



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO



**DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM PSITACÍDEOS DE
UM CENTRO DE REABILITAÇÃO DE ANIMAIS
SILVESTRES EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO
SUL E COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

MICHELLI LOPES DE SOUZA

CAMPO GRANDE - MS

2019

MICHELLI LOPES DE SOUZA

**DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM PSITACÍDEOS DE
UM CENTRO DE REABILITAÇÃO DE ANIMAIS
SILVESTRES EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO
SUL E COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

**DETECTION OF *Salmonella* spp. IN PSITTACINES OF A WILDLIFE
REHABILITATION CENTER IN CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL
AND COMPARISON OF DIAGNOSTIC TECHNIQUES**

MICHELLI LOPES DE SOUZA

**Orientador: Carlos Alberto do
Nascimento Ramos**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciências
Veterinárias.

CAMPO GRANDE - MS

2019

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar
uma alma humana, seja apenas outra alma humana”*

Carl G. Jung

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda minha trajetória e por todas as conquistas e vitórias alcançadas. Aos meus pais, Joaquim Angelo Lopes de Souza e Marlene Severiano de Souza por serem tão incríveis e presentes em minha vida, por me dar todo o suporte e incentivo a seguir nesse caminho, sempre me proporcionando um ensino de qualidade e por me ensinarem a ser uma mulher forte e independente e buscar por meus sonhos. Ao meu irmão Willian Severiano de Souza, que nunca mediu esforços para me ajudar e por todo o companheirismo de uma vida. Vocês três são as pessoas mais importantes da minha vida e sem vocês eu não estaria hoje onde estou. Muito obrigada por tudo!

Agradeço minha avó Josefa, por sempre rezar por mim e me fazer enxergar que devemos aproveitar a vida, principalmente enquanto somos jovens e saudáveis. Ao meu avô Manoel, *In memoriam*, por todo o companheirismo, guardarei para sempre nossas histórias e pela companhia enquanto escrevia boa parte dessa dissertação. Também *In memoriam* aos meus avós paternos, Patrocínio e Maria Aparecida, que não tive a oportunidade de conhecer, mas que ensinaram meu pai a ser um homem exemplar, no qual me espelho muito.

Agradeço meus amigos Anna, Lucas, Marília, Gabriela, Nataly, Renê, Pâmella, Carol, Thaize e Matheus por serem tão presentes em minha vida e sempre me incentivarem nas minhas escolhas e por serem a “válvula de escape” em períodos estressantes, a presença de vocês sempre renova minhas energias.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos por me acolher como orientada, nunca desistir de mim, confiar no meu trabalho, por todos os ensinamentos, pela ajuda e apoio ao longo do meu mestrado e também durante a residência. É um exemplo para mim como profissional e como pessoa, obrigada por todos os conselhos. À Profa. Dra. Cássia Rejane Brito Leal por ser uma grande incentivadora a seguir esse caminho e também pela ajuda e apoio ao longo do meu mestrado e também durante a residência e por quem tenho um carinho imenso. Agradeço a toda equipe da preventiva, Juliane, Zelina, Guilherme, Vinícius e Herbert por me ajudarem nos momentos de aperto, ajudando nas coletas e processamento de amostras e também aos meus estagiários Angélica e Mateus por irem fazer coletas comigo até em dia de jogo do Brasil na copa do mundo e processar amostras nos finais

de semana. As professoras Dra. Thyara de Deco Souza e Araújo e Dra. Carina Elisei de Oliveira por aceitarem compor minha banca de qualificação e defesa de dissertação por todas as sugestões para enriquecimento do meu trabalho.

Agradeço toda a equipe do CRAS (Centro de Reabilitação de Animais Silvestres), em especial à Cláudia e ao Lucas Azuaga, por abrirem as portas, abraçar nossa idéia e fazer com que essa pesquisa se tornasse realidade, obrigada também pela disponibilidade de tempo para ajudar na captura das aves e coleta de amostras e dados, vocês foram essenciais para o andamento do projeto, sou muito grata. Admiro muito vocês pelo trabalho e dedicação no tratamento e conservação de animais silvestres. Aos animais por sua participação.

A CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível superior) pela bolsa concedida. A FAMEZ (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) e a UFMS (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) por serem como uma segunda casa para mim, me dando muito orgulho de fazer parte de seu corpo docente e a todos os professores que contribuíram nesta etapa da minha vida.

