UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária

Dissertação

Detecção de *Salmonella* sp. em aves silvestres cativas e avaliação do impacto sobre a avicultura

Patrícia Gaspar da Luz

Pelotas, 2012

PATRÍCIA GASPAR DA LUZ

Detecção de *Salmonella* sp. em aves silvestres cativas e avaliação do impacto sobre a avicultura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto D' Ávila Vargas

Co-orientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

L979d **Luz, Patrícia Gaspar da**

Detecção de Salmonella sp. em aves silvestres cativas e avaliação do impacto sobre a avicultura / Patrícia Gaspar da Luz. – Pelotas, 2012. – 43f. : il. color. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Veterinária preventiva. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2012. - Orientador Gilberto D' Ávila Vargas ; co-orientador Geferson Fischer.

1.Veterinária. 2.*Salmonella* sp. 3.Retroisolamento. 4.Diagnóstico. 5.Sorologia. 6.Avicultura. I.Vargas, Gilberto D'Ávila. II.Fischer, Gilberto. III.Título.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas- Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer- Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Eliza Simone Viegas Sallis- Universidade Federal de Pelotas

Médica veterinária Dra. Silvia Leal Ladeira- Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Silvia de Oliveira Hübner- Universidade Federal de Pelotas (Suplente)

Dedico este trabalho aos meus
pais, pelo amor e apoio
incondicionais.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço aos meus pais, pela dedicação, por todo o investimento e apoio para que eu chegasse até aqui, e pelos ótimos exemplos que foram e são para mim, de caráter e honestidade; também agradeço aos animais em geral, eles também me fizeram chegar até aqui, foram fontes de estudo para o meu projeto, e são também fonte de inspiração na minha vida.

À equipe do Laboratório de Virologia e Imunologia, pelos bons momentos, pelo ótimo senso de humor e por todo o aprendizado; em especial ao meu orientador, Gilberto D'Ávila Vargas, pela dedicação, incentivo e pelos ensinamentos.

À médica veterinária Silvia Ladeira, do Laboratório Regional de Diagnósticos, pela dedicação, paciência e disposição em me auxiliar sempre.

A todos que conviveram comigo nesses dois anos, às minhas amigas que estiveram sempre me apoiando tanto nas horas boas, quanto nas ruins, algumas à distância, mas em pensamento, sempre presentes.

Resumo

LUZ, Patrícia Gaspar da. **Detecção de *Salmonella* sp. em aves silvestres cativas e avaliação do impacto sobre a avicultura.** 2012. 43 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Salmonelose é um termo utilizado para designar doenças causadas por bactérias do gênero *Salmonella* sp., que tem ampla disseminação no meio avícola, e grande interligação com as aves silvestres, que atuam como reservatórios. A *Salmonella* sp. é representante da família das enterobactérias, sendo normalmente associada a infecções dentro de aviários e toxinfecções alimentares humanas. Pode, principalmente nas aves silvestres, se apresentar de forma assintomática, o que confere a estes animais o estado de portadores e disseminadores no ambiente. O presente trabalho teve como finalidade detectar aves silvestres portadoras do agente, além de, através de inoculação *in vivo* da cepa encontrada, realizar o retroisolamento, pesquisando assim os efeitos causados nas aves de produção e avaliando seu impacto sobre a avicultura. O material biológico coletado das aves silvestres foi oriundo de suabe cloacal, totalizando 121 amostras provenientes de onze diferentes ordens, as quais foram processadas mediante o isolamento. Das 121 amostras, somente uma foi positiva, isolada na espécie pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), sendo então inoculada em pintos (*Gallus gallus*) com um dia de vida, os quais foram desafiados e observados por 12 dias. No total foram utilizados como modelo biológico 21 pintos, distribuidos em 3 grupos, sendo um controle positivo (inoculado com uma amostra conhecida de *Salmonella*), um controle negativo (inoculado com solução salina) e um desafiado com a cepa de campo isolada e identificada como *Salmonella* sp. Após o período de observação, foi realizado o sacrifício das aves com sangria total, quando foram coletadas amostras sanguíneas para sorologia, e na necropsia, foi coletado material biológico do fígado, duodeno, jejuno e ceco para diagnóstico bacteriológico, além de histopatológico. No diagnóstico bacteriológico foram encontrados perfis bioquímicos compatíveis com a bactéria em questão, tanto no grupo controle positivo quanto no grupo que foi desafiado com a cepa de campo. Após foi confirmado o retroisolamento através da técnica de Identificação Sorológica, na qual houve reação de aglutinação do soro padrão com o antígeno retroisolado proveniente destes dois grupos de aves. No exame histopatológico foram observadas lesões nos órgãos estudados causadas pela bactéria *Samonella* sp. tanto no grupo controle positivo quanto no grupo inoculado com a cepa isolada. Foi possível também detectar a presença de anticorpos anti *Salmonella* sp. ao final do período experimental nos dois grupos de aves onde a bactéria foi retroisolada. Dessa forma, mesmo com o baixo isolamento da bactéria nas espécies de aves silvestres estudadas existe a possibilidade de transmissão de *Salmonella* sp. para aves de produção, proveniente de cepas de

aves selvagens marinhas, e seu potencial em causar enfermidade, e consequentemente prejuízos no ambiente avícola.

Palavras-chave: *Salmonella* sp. Retroisolamento. Diagnóstico. Sorologia.

Abstract

LUZ, Patrícia Gaspar da. **Detection of *Salmonella* sp. in captive wild birds and evaluation of the impact on the aviculture.** 2012. 43 p Master Dissertation. Post Graduation Program in Veterinary. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Salmonelosis is a term to designate patologies caused by the *Salmonella* genus, which has an extensive dissemination in the poultry environment and a large interconnection with wild birds, which act as reservoirs. *Salmonella* sp. is representative of the Enterobacteria's family, being usually associated with infections on aviary, and human food poisoning. It can, mainly in wild birds, present as asymptomatic form, which give to these animals the status of carrier and diffuser in the environment. The present research had the purpose to detect wild bird carriers of the agent, also by inoculation of the found strain *in vivo*, realize the retro isolation, so researching the effects caused on poultry production and evaluating its impact over the aviculture. The biological material that had been collected of the wild birds was derived of cloacal swabs, totalizing 121 samples of eleven different groups, which were processed by isolation. Only one from the 121 samples was positive, isolated in a Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus),* then was inoculated in chicks (*Gallus gallus*) with one day of age, which were challenged and watched for 12 days. In total 21 chicks were used as biological model, distributed in 3 groups, one positive control (inoculated with a known sample of Salmonella), one negative control (inoculated with saline solution), and one challenged with the strain field found and identified as *Salmonella* sp. After the observation period, was executed the sacrifice of the birds by full bleed, when were collected blood samples for serology, and the necropsy with collect of biological material of liver, duodenum, jejunum and cecum for bacteriological diagnosis, also histopathological. In the bacteriological diagnosis were found biochemical profiles compatibles with the bacteria in question both in the positive control group and in the group which was challenged with the strain field. After, the retro isolation was confirmed by the serological identification technique, in which there was an agglutination reaction of the standard serum with the retro isolated antigen from these two groups of birds. In the histopathology lesions caused by *Salmonella* sp. were observed in the studied organs, both in the positive control group and in the challenged group. Also it was possible to detect the presence of anti *Salmonella* sp. antibodies in the end of the experimental period in both groups of birds where was retro isolated the bacteria. So, even with the low isolation of the bacteria in the species of wild birds studied, there is the possibility of transmission of *Salmonella* sp. to poultry production, from strain of wild marine birds, and its potential to cause disease, and consequently, prejudice in the avian environment.

Key words: *Salmonella* sp. Retro isolation. Diagnosis. Serology.

