Veterinary Journal**. v.146, n.3, p.228-232, 1990.

FORSHAW, J.M. **Parrots of the world**. Neptune: T. F. H. Publications, p.17-36, 1977.

FREITAS, M.A.Q.; SANTOS, J.A.; PIRES, A.R.; NASCIMENTO, E. Infecção por *Salmonella Typhimurium* de origem hídrica em garça gigante (*Casmerodius albus egretta*)

em sua vida livre no Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo. v.11, n.5, p.161-166, 1977.

GÁLAN, J.E.; GINNOCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**. v.174, n. 13, p.4338-4339, 1992.

GARCIA, R.G.F.; SCHÖNHOFEN, C.A. Salmonellosis in marine birds from the Paranaguá bay. **Arq. Biology Technology**. v.25, n.2, p. 237, 1982.

GARDNER, I.A.; HIETALA, S.; BOYCE, W.M. Validity of using serological testes for diagnosis of diseases in wild animals. **Rev. Science Technology**. v.15, n.1, p.323-335, 1996.

GAST, R.K. Paratyphoid infections. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. 10.ed. Iowa: Iowa State University Press, p.97-121, 1997.

GERICHTER, C.B.; SECHTER, I. Animal sources of *Salmonella* in Israel. **Israel Journal of Medical Science**. v.6, p. 413-421, 1970.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian medicine: principles and application**. Florida: Wingers Publishing, p.953-956, 1994.

GODOY, Silvia Neri. **Patologia comparada de psitacídeos mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo**. São Paulo: USP, 214p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental Comparada), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2001.

GOODCHILD, W.M.; TUCKER, J.F. Salmonellae in british wild birds and their transfer to domestic fowl. **British Veterinary Journal**. v.124, n.3, p.95-101, 1968.

GRIMES, J.E.; ARIZMENDI, F. Survey of clinical Psittacine bird sera for *Salmonella typhimurium* agglutinins. **Avian Diseases**. v.36, p.813-815, 1992.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.17, n.2, p.55-62, 1997.

HOORFAR, J.; BAGGESEN, D.L.; PORTING, P.H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive *Salmonella* isolates. **Journal of Microbiological Methods**. v.35, p.07-84, 1999.

HOPKINS, B.A.; SKEELES, J.K.; HOUGHTEN, G.E.; SLAGLE, D.; GARDNER, K. A survey of infectious diseases in wild turkeys (*Meleagris gallopavo silvestris*) from Arkansas. **Journal of Wildlife Diseases**. v.26, n.4, p.468-472, 1990.

HOWERTH, E.W. Salmonellosis in a wild turkey. **Journal of Wildlife Diseases**. v.21, n.4, p.433-434, 1985.

HUDSON, R.C.; QUIST, C.; LEE, M.D.; KEYES, K.; DODSON, S.V.; MORALES, C.; SANCHEZ, S.; WHITE, D.G.; MAURER, J.J. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates

from nondomestic birds in Southeastern United States. **Journal of Clinical Microbiology.** v.38, n.5, p.1860-1865, 2000.

IKUTA, N. Diagnóstico molecular de patologias infecciosas aviárias. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA. 2000, Santa Maria – Rio Grande do Sul, 2000.

KANASHIRO, A.M.I.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. Persistência de *Salmonella* sp. após antibioticoterapia em psitacídeos pertencentes a um criadouro comercial. **Arquivos do Instituto Biológico.** v.69, n.2, p.99-101, 2002.

KAPPERUD, G.; STENWIG, H.; LASSEN, J. Epidemiology of *Salmonella* Typhimurium O:4-12 infection in Norway: evidence of transmission from na avian wildlife reservoir. **Am. Journal Epidemiology.** v.147, p.774-782, 1998.

KARESH, W.B., CAMPO, A.; BRASELTON, E.; PUCHE, H.; COOK, R.A. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. **Journal of Zoo Wildlife Medicine.** v.28, n.4, p.368-377, 1997.

KEYMER, I.F. Disorders of the digestive system. In: SAMOUR, J. **Avian medicine.** London: Harcourt Publishers, p.193-211, 2000.

KIRKPATRICK, C.E.; TREXLER-MYREN, V.P. A survey of free-living falconiform birds for *Salmonella*. **Journal American Veterinary Medical Association.** v.189, p.997-998, 1986.

KOMOROWSKI, R.A.; HENSLEY, G.T. Epizootic salmonellosis in an open zoo aviary. **Archives Environmental Health.** v.27, p.110-111, 1973.

LE MOS, M.; SILVA, J.M.; FEDULLO, L.P.L.; PEREIRA, V.L.A. *Salmonella* em aves silvestres no jardim zoológico do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária.** v.6, n.1, p.40-43, 1999.