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

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
CAPITULO 1	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 <i>Salmonella</i>	13
2.2 Epidemiologia	13
2.3 Patogênese	15
2.4 Sinais clínicos	15
2.5 Diagnóstico	17
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPITULO 2	23
Resumo	23
Abstract	24
Introdução	24
Metodologia	25
Resultados	27
Discussão	30
Conclusões	34
Agradecimentos	34
Referências Bibliográficas	34
ANEXOS	38
Anexo 1 – SISBio	38
Anexo 2 – CEUA	42
Anexo 3 – SisGen	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de aves coletadas de acordo com a espécie no CRAS.....	28
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparativo entre positivos e negativos para <i>Salmonella</i> spp. entre as espécies de aves estudadas.....	29
--	----

RESUMO

1 **SOUZA, M. L. Detecção de *Salmonella* spp. em psitacídeos de um Centro de**
2 **Reabilitação de Animais Silvestres em Campo Grande, Mato Grosso do Sul e**
3 **comparação das técnicas de diagnóstico. 2019. 43p. Dissertação de**
4 **Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.**
5 **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de**
6 **Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.**

7
8 Em busca de informações sobre a importância das aves silvestres na transmissão
9 de agentes patogênicos, tanto para outras aves de vida livre como para as
10 mantidas em cativeiro, teve-se o intuito de investigar a infecção por *Salmonella*
11 spp. em aves recebidas e mantidas no Centro de Reabilitação de Animais
12 Silvestres (CRAS) de Campo Grande, MS e também comparar a eficiência de
13 técnicas de diagnóstico para esse micro-organismo. Foram coletadas 379
14 amostras de swabs cloacais de psitacídeos em seus recintos de permanência no
15 CRAS-MS, dentre estes, no momento de entrada da ave no CRAS-MS, no recinto
16 de quarentena e nos recintos de convívio coletivo das aves. As amostras foram
17 submetidas à cultura bacteriana utilizando caldo de enriquecimento seletivo para
18 *Salmonella* (Rappaport-Vassiliadis) e não seletivo (Água Peptonada) e meios de
19 cultura seletivos para *Salmonella* (XLD e Hektoen) e não seletivo (MacConkey),
20 também foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a
21 detecção de *Salmonella* spp. Das amostras analisadas por cultura bacteriana
22 (379), nenhuma apresentou resultado positivo para o isolamento de *Salmonella*
23 spp. sendo identificadas outras colônias de bactérias Gram-negativas, entretanto
24 quando analisadas por PCR, 1,05% (4/379) das amostras foram positivas. A
25 frequência de amostras positivas foi de 75% (3/4) no momento de entrada da ave
26 no CRAS e 25% (1/4) no recinto de quarentena. Os resultados sugerem que
27 mesmo com uma baixa frequência, as aves podem ser reservatórios para
28 *Salmonella* spp., e seu potencial disseminador não deve ser desprezado.

29
30 **Palavras-chave:** Aves Silvestres, Cultura Bacteriana, PCR
31
32

ABSTRACT

33

34

35 **SOUZA, M. L. Detection of *Salmonella* spp. in psittacines of a Wildlife**
36 **Rehabilitation Center in Campo Grande, Mato Grosso do Sul and**
37 **comparison of diagnostic techniques. 2019. 43p. Dissertação de Mestrado –**
38 **Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de**
39 **Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do**
40 **Sul, Campo Grande, MS, 2019.**

41

42 In search of information about the importance of the transmission of pathogens in
43 birds, between wild and captive birds, the present study investigated the infection
44 by *Salmonella* spp. in birds received and maintained at the Wild Animal
45 Rehabilitation Center (CRAS) in Campo Grande, MS and also compare the
46 diagnostic techniques efficiency for this microorganism. A total of 379 samples of
47 Cloacal swabs were collected from the psittacines in the enclosures on CRAS-MS,
48 the enclosures are divided in arrival, quarantine and collective enclosures. The
49 samples were submitted to bacterial culture using selective (Rappaport-
50 Vassiliadis), and non-selective enrichment broths (peptone water) and selective
51 (XLD and Hektoen) and non-selective (MacConkey) culture Agar, it were also
52 submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR) to identify *Salmonella* spp.
53 None of the analyzed samples (379) showed a positive result by bacterial culture
54 isolation and other Gram-negative bacteria were identified, whereas by PCR,
55 1.05% (4/379) of the samples were positive. The frequency of positive samples
56 was 75% (3/4) at the moment of the birds arrival in the CRAS-MS and 25% (1/4) in
57 the quarantine enclosure. The results suggest that even with a low frequency, the
58 birds can be reservoirs of *Salmonella* spp., and it's potential disseminator should
59 not be despised.

60

61 **Key words:** Bacterial Culture, PCR, Wild Birds

62

63

64 **CAPÍTULO 1**

65 **1. INTRODUÇÃO**

66

67 Nas últimas décadas houve um crescimento na criação de animais
68 silvestres como animais de companhia, e dentre estes, destacam-se os
69 psitacídeos, que são conhecidos por serem sociáveis, inteligentes, apresentarem
70 uma coloração exuberante e por sua capacidade em imitar sons (CUBAS *et al.*,
71 2014).