Lista de Figuras

Figura 1 Enterite sanguinolenta em gaiola do grupo desafiado por cepa de ave silvestre..... 33

Figura 2 A: Íleo de *Gallus gallus*: infiltrado inflamatório de heterófilos, linfócitos e macrófagos na lâmina própria (amostra de campo). B: Íleo de *Gallus gallus*: infiltrado inflamatório de heterófilos, linfócitos e macrófagos na lâmina própria (controle positivo)..... 33

Figura 3 A: Ceco de *gallus gallus* com infiltrado inflamatório constituído de linfócitos e macrófagos na lâmina própria e perda do epitélio da superfície das vilosidades (amostra de campo). B: Ceco de *Gallus gallus* com destruição acentuada das vilosidades e infiltrado inflamatório de macrófagos (controle positivo)..... 34

Figura 4 A: Fígado de *Gallus gallus*: área focal de necrose infiltrada por heterófilos e linfócitos, congestão dos sinusóides hepáticos adjacentes (amostra de campo). B: Fígado de *Gallus gallus*: área focal de necrose infiltrada por linfócitos (controle positivo)..... 34

Lista de Tabelas

ARTIGO **Detecção de *Salmonella* sp. em aves silvestres e retroisolamento em pintos: uma avaliação do impacto sobre a avicultura**

Tabela 1 Número de amostras, de acordo com a classificação científica quanto à ordem, e com o local onde se encontravam..... 35

Tabela 2 Espécies estudadas dentro de cada ordem e respectivo número de espécimes..... 35

Sumário

RESUMO..... 5
ABSTRACT..... 7
LISTA DE FIGURAS..... 8
LISTA DE TABELAS..... 9
INTRODUÇÃO..... 11
ARTIGO: DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SP. EM AVES SILVESTRES E RETROISOLAMENTO EM PINTOS: UMA AVALIAÇÃO DO IMPACTO SOBRE A AVICULTURA..... 16
1.Resumo..... 18
2.Introdução..... 19
3.Material e métodos..... 22
3.1. Origem das aves estudadas..... 22
3.2. Coleta e processamento das amostras..... 23
3.3. Provas Bioquímicas..... 23
3.4. Identificação Sorológica..... 24
3.5. Retroisolamento..... 24
3.6. Soroaglutinação Rápida em Placa (SARP)..... 25
4.Resultados..... 25
5.Discussão..... 26
6.Conclusão..... 29
7.Referências..... 30
CONCLUSÕES GERAIS..... 38
REFERÊNCIAS..... 39

1.Introdução

A pesquisa de *Salmonella* sp*.* é bastante utilizada não apenas na indústria de alimentos, no que se refere ao controle de qualidade microbiológica e no monitoramento avícola, mas também atualmente tem sido de grande utilidade no que diz respeito à fauna silvestre, principalmente às aves, tanto em criações comerciais, quanto nos centros de reabilitação e triagem destes animais. Tal fato se deve a importância destes, que atuam como reservatórios do agente, podendo eliminá-lo nos mais diversos ambientes, incluindo o doméstico, onde são criados como pets, bem como o ambiente avícola, onde podem disseminar a *Salmonella* sp., infectando aves destinadas à produção comercial (LOPES, 2008).

O primeiro relato de um cultivo de Salmonella ocorreu em 1884, quando se soube que uma bactéria similar ao sorotipo *S. thypi* estaria causando problemas entéricos em humanos e animais domésticos. Tal fato foi confirmado quando os pesquisadores Salmon e Smith relataram o isolamento da bactéria responsável pela "peste porcina" ou "febre suína" em 1885. Foi então adotado o nome Salmonella em homenagem ao médico veterinário Salmon, que foi o pioneiro nos estudos de identificação e diferenciação de Salmonella (HUMPHREY, 2000).

O micro-organismo *Salmonella* sp*.* é uma bactéria entérica amplamente reconhecida e responsável por graves intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (SHINOHARA et al., 2008). Destacam-se nesse contexto os sorotipos *S. thyphimurium* e *S. enteritidis*, o qual, a partir da década de 1990 passou a ser o mais encontrado nos casos de toxinfecção alimentar humana no Brasil (STERZO et al., 2008). Logo, a Salmonelose é considerada uma das mais importantes zoonoses do mundo, caracterizada pela endemicidade, alta morbidade e a dificuldade na adoção de medidas para seu controle (SHINOHARA et al., 2008). A manifestação mais comum desta enfermidade em saúde pública é gastrointestinal, tendo como sintomatologia dores abdominais, diarréia, pirexia e êmese, sendo os casos fatais mais raros. Sua resolução se dá em aproximadamente 72 horas, sendo fontes alimentos contaminados mal cozidos, como a carne suína, de aves, além de ovos.

A *Salmonella* sp é uma bactéria em forma de bacilo gram negativo com flagelos peritriquiais, sendo móveis, com exceção dos sorotipos *S. gallinarum* e *S. pullorum*, e pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (HIRSH, 2003). Costuma crescer em temperatura ideal de 37ºC, pH próximo a 7, e em meios de cultura próprios para enterobactérias, como o ágar verde brilhante e o ágar MacConkey (NETO, 2008). Existem, atualmente, mais de 2.300 diferentes sorovares no gênero *Salmonella*, produzindo diferentes enfermidades identificadas a partir de um grande número de hospedeiros distribuídos pelo mundo (LABACVET, 2007), e cada variante desses sorovares é capaz de produzir alterações do trato gastrointestinal e septicemia (HIRSH, 2003). Sua patogenicidade está diretamente ligada ao lipopolissacarídeo de membrana (LPS), sendo este o responsável pela ligação com os macrófagos e sensibilidade ao complemento, tendo também ação tóxica (STERZO et al., 2008). De acordo com o sistema de classificação de *Kauffman-White,* a definição da espécie, em parte, se dá pela composição antigênica destes lipopolissacarídeos (LPS), e os tipos de açúcares existentes entre eles caracterizam os determinantes antigênicos (O), que associados aos antígenos flagelares (H) definem sorologicamente o micro-organismo quanto à espécie (HIRSH,2003).

O trato intestinal de vertebrados em geral é o local colonizado pela *Salmonella* sp*.,* cuja eliminação é responsável pela contaminação do ambiente (GOPEE et al.,2000)*,* e cuja transmissão ocorre principalmente por via fecal-oral. Fontes de contaminação incluem solo contaminado, vegetação, água e componentes de rações animais (HIRSH, 2003).

Em aves silvestres a infecção por *Salmonella* sp. é conhecida, no entanto sua significância em causar mortalidade dessas aves e seu potencial zoonótico ainda não estão bem esclarecidos (HALL et al., 2008). Nelas as bactérias gram negativas são consideradas as mais patogênicas (CUBAS, 2004). Tais aves assumem um papel importante na disseminação, não apenas desse agente, mas também de outros patógenos, uma vez que são normalmente animais de vida livre, incluindo as aves migratórias (HUBALEK, 2004), e podem ter contato direto com animais domésticos e com o homem, proximidade que propicia a transmissão (GOPEE et al., 2000). Dentre as infecções bacterianas transmitidas indiretamente a humanos e animais domésticos por aves silvestres, a *Salmonella* sp*.* é um agente que recebe destaque, juntamente com a bactéria *Escherichia coli* (TISIODRAS et al., 2008),

podendo especialmente a *Salmonella* entérica sorotipo *Typhimurium* ser encontrada no trato intestinal dessas aves (TIZARD, 2004). Acredita-se que isto seja decorrente do transporte sem o controle sanitário correto, visto que o tráfico desses animais vem crescendo, tendo como maiores vítimas as aves da ordem dos passeriformes (PADRONE, 2004). Estas acabam atuando como importantes disseminadores, uma vez que se tornam portadores do agente. Portanto, é indicado que aves destinadas a programas de soltura e reintrodução ao ambiente natural, bem como aves de produção, sejam avaliadas quanto à presença deste agente (CUBAS, 2004). Podem servir como reservatórios, além das aves silvestres, também mamíferos e répteis, nos quais a *Salmonella* sp. já foi isolada (GOPEE et al., 2000).

Todas as espécies de aves silvestres são consideradas suscetíveis à infecção, porém isso pode depender da idade do hospedeiro, condições de estresse, nutrição, além da virulência do agente (HALL et al., 2008). Quanto ao desenvolvimento da doença, segundo Cubas (2004), as aves que apresentam ausência ou involução de ceco são classificadas como mais suscetíveis que as que possuem o órgão funcional, o que seria causado pelo fato de determinadas bactérias competirem com a *Salmonella* sp. no ceco, alterando seu pH.

No presente estudo, foram coletadas amostras de espécies das ordens Passeriformes, Anseriformes, Sphenisciformes, Piciformes, Cuculiformes, Psittaciformes, Strigiformes, Ciconiiformes, Falconiformes, Charadriiformes e Procellariformes. Tais ordens compreendem espécies bastante suscetíveis à contaminação por *Salmonella* sp. De acordo com Tizard (2004) aves carnívoras, como os falconiformes, tem sua infecção associada à ingestão de mamíferos, ou pequenas aves utilizadas como presas vivas para alimentação, como pombos. Nestes, a infecção é assintomática. No caso dos passeriformes, a contaminação é considerada importante, no entanto, em se tratando de surtos de Salmonelose, pode ser afetado não apenas um grande número de exemplares dessas espécies, como também seus predadores, outros animais domésticos, além de humanos. Ainda, de acordo com Silva et al. (2010), aves da ordem Ciconiiformes, que compreende garças, urubus e savacus, por sua facilidade de adaptação ao meio antrópico, são importantes carreadores de *Salmonella* sp., tendo amplo contato com aves e outros animais domésticos. Já os pscitacídeos, como afirma Cubas et al. (2004) são

bastante sensíveis à infecção, ocorrendo mortalidade nessas aves, podendo haver em um mesmo hospedeiro cepas virulentas e não virulentas, simultaneamente.

A enfermidade, quando apresentada na forma aguda, em aves silvestres, acarreta sinais inespecíficos, destacando-se a enterite no trato gastrointestinal,além de respiratório, nervoso, ocular, podendo também, em alguns casos, ocorrer septicemia e morte súbita. Já nos casos crônicos, pode haver pericardite fibrinosa, formação de granuloma hepático, esplênico e renal, além de processo inflamatório testicular e ovariano (CUBAS, 2004).