LIESACK, W.; STACKEBRANDT, E. Occurrence of novel groups of the domain bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from na australian terrestrial environment. **Journal of Bacteriology.** v.174, n.15, p.5072-5078, 1992.

MADEWELL, B.R.; McCHESNEY, A.E. Salmonellosis in a human infant, a cat, and two parakeets in the same household. **Journal American Veterinary Medical Association.** v.167, n.12, p.1089-1090, 1975.

MAGALHÃES, C.L. Medicina da conservação. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária.** Ano VII, n.22, p.9-12, 2001

McCULLOUGH, N.B.; EISELE, C.W. Pathogenicity of strains of *Salmonella pullorum* obtained from spray-dried whole egg. **Journal of Infectious Diseases.** n.89, p.259-265, 1951.

McDONALD, J.W.; BELL, J.C. Salmonellosis in horses and wild birds. **Veterinary Record.** v.107, n.2, p.46-47, 1980.

- McDONALD, J.W.; BROWN, D.D. Salmonella infection in wild birds in Britain. **Veterinary Record.** v.94, n.14, p.321-322, 1974.
- McFARLANE, R.A. Some observations on adelic penguin (*Pygoscelis adeliae*) mortality in east Antarctica. **Avian Pathology.** v.25, p.187-190, 1996.
- MITCHELL, R.B.; GARLOCK, F.C.; BROH-KAHN, R.H. An outbreak of gastro-enteritis presumably caused by *Salmonella pullorum*. **Journal of Infectious Diseases.** v.79, p.57-62, 1946.
- MIKAELIAN, I.; DAIGNAULT, D.; DUVAL, M.C.; MARTINEAU, D. *Salmonella* infection in wild birds from Quebec. **Canadian Veterinary Journal.** v.38, p.385, 1997.
- MOHAN, R. *Salmonella* infection in pet birds. **Proc. Assoc. Avian Vet.** p.78-86, 1983.
- MULLIKEN, T.A.; THOMSEN, J.B. International trade. In: ABRAMSON, J.; SPER, B.L.; THOMSEN, J.B.T. **The large macaws.** California: Raintree Publications, 1995. p.485-495.
- MUNSON, L.; COOK, R.A. Monitoring, investigation and surveillance of diseases em captive wildlife. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine.** v.24, p.281-289, 1993.
- OGLESBEE, B.L.; BISHOP, C.L. Doenças infecciosas aviárias. In: BICHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders: Clínica de pequenos animais.** São Paulo: Roca, 1998. p. 1404-1419.
- OKOH, A.E.J.; ONAZI, M. Notes on Salmonellae isolated from wildlife in Kano Zoological Gardens. **Journal of Wildlife Diseases.** v.16, n.1, p.7-10, 1980.
- OLIVEIRA, Sílvia Dias. **Deteção e identificação de *Salmonella* sp. *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em materiais de origem avícola.** Porto Alegre: UFRGS, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000.
- OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T; SILVA A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology.** v.87, p.25-35, 2002.
- OROS, J.; RODRIGUEZ, J.L.; FERNANDEZ, ^a; HERRAEZ, P.; ESPINOSA DE LOS MONTEIROS, A.; JACOBSON, E.R. Simultaneous occurrence of *Salmonella arizonae* in a sulfur crested cockatoo (*Cacatua galerita galerita*) and iguanas. **Avian Diseases.** v.42, n.4, p.818-823, 1998.
- OROSZ, S.E.; CHENGAPPA, M.M.; OYSTER, R.A.; MORRIS, P.J.; TROCK, S.; ALTEKRUSE, S. *Salmonella enteritidis* infection in two species of Psittaciformes. **Avian Diseases.** v.36, p.766-769, 1992.
- PALMGREN, H.; SELLIN, M.; BERGSTRÖM, S.; OLSEN, B. Enteropathogenic bacteria in migrating birds arriving in Sweden. **Scandinavian Journal Infectious Diseases.** v.29, p.565-568, 1997.

PANIGRAHY,B.; GILMORE, W.C. Systemic salmonellosis in na african gray parrot and salmonella osteomyelitis in canaries. **JAVMA**. v.183, n.6, p.699-700, 1983.

PANIGRAHY,B.; GRIMES, J.E.; RIDEOUT, M.S.; SIMPSON, R.B.; GRUMBLES, L.C. Zoonotic diseases in Psittacine birds: apparent increased occurrence of chlamidiosis (psittacosis), salmonellosis, and giardiasis. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.175, n.4, p.359-361, 1979.

PHILLIPS, I.R. Parrots encountered in practice: a survey of one hundred and twelve cases. **Journal of Small Animal Practice**. v.27, p.189-199, 1986.