A infecção por *Salmonella* sp. em aves domésticas é um sério problema, uma vez que, instalado o agente dentro de um aviário, este pode causar perdas econômicas irreparáveis, devido a sua acelerada disseminação no ambiente e difícil controle. Os sorotipos de importância para a avicultura industrial são *Salmonella pullorum*, cuja enfermidade causada é a Pulorose, uma doença aguda que acomete principalmente aves jovens, sendo normalmente fatal; e *Salmonella gallinarum*, causador de Tifo Aviário, que atinge principalmente aves adultas (STERZO, 2008).

No que diz respeito à epidemiologia, a transmissão pode ocorrer verticalmente, via ovo, produzindo pintos infectados, além da via horizontal, através da ração e água, sendo de rápida disseminação e difícil resolução (STERZO, 2008).

Entre as técnicas para detecção do microorganismo, se destaca o isolamento microbiológico, sendo este o de escolha (LOPES, 2008). Segundo alguns autores, o êxito na execução deste isolamento está na rapidez desde a coleta até o processamento no laboratório, impedindo e minimizando assim o crescimento de flora de associação que possa prejudicar o diagnóstico (MOREIRA, 2002). Entre os meios de cultivo mais utilizados estão o caldo Rappaport como meio de transporte e o ágar MacConkey como meio seletivo para detecção, isolamento e enumeração de *Salmonella* sp.

Em relação às propriedades e perfis bioquímicos as salmonellas metabolizam nutrientes, catabolizando glicose ou outros carboidratos, exceto lactose, gerando assim reações alcalinas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (SILVA et al., 2010), e sacarose, produzindo gás a partir disso (ROSSI, 2005). São também catalase positiva e oxidase negativa como todas as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae.* Além disso, não hidrolisam a uréia, não produzem indol, utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito, podendo também

produzir ácido sulfídrico (H_2S) através da fermentação da glicose (ROSSI, 2005; SILVA et al., 2010). Dessa forma pode ser obtido um perfil com caracterização bioquímica, o que deve ser confirmado através da identificação sorológica com a detecção de antígenos somáticos (O) mediante o uso de soros polivalentes.

Uma outra forma de detecção de possíveis aves positivas para a *Salmonella* sp. é a utilização da técnica de Soroaglutinação Rápida em Placa (SARP), a qual é um teste de triagem que emprega um antígeno padrão corado que é capaz de detectar imunoglobulinas M e G presentes no soro de animais suspeitos, sendo IgM a principal. Trata-se de um teste qualitativo, portanto determina a positividade e negatividade de animais (MOREIRA, 2002). Logo, apesar da larga utilização do teste de SARP na triagem das aves, o achado de aves reatoras não pode ser interpretado como infecção, sendo sempre recomendada a cultura bacteriológica.

O objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência e detectar a presença de *Salmonella* sp. em aves silvestres cativas em centros de reabilitação e criadouro no estado do Rio Grande do Sul, avaliando a atuação das cepas encontradas, através do retroisolamento, sobre as aves de produção, e seu impacto sobre a avicultura.

ARTIGO:

DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SP. EM AVES SILVESTRES E RETROISOLAMENTO EM PINTOS: UMA AVALIAÇÃO DO IMPACTO SOBRE A AVICULTURA

Formatado de acordo com a revista Veterinary Microbiology

Detecção de *Salmonella* sp.em aves silvestres e retroisolamento em pintos: uma avaliação do impacto sobre a avicultura

Patrícia G. da Luz[1;] Silvia L. Ladeira[2;] Eliza S. V. Sallis[3;] Silvia de O. Hübner[1]; Geferson Fischer[1]; Ana Paula N. Albano[4;] Rodolfo P. da S. Filho[5]; Gilberto D. Vargas[1]

[1] *Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas - UFPel - CP 354 - 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

[2] *Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

[3] *Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

[4] *Núcleo de Reabilitação de Fauna Silvestre- NURFS, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas- UFPel- CP 354 – 96010- 900 – Pelotas- RS – Brasil;*

[5] *Centro de Reabilitação de Animais Marinhos- CRAM, Fundação Universidade Federal do Rio Grande- FURG- CP 379 - 96200- 970- Rio Grande-RS- Brasil;*

1.Resumo [**Detecção de *Salmonella* sp.em aves silvestres e retroisolamento em pintos: uma avaliação do impacto sobre a avicultura]**

Salmonelose é um termo utilizado para designar doenças causadas por bactérias do gênero *Salmonella* sp., que tem ampla disseminação no meio avícola, e grande interligação com as aves silvestres, que atuam como reservatórios. A *Salmonella* sp. é representante da família das enterobactérias, sendo normalmente associada a infecções dentro de aviários e toxinfecções alimentares humanas. Pode, principalmente nas aves silvestres, se apresentar de forma assintomática, o que confere a estes animais o estado de portadores e disseminadores no ambiente. O presente trabalho teve como finalidade detectar aves silvestres portadoras do agente, além de, através de inoculação *in vivo* da cepa encontrada, realizar o retroisolamento, pesquisando assim os efeitos causados nas aves de produção e avaliando seu impacto sobre a avicultura. O material biológico coletado das aves silvestres foi oriundo de suabe cloacal, totalizando 121 amostras provenientes de onze diferentes ordens, as quais foram processadas mediante o isolamento. Das 121 amostras, somente uma foi positiva, isolada na espécie pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), sendo então inoculada em pintos (*Gallus gallus*) com um dia de vida, os quais foram desafiados e observados por 12 dias. No total foram utilizados como modelo biológico 21 pintos, distribuidos em 3 grupos, sendo um controle positivo (inoculado com uma amostra conhecida de *Salmonella*), um controle negativo (inoculado com solução salina) e um desafiado com a cepa de campo isolada e identificada como *Salmonella* sp. Após o período de observação, foi realizado o sacrifício das aves com sangria total, quando foram coletadas amostras sanguíneas para sorologia, e na necropsia, foi coletado material biológico do fígado, duodeno, jejuno e ceco para diagnóstico bacteriológico, além de histopatológico. No diagnóstico bacteriológico foram encontrados perfis bioquímicos compatíveis com a bactéria em questão, tanto no grupo controle positivo quanto no grupo que foi desafiado com a cepa de campo. Após foi confirmado o retroisolamento através da técnica de Identificação Sorológica, na qual houve reação de aglutinação do soro padrão com o antígeno retroisolado proveniente destes dois grupos de aves. No exame histopatológico foram observadas lesões nos órgãos estudados causadas pela bactéria *Samonella* sp. tanto no grupo controle positivo quanto no grupo inoculado com a cepa isolada. Foi possível também detectar a presença de anticorpos anti *Salmonella* sp. ao final do período experimental nos dois grupos de aves onde a bactéria foi retroisolada. Dessa forma, mesmo com o baixo isolamento da bactéria nas espécies de aves silvestres estudadas existe a possibilidade de transmissão de *Salmonella* sp. para aves de produção, proveniente de cepas de aves selvagens marinhas, e seu potencial em causar enfermidade, e consequentemente prejuízos no ambiente avícola.

Palavras-chave: *Salmonella* sp. Retroisolamento. Diagnóstico. Sorologia.

2. Introdução

Atualmente no Brasil, mesmo sendo proibido por lei (Lei Nº 5.197, de 3 de janeiro de 1.967 IBAMA), existe um aumento do número de pessoas criando em suas casas répteis, aves e mamíferos silvestres, principalmente em grandes centros urbanos. Assim, é uma situação bastante comum estes animais silvestres e exóticos serem encaminhados às clínicas veterinárias, zoológicos, centros de triagem, expondo os profissionais e tratadores a um possível risco de contrair zoonoses (PADRONE, 2004).

Tem sido amplamente discutida a ocorrência de infecções importantes no que diz respeito à fauna silvestre em geral, sendo este um campo que vem atingindo grande crescimento. Em relação às aves, existe grande preocupação, entre outras enfermidades, com a Salmonelose, causada pela bactéria *Salmonella* sp. Quando se trata desse assunto, nessa classe de animais, é importante salientar que as bactérias Gram negativas são consideradas as mais patogênicas (CUBAS, 2004), e que as aves silvestres tem um papel importante na disseminação, não apenas da *Salmonella* sp., mas também de outros patógenos, uma vez que são normalmente animais de vida livre, incluindo neste contexto as aves migratórias (HUBALEK, 2004).

Podem ocorrer três enfermidades distintas em aves: a pulorose, cujo agente é a *Salmonella pullorum*; o tifo aviário, causado pela *Salmonella gallinarum;* e o paratifo aviário, causado por qualquer outra *Salmonella* sp. que não seja a *S. pullorum* ou *S. gallinarum*. Os sorotipos de importância para a avicultura industrial são *Salmonella pullorum*, cuja enfermidade é aguda e acomete principalmente aves jovens, sendo normalmente fatal; e *Salmonella gallinarum*, que atinge principalmente aves adultas (STERZO, 2008).

A *Salmonella* sp é uma bactéria em forma de bacilo gram negativo com flagelos peritriquiais móveis, com exceção dos sorotipos *S. gallinarum* e *S. pullorum*, e pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Costuma crescer em temperatura de 34 a 39ºC, sendo a ótima de 37ºC, pH ideal 7, e em meios de cultura próprios para enterobactérias, como o ágar verde brilhante e o ágar de MacConkey (HIRSH, 2003). Tem sua patogenicidade diretamente ligada aos lipopolissacarídeos de

membrana (LPS), sendo estes os responsáveis pela ligação com os macrófagos e sensibilidade ao complemento e ação tóxica (STERZO et al., 2008).

De acordo com o sistema de classificação de *Kauffman-White,* a definição da espécie, em parte, se dá pela composição antigênica dos lipopolissacarídeos (LPS), e os tipos de açúcares existentes entre eles caracterizam os determinantes antigênicos (O), que associados aos antígenos flagelares (H) definem sorologicamente o micro-organismo quanto à espécie. Assim, são reconhecidos atualmente aproximadamente 2.541 sorovares, dentre os quais 2.519 pertencem à espécie *Salmonella enterica*, e são considerados como potencialmente patogênicos tanto para o homem como para animais (HIRSH, 2003; LOUREIRO, 2007). Além da patogenicidade do agente, fatores como estado nutricional e sistema imunológico do hospedeiro podem contribuir para o desenvolvimento da doença.

Em relação à transmissão, materiais biológicos como fezes de origem humana e animal são veículos de propagação, além da água e alimentos, como a ração em ambientes avícolas. É um problema para a saúde pública, sendo fontes os alimentos contaminados mal cozidos, como a carne suína, de aves, além de ovos e água contaminada. Neste contexto, destaca-se a *Salmonella enteritidis,* que a partir da década de 1990 no Brasil, passou a ser a mais identificada nas toxinfecções alimentares humanas (STERZO et al., 2008).

As aves silvestres podem atuar como reservatórios de *Salmonella* sp. sendo portadores assintomáticos responsáveis por sua disseminação tanto em ambientes domésticos quanto em ambientes avícolas continuamente pelas fezes. Assim, todas as espécies de aves silvestres são consideradas suscetíveis à infecção, podendo ou não desenvolver a doença (HALL et al., 2008). De acordo com Cubas (2004), as aves que apresentam ausência ou involução de ceco são classificadas como mais suscetíveis que as que possuem o órgão funcional, o que seria causado pelo fato de determinadas bactérias competirem com a *Salmonella* sp. no ceco alterando seu pH.

A salmonelose, quando apresentada de forma aguda em aves silvestres, acarreta sinais inespecíficos de trato gastrointestinal, destacando-se a enterite, respiratório, nervoso, ocular, podendo também, em alguns casos, ocorrer septicemia e morte súbita. Já nos casos crônicos, pode haver pericardite fibrinosa, formação de granuloma hepático, esplênico e renal, além de processo inflamatório testicular e ovariano (CUBAS, 2004).

Na cadeia de produção de aves o grande problema da enfermidade é que geralmente é fatal e acarreta sérios prejuízos econômicos, uma vez instalada dentro de um aviário. Nesses casos destaca-se a transmissão vertical via ovo, a qual acarreta o nascimento de pintos infectados. Também ocorre a transmissão horizontal com contaminação do ambiente e ração. As medidas mais utilizadas para controle e prevenção incluem biosseguridade, como limpeza e desinfecção de galpões com produtos químicos, controle de roedores que podem ser carreadores do patógeno, aquisição de aves, ração e matérias-primas livres de *Salmonella,* uso de ácidos orgânicos, peletização da ração, além de imunização com vacinas (STERZO et al., 2008).

A técnica de diagnóstico padrão é o isolamento bacteriológico, que se baseia na evidenciação das propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas. Assim, é feita a cultura do material biológico, estando entre os meios de cultivo mais utilizados o caldo Rappaport como meio de transporte e o ágar MacConkey como meio seletivo para detecção, isolamento e enumeração de *Salmonella* sp. (MAPA, 2003). Este procedimento é baseado na utilização de meios que contêm substâncias que impedem o crescimento da maioria dos micro-organismos interferentes e na incubação em temperatura seletiva.

Como propriedades bioquímicas destacam- se a catabolização de glicose e outros carboidratos, exceto lactose gerando assim reações alcalinas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (SILVA et al., 2010), e sacarose, produzindo gás (ROSSI, 2005). As salmonelas são também catalase positiva e oxidase negativa como todas as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae.* Além disso, não hidrolisam a uréia, não produzem indol, utilizam citrato como fonte de carbono, reduzem nitrato a nitrito, podendo também produzir ácido sulfídrico (H_2S) (ROSSI, 2005; SILVA et al., 2010). Dessa forma pode ser obtido um perfil com caracterização bioquímica, e posteriormente a confirmação do agente, sendo esta feita através da pesquisa sorológica do teste de soroaglutinação, o qual se baseia na reação antígeno-anticorpo, com consequente aglutinação do antígeno frente ao anti-soro para *Salmonella* polivalente “O” (MAPA, 2003).

A finalidade do presente trabalho foi detectar em aves silvestres a bactéria *Salmonella* sp*.,* realizando posteriormente a inoculação do patógeno em pintos com um dia de vida, para observação de possível sintomatologia, alterações

anatomopatológicas, produção de anticorpos, e retroisolamento do agente, desta forma analisando os impactos que pode causar uma cepa selvagem em uma ave doméstica, como sinais clínicos e patológicos.

3.Material e métodos

3.1.Origem das aves silvestres

Para a execução deste trabalho, foram coletadas aleatoriamente amostras de aves de diferentes espécies, abrangendo as seguintes ordens: Passeriformes, Anseriformes, Sphenisciformes, Piciformes, Cuculiformes, Psittaciformes, Strigiformes, Ciconiiformes, Falconiformes, Charadriiformes e Procellariformes, totalizando 121 amostras (Tabela 1). Estas aves se encontravam em cativeiro, sendo que a maioria em período de quarentena ou reabilitação, logo, tendo sido apreendidos por comércio ilegal e maus tratos. Outra parcela, referente às aves marinhas, tratava-se de animais debilitados encontrados na costa brasileira, a maior parte atingida por derrames de óleo, estando estes também em período de reabilitação.

Em relação às espécies, todas as aves terrestres que tiveram seu material biológico coletado são aves residentes do Rio Grande do Sul, podendo ser observadas em praticamente todas as regiões do Estado. Algumas ordens encontradas tiveram grande variedade de espécies, o que pode ser observado na tabela 2, bem como o número de espécimes. As aves marinhas que foram estudadas têm sua distribuição entre Chile e Argentina, porém ocorrem em algumas partes da costa brasileira, passando por programas de monitoramento, mas principalmente no litoral do Rio Grande do Sul, durante os meses de inverno em busca de alimentação.

Os locais onde se encontravam as aves foram o Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CRAM) da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Núcleo de Reabilitação de Animais Silvestres (NURFS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e Criadouro Conservacionista São Braz (CCSB), de propriedade privada, localizado no município de Santa Maria, estando todos estes registrados junto ao

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e situados no estado do Rio Grande do Sul.

3.2.Coleta e processamento das amostras

As amostras foram obtidas através de suabes cloacais estéreis, que no momento da coleta foram rotacionados por aproximadamente 20-30 segundos, com a finalidade de estabelecer um maior contato com a mucosa do trato intestinal. Posteriormente, essas amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo 3ml do meio de transporte e enriquecimento caldo tetrationato (Acumedia manufacturers, Inc. Baltimore, Maryland 21220) para então serem enviadas ao Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) no setor de bacteriologia. Lá, permaneceram em estufa por 24-48h, a 37ºC. Este meio utilizado para o transporte e enriquecimento de *Salmonella* sp., foi mantido refrigerado até o momento da coleta, entre 2-8ºC, segundo metodologia conhecida (MAPA, 2003).

A etapa posterior ao enriquecimento, no meio caldo tetrationato, se deu com as provas microbiológicas clássicas, tendo sido feita a semeadura em duplicata das amostras em placas de Petri contendo meio ágar MacConkey (Acumedia, Neogen Lansing, Michigan 48912). A incubação foi realizada em estufa por 48 horas a 37ºC. Dessa forma, neste meio seletivo, observou-se como resultado o crescimento de colônias incolores não fermentadoras de lactose, compatíveis com espécies de Salmonella. Após, estas colônias foram caracterizadas bioquimicamente.

3.3.Provas bioquímicas

Para a caracterização bioquímica foram utilizados os seguintes meios: uréia, Triplo açúcar e ferro (TSI), citrato, lactose, maltose, manitol, meio de SIM e Voges ProsKauer.