PHILLIPS, W.E.JR.; HATKIN, J.M. Isolation of *Salmonella houtenae* from a cockateel. **Avian Diseases**. v.22, n.2, p.251-253, 1978.

PONTES, Alexandre Pontes. **Avaliação da reação em cadeia pela polimerase (PCR) na detecção de *Salmonella* sp. em amostras ambientais (“swab” de arrasto)**. Porto Alegre: UFRGS, 128p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GBESLING, L.L. Supplement 2000 (n° 44) to the kauffman-white scheme. **Research in Microbiology**. v.152, p.907-909. 2001.

QUESSY, S.; MESSIER, S. Prevalence of *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. and *Listeria* sp. in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*). **Journal of Wildlife Diseases**. v.28, p.526-531, 1992.

REAVILL, D. Bacterial diseases. In: ROSSKOPF, W.; WOERPEL, R. **Diseases of cage and aviary birds**. 3.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.596-612, 1996.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A.; CLARKE, R.C.; McEWEN; GALÁN, J.E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS III, R. GYLES, C.L. Amplification of an *inv A* sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**. n.6, p.271-279, 1992.

RENTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. Disponível na Internet. <www.rentas.org.br> Acessado em fevereiro de 2003.

RUPLEY, A.E. **Manual of avian practice**. Philadelphia: Saunders Company, p.267-268, 1999.

RUSSEL, D.W. Common cage and aviary birds. In: BURR, E.W. **Companion bird medicine**. Iowa: Iowa State University Press, 1987.

SAMBROOK, R.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, v.3, 1989.

SAMBYAL, D.S. SHARMA, V.K. Screening of free-living animal and birds for *Listeria*, *Brucella*, and *Salmonella* infections. **British Veterinary Journal**. v.128, p.50-55, 1972.

- SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; PONTES, A.P.; FLORES, M.L.; FORELL, F.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Protocolos para extração de DNA de *Salmonella*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. v.27, n.2, p.93-101, 1999.
- SCHIMIDT, R.E. Psittacine birds as reservoirs of serious diseases. In: FOWLER, M.E. **Zoo & wild animal medicine: current therapy 3**. Colorado: Saunders Company, 1993. p.244-247.
- SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p.351-382, 1997.
- SNOEYENBOS, G.H.; WILLIAMS, J.E. Salmonellosis: introduction. In: CALNEK, B.W. **Diseases of Poultry**. 9.ed. Iowa: Iowa State University Press, 1991. p.72-73.
- SOUMET, C., ERMEL, G., ROSE, N., ROSE, V., DROUIN, P., SALVAT, G., COLIN, P. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology**, n.28, p.113-117, 1999.
- SPENCER, E.L. Common infectious diseases of Psittacine birds seen in practice. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v.21, p.1213-1230, 1991.
- STONE, G.G.; OBERST, R.D. HAYS, M.P.; McVEY, S.; CHENGAPPA, M.M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**. v.32, n.7, p.1742-1749, 1994.
- TAUNI, M.A.; ÖSTERLUND, A. Outbreak of *Salmonella typhimurium* in cats and humans associated with infection in wild birds. **Journal of Small Animal Practice**. v.41, n.8, p.339-410, 2000.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** **24**, 4876-4882, 1997.
- TUCHILI, L.M.; KODAMA, H.; IZUMOTO, Y.; MUKAMOTO, M.; FUCATA, T.; BABA, T. Detection of *Salmonella* Gallinarum and *S. Typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.1, n.57, p.59-63, 1995.
- VARNAN, A.H.; EVANS, M.G. Salmonella. In: Foodborne pathogens an illustrated text. Aylesbury, Wolfe, Cap.4, 1991. p.51-85.
- VILLA, M.F.G. Programa Nacional de Sanidade Avícola: 1994 a 1998. In: CONFERÊNCIA APINCO, 1998, Campinas. **Anais**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1998. p.33-45.
- VILELA, V.O.; GUEDES, N.M.R.; ARAÚJO, F.R.; SOLARI, C.A.; FILIÚ, W.F.O.; CATELAN, V.L.; ALVES, M.M.; CARMO, M.A.; SOUZA, R.A.; VARGAS, F.C. *Salmonella* Bredney em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). In: IX CONGRESSO

BRASILEIRO DE ORNITOLOGIA. 2001, Curitiba-Paraná. **Ornitologia sem Fronteiras**. Curitiba: Museu de História Natural, 2001. p.390-391.

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRna sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**. n.345, p.63-67, 1990.

WILSON, J.E.; MACDONALD, J.W. Salmonella infection in wild birds. **British Veterinary Journal**. v.123, n.5, p.212-219, 1967.

ZWART, P. Bacterial diseases. In: SAMOUR, J. **Avian medicine**. London: Harcourt Publishers, 2000. p.252-264.