3.4 Identificação Sorológica

As colônias com comportamento bioquímico do gênero Salmonella foram submetidas à prova de detecção de antígenos somáticos (O) mediante o uso de soros polivalentes anti-O (Laoratório Probac - Brasil).

3.5.Retroisolamento

Para realizar o retroisolamento de *Salmonella* sp. foi utilizada a cepa positiva isolada de aves silvestres. Como modelo biológico foram utilizados pintos com um dia de vida, divididos em três grupos, com sete animais cada: controle positivo, controle negativo e grupo desafiado. Estes animais foram obtidos na Cooperativa Sul-Riograndense de Laticínios, localizada no município de Morro Redondo-RS sendo oriundos de matrizes da linhagem Coob com 36 semanas de vida, não vacinadas e negativas para *Salmonella* sp. Para o inoculo foi preparado 0,5 ml de suspensão da bactéria em solução salina na escala 3 de Mc Farland (concentração de 10^8 UFC/ml). A contagem de colônias viáveis foi feita através da técnica de "surface plate" (Clinical Bacteriology, A manual of tests and procedures, 1972). No grupo controle positivo foi utilizada uma cepa positiva conhecida de *Salmonella typhimurium* (GN Test Kit VTK 2. Vitek®) e no grupo controle negativo foi inoculada apenas solução salina.

A inoculação foi feita através de sonda com acesso através do esôfago, a partir de então as aves foram observadas por 12 dias, recebendo água e ração à vontade durante esse período, sendo que no último dia foi executado sacrifício dos três grupos (sangria total) e necropsia para colheita de sangue para pesquisa sorológica, suabes e fragmentos de duodeno, jejuno, íleo, ceco e fígado, para pesquisa bacteriológica e estudo histopatológico. É importante enfatizar que antes da inoculação foram coletadas amostras de suabe cloacal de todos os animais envolvidos para certificar a negatividade para *Salmonella* sp.

3.6.Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR)

A prova de soroaglutinação rápida (SAR) em placa foi realizada segundo a Instrução Normativa 78 do Programa Nacional de Sanidade Avícola. Para tanto, foi utilizado 25 µL de soro sanguíneo, dispensado em placa. A seguir, 25 µL de antígeno corado específico foi adicionado ao soro. O antígeno e o soro foram misturados com o auxílio de bastão de vidro com movimentos circulares até a formação de um círculo de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro por 2 minutos. A temperatura ambiente foi superior a 20°C. Além desta análise com o soro bruto foram realizadas duas diluições do soro (1:5 e 1:10) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS pH 7,2). Para a detecção de anticorpos contra *Salmonella* sp foi utilizado o antígeno Pulor Teste® (Laboratório Biovet, Brasil).

4.Resultados

De acordo com a primeira etapa do estudo, que consistiu na coleta de amostras e tentativa de isolamento de *Salmonella* sp. de aves silvestres cativas ou em período de reabilitação, das 121 amostras analisadas, houve diagnóstico bacteriológico positivo para uma, isolada da espécie *Spheniscus magellanicus* (pinguim-de-Magalhães) a qual foi inoculada posteriormente em pintos de um dia de vida para a tentativa de retroisolamento do agente.

Foi isolada a bactéria em questão em amostras de suabe de intestino e fígado tanto dos animais pertencentes ao grupo controle positivo quanto aqueles do grupo desafiado, o que foi comprovado pelos padrões bioquímicos e pela identificação sorológica. Já das amostras provenientes do grupo controle negativo não foi possível retroisolar a bactéria.

Após o processo de inoculação, os animais do grupo controle negativo não apresentaram qualquer sintomatologia clínica, lesão de necropsia,e nem mesmo produção de anticorpos anti Samonella como já era esperado. Já aqueles dos grupos controle positivo e desafiado tiveram enterite sanguinolenta observada nos dias 5, 7 e 10 (Figura 1).

Lesões histológicas foram observadas no duodeno, jejuno, íleo, ceco e no fígado, similares tanto nas aves do grupo controle positivo como no desafiado (Figura 2 A e B). No duodeno, jejuno e íleo houve infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares de distribuição difusa na mucosa e de intensidade discreta à moderada. No íleo também, observou-se infiltrado moderado de heterófilos na lâmina própria, tanto nas amostras do grupo desafiado como no controle positivo. No duodeno e jejuno, verificou-se áreas com destruição de vilosidades e adjacentes à essas áreas e hiperplasia das criptas intestinais.

No ceco, as lesões foram mais pronunciadas, consistindo de infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos, difuso na mucosa e submucosa, verificando-se ainda, áreas com perda do epitélio da superfície das vilosidades, nas amostras do grupo desafiado e, no controle positivo, além de destruição acentuada das vilosidades (Figura 3 A e B).

Nos fígados (tanto das amostras do grupo desafiado como controle positivo) houve áreas multifocais de necrose dos hepatócitos associadas a infiltrado inflamatório de linfócitos e, em menor número, infiltrado de heterófilos, com severidade leve e/ou moderada. Adjacente a essas áreas de hepatite necrosante os sinusóides apresentavam-se congestos (Figura 4).

Na Sorologia Rápida em Placa (SAR) realizada no final do período experimental foi confirmada, tanto no grupo controle positivo quanto no grupo de animais desafiados a presença de anticorpos anti *Salmonella* sp.

5. Discussão

De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, houve apenas um isolamento de *Salmonella* sp num total de 121 amostras coletadas. Tal bactéria foi isolada da espécie *Spheniscus magellanicus* (pinguim-de-Magalhães). Segundo Cubas et al. (2004) esta bactéria que normalmente não era encontrada em ambiente marinho, tem sua detecção explicada pela poluição das orlas com dejetos humanos ou de animais, disseminando assim o agente. Portanto, a presença de *Salmonella* sp. em uma ave marinha como o pingüim-de-Magalhães, vem a comprovar que, animais que já sofrem com outros problemas como derrame de óleo, e poluição dos

mares com os mais variados tipos de dejetos, podem ser acometidos por uma infecção, e até mesmo vir a desenvolver a enfermidade, o que poderia causar um desequilíbrio no ecossistema marinho.

Quanto às demais aves silvestres estudadas, como ocorreu neste trabalho, outros estudos apontam baixo índices de isolamento do agente. Em trabalho realizado na Espanha por Gopee et al. (2000), apenas 12 (3%) de 435 amostras coletadas de aves foram positivas para *Salmonella* sp*.,* sendo que os índices mais altos foram encontrados em aves da ordem piciformes (2/30), além de um grupo de aves aquáticas (6/106). Logo, demonstrou que a freqüência de *Salmonella* sp. em aves de cativeiro é relativamente baixa, principalmente quando comparada a mamíferos e répteis. Em trabalho realizado por Lemos et al. (1999) no Rio de Janeiro, Brasil, houve total negatividade de isolamento de *Salmonella* sp. de um total de 78 amostras de aves selvagens, de variadas espécies. Também, em trabalho executado em São Paulo, por Lopes (2008), quando foram coletadas amostras de 200 aves, ocorreu negatividade de 100% para *Salmonella* sp*.*

Já em um estudo de Refsum et al. (2003), o qual abordava aspectos epidemiológicos e patológicos da infecção por *S. typhimurium* em passeriformes na Noruega, observou que de 145 carcaças de passeriformes que foram à óbito em zona urbana, 94 (64,8%) tiveram como causa diagnosticada do óbito a salmonelose, sendo que à necropsia foram encontrados emaciação, esplenomegalia, além de necrose hepática, de papo, esôfago e trato intestinal. Neste mesmo estudo também foi coletado material biológico, através de suabe cloacal de 199 passeriformes aparentemente saudáveis, resultando em apenas 2% de positividade para *Salmonella* sp. De acordo com os dados obtidos nos trabalhos citados, se pode crer que é mais difícil o diagnóstico em aves assintomáticas, fato que pode ser ocasionado pela baixa patogenicidade de determinada cepa, sendo que a progressão da enfermidade, como lembram Cubas et al. (2004), depende não apenas da patogenicidade do agente, mas também do estado nutricional, imunológico e condições de estresse do hospedeiro. É possível que numa população ampla de aves haja um maior número de positivos, diferente do que os testes demonstram. Em altas concentrações populacionais, de acordo com Tizard (2004), como praças e jardins, ocorre rápida disseminação, podendo levar a surtos graves, principalmente se tratando de passeriformes. Em outras ordens

taxonômicas, também estudadas por Tizard (2004), foi relatado que aves carnívoras, como os falconiformes, tem sua infecção associada à ingestão de mamíferos, ou pequenas aves utilizadas como presas vivas para alimentação, como pombos.

Mesmo tendo baixos índices de positividade, não se deve descartar o potencial que as aves silvestres possuem na disseminação do patógeno, nem mesmo haver descuido em relação a quarentenas, principalmente em centros de triagem e reabilitação, onde novos animais podem eliminá-lo infectando assim outras aves do plantel, além de ambientes de produção avícola os quais devem evitar o acesso de aves silvestres.

Quanto às infecções provocadas em aves domésticas, de acordo com Hofer (1997) é importante enfatizar que, as infecções apresentam um notável espectro clínico, sendo que os quadros graves implicam na maioria das vezes na eliminação dos lotes infectados como na pulorose e no tifo aviário. Na inoculação experimental de *Salmonella* sp*.* no presente trabalho, verificou-se , como já era esperado, a ocorrência de sintomatologia condizente com tal infecção, como fezes amolecidas e com presença de sangue, observada nos dias 5, 7 e 10 do período experimental, porém não houve óbitos, demonstrando assim que estes animais poderiam vir a ser portadores do agente, eliminando-o constantemente no ambiente. No estudo de Miglino et al. (2011), além da inoculação por sonda via oral, foi também ofertada a um grupo de aves ração contaminada, sendo que durante todo o período de observação dos animais não houve qualquer sintomatologia clínica nem lesões macroscópicas, embora tenha sido confirmado posteriormente o diagnóstico positivo de *Salmonella* sp. Em outro trabalho, realizado por Sousa et al. (2011) foi investigado em aves de vida livre próximas a galpões de aviário, além de amostras de água, de frangos de corte, de suínos e de roedores, a presença de *Salmonella* sp., sendo que entre as aves selvagens em apenas uma foi isolado o patógeno, o qual foi inoculado em pintos de um dia, tendo como resultado também pouca presença de sinais clínicos, apenas fezes amolecidas em dias alternados durante o experimento.

Em relação às lesões encontradas, diferentemente do presente trabalho, no qual foram observados histologicamente infiltrados inflamatórios no duodeno, jejuno, íleo e ceco, além de congestão e áreas de necrose no fígado, no trabalho de Miglino et al. (2011), embora tenha sido isolada a bactéria de órgãos do trato gastrointestinal,

além do fígado, não foram relatadas lesões macro nem microscópicas. Já no estudo de Sousa et al. (2011) foram observadas nos pintos infectados células inflamatórias no duodeno, íleo e ceco, além de granulócitos no baço e bolsa cloacal.

A confirmação da existência de uma infecção no grupo controle positivo e grupo desafiado foi realizada por pesquisa sorológica, através da Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR), embora alguns autores relatem que os resultados não são estritamente confiáveis em especial quando se utiliza somente este método de diagnóstico, devido à possibilidade de falsos negativos em virtude dos anticorpos aparecerem somente a partir do terceiro ao décimo dia ou mais da infecção; e também a possibilidade de falso positivo pela reação cruzada com outras enterobactérias (BARROW, 1993). No entanto, segundo Tizard et al. (2004), a vantagem do teste sorológico sobre o bacteriológico é o fato de que os anticorpos no soro de aves infectadas persistem por longos períodos e a eliminação da bactéria nas fezes é intermitente. Além disso, a realização de provas de soroaglutinação rápida com antígenos polivalentes O (somático) utilizado para tirar aves reagentes para *Salmonella pullorum* e *Salmonella gallinarum*, pode ser útil para reconhecer aves infectadas por diferentes espécies de salmonelas do grupo paratifóife, particularmente *Salmonella enteritidis* (ITO, 1995).

Assim, foi avaliado como sendo de grande relevância o papel das aves silvestres, sejam cativas ou de vida livre na disseminação do agente nos ambientes de produção avícola.

6.Conclusão

O índice de detecção de aves silvestres portadoras de *Salmonella* sp. foi mínimo, tendo sido encontrada apenas uma ave positiva. Entretanto, a cepa encontrada nesta ave foi de patogenicidade suficiente para causar malefícios às aves de produção. Assim, foi comprovado que a cepa positiva de *Salmonella* sp. isolada da espécie *Spheniscus magellanicus* (pinguim-de-Magalhães) foi retroisolada e causou infecção na espécie *Gallus gallus* (frango doméstico), fato observado através da sintomatologia apresentada, dos danos teciduais causados

em determinados órgãos, como intestino e fígado, e da pesquisa sorológica realizada.

7.Referências

ANVISA. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. 2004.
Disponívelhttp://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf

BARROW, P. A. Experimental infection of chickens with Salmonella enteritidis. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651 – 699, 1993.

CUBAS, Z. S., GODOY, S. N. **Algumas doenças de aves ornamentais.** Departamento de Meio Ambiente. Foz do Iguaçu, Paraná. 2004

GOPEE et al. Salmonelosis in captive wildlife. **Journal of Wildlife Diseases**. v 36, no 2, april 2000

HALL, A. J.; SAITO, E. K. Avian Mortality Events due to Salmonellosis In The United States, 1985-2004. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 44(3) p. 585-593, 2008

HIRSH, Dwight C. Salmonella. In: HIRSH, Dwight C.; ZEE, Yuan Chung. **Microbiologia Veterinária.** Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003. Capítulo 10.p 59-73.

HOFER, E., FILHO, S. J. S., REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de Salmonella Isolados de aves no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. V. 17(2) p. :55-62, abr./jun. 1997

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases.** v 40 no 4, 2004.

ITO, N. M. K. Monitoria das salmoneloses aviárias. **Informativo Técnico SPAVE**, São
Paulo, p. 1-20, 1995.

LABACVET. **Enterobacteriáceas (*Salmonella* sp.).** Microbiologia Clínica. 2007. Disponível http://www6.ufrgs.br/labacvet/

LEMOS, M., SILVA, G. M. D., FEDULLO, L. P. L., PEREIRA, V. L. A. *Salmonella* in wild birds in the Rio de Janeiro Zoological Garden, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária.** V. 6 n. 1 p. 40-43. 1999.

LOPES, L. F. L. ***Salmonella* sp. em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: freqüência de isolamento, caracterização de isolados e as conseqüências para o manejo em cativeiro e reintrodução.** 2008. Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental e Comparada- Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2008

LOUREIRO, E. C. B. **Epidemiologia descritiva de *Salmonella* em ecossistemas aquáticos de diferentes Áreas do estado do Pará.** Tese de Doutorado em Biologia de agentes infecciosos e parasitários- Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal do Pará; Belém-PA, 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Anexo I: métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851

MIGLINO, L. B., PICKLER,L., KURITZA, L. N., LOURENÇO,M. C., MUNIZ, E., LAGO, A. L., SANTIN, E. Inoculação experimental de *Salmonella Minnessota* em frangos de corte**. XXII Congresso Latino-Americano de aves** Disponível http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/inoculacao-experimental-salmonella-minnessota-t538/165-p0.htm

PADRONE, J. M. B. **O comércio ilegal de animais silvestres: Avaliação da questão ambiental no Rio de Janeiro.** Aprovada em 22 de janeiro de 2004. Dissertação de Mestrado em Ciência Ambiental- Instituto de Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2004.

REFSUM, T., VIKOREN, T., HANDLAND, K., KAPPERUD, G., HOLSTAD, G. Epidemiologic and pathologic aspects of Salmonella typhimurium infection in passerine birds in Norway. **Journal of Wildlife Diseases.** 39(1), p. 64–72, 2003

ROSSI, A. A. **Biossegurança em frangos de corte e saúde pública: limitações, alternativas e subsídios na prevenção de Salmoneloses.** Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas- Centro de Ciências Agrárias- Universidade Federal de Santa Catarina.- Florianópolis-SC. 2005.

SILVA, M. A., MARVULO, M. F. V., MOTA, R. A., SILVA, J. C. R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* sp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V 30(7); P. 573-580; julho 2010

SOUSA , E., WERTHER, K., BERCHIERI, A., ALMEIDA,A. M., CANDIOTO, C. G., SILVA, A. C. Infecção experimental de pintos de um dia de idade com sorotipos de Salmonella isolados de instalações avícolas, ave selvagem e suínos. **XXII Congresso Latino-Americano de aves.** Disponível http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/infeccao-experimental-pintos-dia-t533/165-p0.htm

STERZO, E. V., VARZONE, J. R. M., FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaios e Ciências: C. biológicas, agrárias e da saúde.** V XII(2); p. 129-138, 2008.

TIZARD, I. Salmonellosis in Wild Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine,** v. 13(2) p. 50-66, 2004.

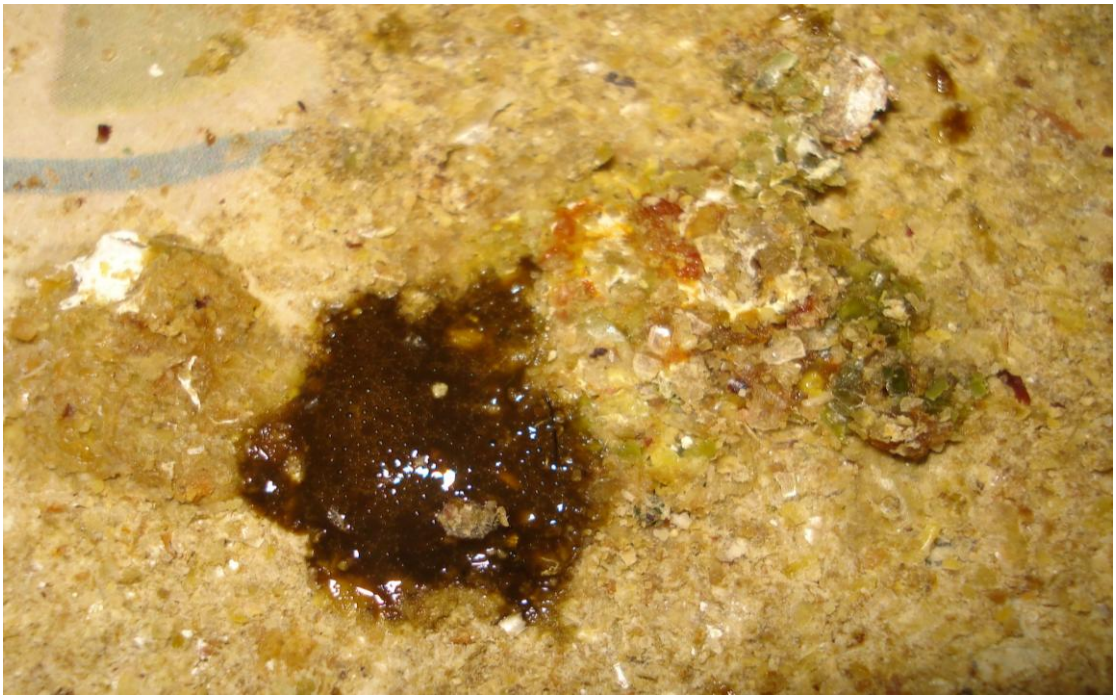

Figura 1. Enterite sanguinolenta em gaiola do grupo desafiado por cepa de ave silvestre.

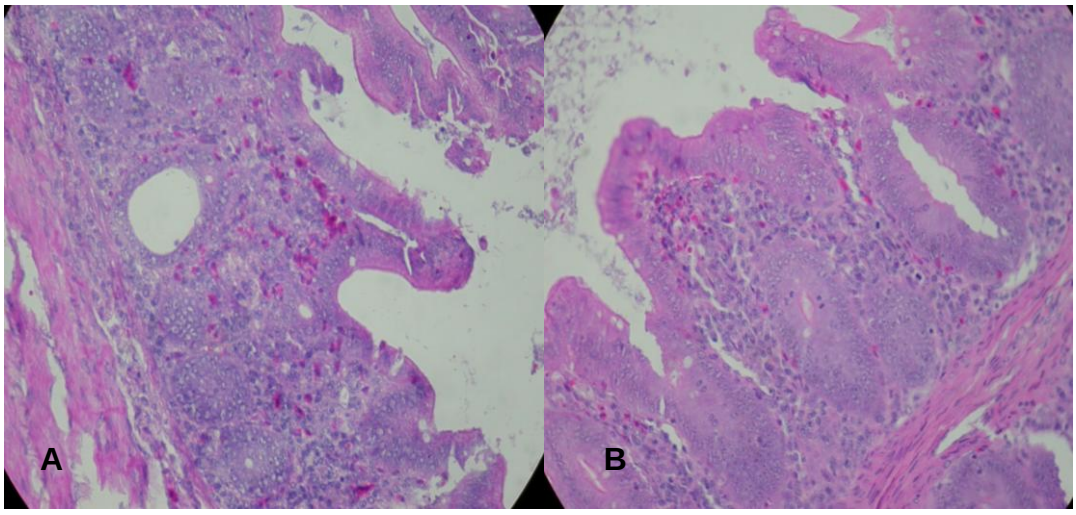

Figura 2: A: Íleo de *Gallus gallus*: infiltrado inflamatório de heterófilos, linfócitos e macrófagos na lâmina própria. Hematoxilina-eosina, Obj. 40x (amostra de campo). B: Íleo de *Gallus gallus*: infiltrado inflamatório de heterófilos, linfócitos e macrófagos na lâmina própria. Hematoxilina-eosina, Obj. 40x (controle positivo).

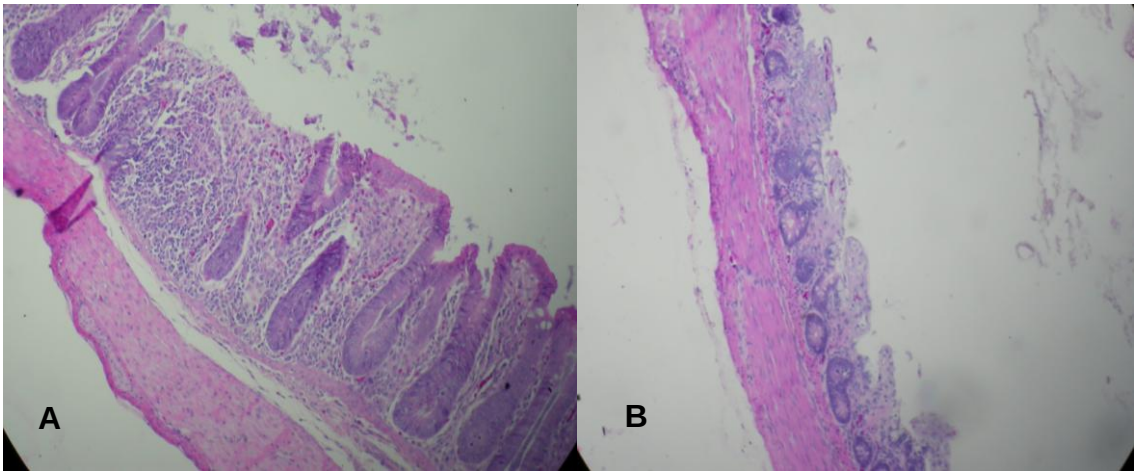

Figura 3: A: Ceco de *Gallus gallus com* infiltrado inflamatório constituído de linfócitos e macrófagos na lâmina própria e perda do epitélio da superfície das vilosidades. Hematoxilina-eosina, Obj. 20x (amostra de campo). B: Ceco de *Gallus gallus* com destruição acentuada das vilosidades e infiltrado inflamatório de macrófagos. Hematoxilina-eosina, Obj. 20x (controle positivo).

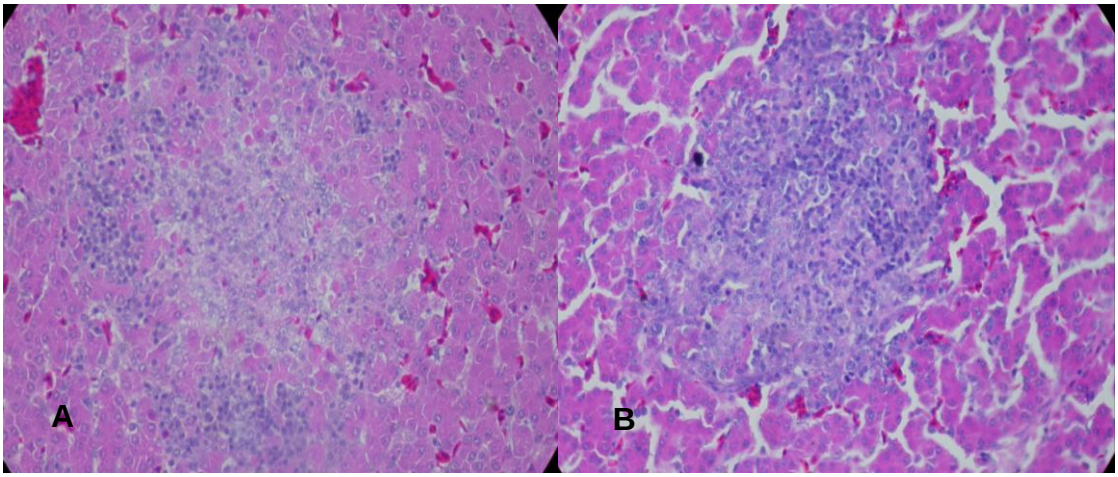

Figura 4: A: Fígado de *Gallus gallus*: área focal de necrose infiltrada por heterófilos e linfócitos, congestão dos sinusóides hepáticos adjacentes. Hematoxilina-eosina. Obj. 40x (amostra de campo). B: Fígado de *Gallus gallus*: área focal de necrose infiltrada linfócitos. Hematoxilina-eosina. Obj. 40x (controle positivo).

Tabela 1. Número de amostras, de acordo com a classificação científica quanto à ordem, e com o local onde se encontravam.

Ordem	NURFS	CRAM	CCSB	Total
Anseriformes	28			28
Charadriiformes	01			01
Ciconiiformes	01			01
Cuculiformes	01			01
Falconiformes	02			02
Passeriformes	16		11	27
Piciformes	03			03
Procellariformes		01		01
Psittaciformes	07			07
Sphenisciformes		48		48
Strigiformes	02			02
Total	61	49		121

Legenda:NURFS: Núcleo de Reabilitação de Fauna Silvestre; CRAM: Centro de Reabilitação de Animais Marinhos; CCSB: Criadouro Conservacionista São Braz.

Tabela 2. Espécies estudadas dentro de cada ordem e respectivo número de espécimes.

Ordem	Espécie	Espécimes(N)	Total
Anseriformes	*Netta peposaca(*Marrecão)	28	28
Charadriiformes	*Vanellus chilensis* (Quero-quero)	01	01

Ciconiiformes	*Nyctanassa violacea(* Savacu-de-coroa)	01	01
Cuculiformes	*Guira guira* (Anu branco)	01	01
Falconiformes	*Milvago chimango* (Chimango)	01	02
	Buteo magnirostris (Gavião carijó)	01	
Passeriformes	*Amblyrhamphus holosericeus*(Cardeal-do-banhado)	01	27
	Cyanoloxia brissonii(Azulão)	01	
	*Paroaria coronata(*Cardeal)	14	
	Saltator aurantiirostris(Bico-duro*)*	03	
	Saltator similis(Trinca-ferro)	01	
	Saltraticula artricollis(Bico-de-pimenta)	01	
	Sicalis flaveola (Canário-da-terra)	03	
	*Stephanophorus diadematus (*Sanhaçu-frade)	01	
	*Streptopelia risória (*Rolinha-mansa)	01	
	Turdus albicollis (Sabiá-coleira)	01	

Piciformes	*Ramphastos toco (*Tucanuçu*)*	03	03
Procellariformes	*Talassarche melanophris(*Albatroz-de-sobrancelha)	01	01
Psitaciformes	*Amazona aestiva* (Papagaio verdaddeiro)	05	07
	Myiopsitta monachus (Caturrita)	01	
	*Amazona ochrocephala(*Papagaio-campeiro)	01	
Sphenisciformes	*Spheniscus magellanicus* (Pinguim-de-Magalhães)	48	48
Strigiformes	*Athene cunicularia* (Coruja-buraqueira)	02	02
Total			121

Conclusões Gerais

Com base no trabalho realizado concluiu-se que o índice de detecção de aves silvestres portadoras de *Salmonella* sp. nas espécies estudadas foi mínimo, sendo que a cepa positiva isolada da ave marinha da espécie *Spheniscus magellanicus (*pinguim-de-Magalhães), e posteriormente retroisolada de uma ave doméstica da espécie *Gallus gallus (*frango doméstico*)*, causou como sintomatologia enterite sanguinolenta, e achados de necropsia, como as lesões microscópicas em duodeno, jejuno, ceco e fígado desses modelos biológicos, o que foi comprovado também mediante sorologia. Assim, se reafirmou, ser de grande importância o papel das aves silvestres, tanto de vida livre quanto em cativeiro ou processo de reabilitação, na disseminação de diversos patógenos, incluindo especificamente a bactéria *Salmonella* sp, fato relevante tanto na produção avícola com suas consequentes perdas econômicas, quanto na saúde pública, no que diz respeito às toxinfecções alimentares humanas.

Também se concluiu que o diagnóstico microbiológico clássico é crucial quando se deseja classificar e caracterizar adequadamente o micro-organismo em questão, ajustando-o quando necessário, dependendo da espécie animal estudada, utilizando para tanto seu perfil bioquímico, para então fechar seu diagnóstico através identificação sorológica. No presente estudo, salienta-se que a SAR, que normalmente é utilizada como teste de triagem em aves de produção, apresentou resultados compatíveis com o isolamento bacteriano tradicional.

Referências Bibliográficas

ANVISA. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. 2004.Disponível http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_4_2004.pdf

BENCKE, G. A. **Lista de Referência das aves do Rio Grande do Sul**. Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Publicações FZB, n 10. Porto Alegre, 2001.

BRUTON, Oscar; BRIGHTSMITH, Donald J. Testing for *Salmonella* sp. in released parrots, wild parrots, and domestic fowl in lowland Peru. **Journal of Wildlife Diseases.** v 46(3) p. 718-723. 2010.

CORRÊA, S. H. R. **Estudo Epidemiológico de doenças infecciosas em anatídeos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo.** 2007. 89f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses). Curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo.

CUBAS, Z. S., GODOY, S. N. **Algumas doenças de aves ornamentais.** Departamento de Meio Ambiente. Foz do Iguaçu, Paraná. 2004.

ECOLVET. **Manual com Orientações para Coleta e Envio de Material**. Ecolvet, 2007.

GOPEE, N. V.; ADESIYUN, A. A.; CAESAR, K. Retrospective and Longitudinal Study of Salmonellosis in Captive Wildlife in Trinidad. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 36(2) p.284-293, 2000.

GOPEE, N. V. Salmonelosis in captive wildlife. **Journal of Wildlife Diseases**. v 36, no 2, april 2000.

HALL, A. J.; SAITO, E. K. Avian Mortality Events due to Salmonellosis In The United States, 1985-2004. **Journal of Wildlife Diseases,** v. 44(3) p. 585-593, 2008.

HIRSH, Dwight C. Salmonella. In: HIRSH, Dwight C.; ZEE, Yuan Chung. **Microbiologia Veterinária.** Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003. Capítulo 10.p 59-73.

HOFER, E., FILHO, S. J. S., REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de Salmonella Isolados de aves no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira. V. 17(2) p. :55-62, abr./jun. 1997

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases.** v 40 no 4, 2004.

HUMPHREY, T, TIZARD, I.. Public-health Aspects of *Salmonella* Infection. In: **Salmonella in domestic animals.** London-UK. Edited by C. Wray and A. Wray**,**2000. Chapter 15. p. 245-249.

LABACVET. **Enterobacteriáceas (*Salmonella* sp.).** Microbiologia Clínica. 2007. Disponível http://www6.ufrgs.br/labacvet/

LEMOS, M., SILVA, G. M. D., FEDULLO, L. P. L., PEREIRA, V. L. A. *Salmonella* in wild birds in the Rio de Janeiro Zoological Garden, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária.** V. 6 n. 1 p. 40-43. 1999.

LOPES, L. F. L. ***Salmonella* sp. em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: freqüência de isolamento, caracterização de isolados e as conseqüências para o manejo em cativeiro e reintrodução.** 2008. Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental e Comparada- Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2008.

LOUREIRO, E. C. B. **Epidemiologia descritiva de *Salmonella* em ecossistemas aquáticos de diferentes Áreas do estado do Pará.** Tese de Doutorado em Biologia de agentes infecciosos e parasitários- Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal do Pará; Belém-PA, 2007.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Anexo I: métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851

MIGLINO, L. B., PICKLER,L., KURITZA, L. N., LOURENÇO,M. C., MUNIZ, E., LAGO, A. L., SANTIN, E. Inoculação experimental de *Salmonella Minnessota* em frangos de corte**. XXII Congresso Latino-Americano de aves** Disponível http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/inoculacao-experimental-salmonella-minnessota-t538/165-p0.htm

MOREIRA, A. P. O. **Pesquisa de *Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade da Região Metropolitana de Fortaleza-CE**. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias- Faculdade de Veterinária-Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE; 2002.

NETO, O.C.F. **Pesquisa de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva de avestruzes no sudeste do Brasil.** Dissertação de Mestrado em Patologia Animal- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2008.

PADRONE, J. M. B. **O comércio ilegal de animais silvestres: Avaliação da questão ambiental no Rio de Janeiro.** Aprovada em 22 de janeiro de 2004. Dissertação de Mestrado em Ciência Ambiental- Instituto de Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2004.

REFSUM, T., VIKOREN, T., HANDLAND, K., KAPPERUD, G., HOLSTAD, G. Epidemiologic and pathologic aspects of Salmonella typhimurium infection in passerine birds in Norway. **Journal of Wildlife Diseases.**. 39(1), p. 64–72, 2003.

SHINOHARA, N. K. S; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* sp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13(5):p. 1675-1683, 2008.

STERZO, E. V., VARZONE, J. R. M., FERRARI, R. Salmoneloses aviárias. **Ensaios e Ciências: C. biológicas, agrárias e da saúde.** V XII(2); p. 129-138, 2008.

SILVA, M. A., MARVULO, M. F. V., MOTA, R. A., SILVA, J. C. R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* sp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V 30(7); P. 573-580; julho 2010.

SOUSA , E., WERTHER, K., BERCHIERI, A., ALMEIDA,A. M., CANDIOTO, C. G., SILVA, A. C. Infecção experimental de pintos de um dia de idade com sorotipos de Salmonella isolados de instalações avícolas, ave selvagem e suínos. **XXII Congresso Latino-Americano de aves.** Disponível http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/infeccao-experimental-pintos-dia-t533/165-p0.htm

TSIODRAS, S., KELESIDIS, T. KELESIDIS, I. BAUCHINGER, U., FALAGAS, M. E. Human infections associated with wild birds. **Journal of Infection**. Published by Elsevier Ltda. v. 56 p. 83-98, 2008.

TIZARD, I. Salmonellosis in Wild Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine,** v. 13(2) p. 50-66, 2004.