72 Os Centros de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) definidos pela
73 resolução 489/2018 (CONAMA, 2018) são os locais destinados a receber, triar,
74 identificar, avaliar, marcar, recuperar, e reabilitar a fauna silvestre proveniente de
75 ações de apreensão, resgate ou entrega voluntária. Esses locais atuam em
76 programas de reintrodução dos animais em ambiente natural, após período de
77 reabilitação ou quarentena, de acordo com cada espécie, suas características e
78 distribuição original. Além disso, atuam para evitar a introdução de espécies
79 exóticas, evitando assim problemas ambientais e sanitários decorrentes da soltura
80 de animais fora de sua área original de ocorrência. Fatores como o elevado
81 número de animais recebidos, a falta de informação sobre a origem dos mesmos,
82 o tempo de cativeiro, as restrições físicas, a região de distribuição original, os
83 riscos sanitários, a infraestrutura insuficiente, e a falta de monitoramento pós-
84 soltura dificultam o bom andamento dos programas de reintrodução realizados por
85 esses centros.

86 A problemática sobre *Salmonella* spp. em aves já é amplamente
87 pesquisada quando se trata de aves domésticas devido aos seus subprodutos
88 destinados ao consumo humano, mas deve-se também mencionar a importância
89 de sua ocorrência em aves de vida livre, uma vez que podem atuar como
90 importantes disseminadoras. O isolamento de *Salmonella* em aves silvestres ou
91 de estimação demonstra a importância sanitária que esses animais apresentam
92 para o meio ambiente e para o homem (MARIETTO-GONÇALVES *et al.*, 2010),
93 pois as aves podem carrear sorotipos não espécie-específicos, e o contato
94 dessas com outros animais ou humanos podem levar a infecções e disseminação
95 da bactéria (DAOUST E PRESCOTT, 2007). De acordo com Vigo *et al.* (2009)
96 *Salmonella* Typhimurium é um sorotipo frequentemente isolado em psitacídeos,

97 podendo causar infecções subclínicas em aves jovens ou debilitadas,
98 características essas que estão relacionadas as aves que chegam ao ambiente
99 de cativeiro. Além disso, é um sorotipo associado aos casos zoonóticos de
100 salmonelose (THORNLEY *et al.*, 2003).

101 Os centros de reabilitação, como o CRAS, recebem animais de diferentes
102 regiões do estado. Oriundos de apreensões e até mesmo entrega voluntária.
103 Assim, representam um importante centro de convergência de animais silvestres,
104 os quais, uma vez avaliados, possibilitam identificar os principais sorotipos de
105 *Salmonella* em circulação na região, reduzindo significativamente os custos de
106 uma pesquisa a campo. Além disso, com as informações obtidas, é possível a
107 idealização e implementação de procedimentos no centro de reabilitação, visando
108 reduzir a contaminação ambiental e a consequente infecção de outras aves,
109 reduzindo os riscos de surtos.

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é constituído por bactérias Gram-negativas, com formato de bastonete, não formadoras de esporos, anaeróbicas facultativas e oxidase negativas (SILVA *et al.*, 2010). O método de classificação das salmonelas mais aceito na atualidade e adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o esquema de Kauffmann-White, na qual o gênero é composto por duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). Além da espécie *S. enterica* ser dividida em subespécies, também pode ser classificada em sorotipos, sendo conhecidos mais de 2.659 sorotipos, sendo todos potencialmente patogênicos para as diferentes espécies (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014). As salmonelas são consideradas como agentes causadores de doenças em humanos e animais (SMITH *et al.*, 2002). Os sorotipos que apresentam maior importância para as aves são *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, que também são patogênicos para os humanos, além da *Salmonella* Gallinarum e da *Salmonella* Pullorum. Os sorotipos que pertencem à espécie *Salmonella enterica* não são hospedeiro-específicos, ou seja, não são adaptados a uma única espécie animal, podendo infectar diferentes espécies como aves, répteis, peixes e mamíferos. Devido ao contato próximo com os humanos, as aves de cativeiro aparentemente são mais susceptíveis à infecção que outras aves e se mantêm como carreadores desta bactéria (DILMAGHANI *et al.*, 2011).

2.2 Epidemiologia

Salmonella spp. são amplamente distribuídas geograficamente e este grupo possui uma grande heterogeneidade em relação a sua ecologia, seus hospedeiros e seu potencial patogênico. Estão presentes na água, no solo ou alimentos contaminados com fezes e podem ser encontradas infectando o intestino de humanos e animais. Sua viabilidade no ambiente pode variar de dias a meses dependendo das condições ideais tais como temperatura, umidade, pH e incidência da luz solar (HIRSH, 2004). A susceptibilidade para o desenvolvimento

161 da enfermidade é amplamente variável entre as diferentes espécies animais e os
162 sorotipos de *Salmonella* envolvidos no processo de infecção. Alguns sorotipos
163 podem fazer parte da microbiota normal de alguns animais e não determinarem
164 quaisquer sinais de doença, outros, porém, podem levar ao desenvolvimento de
165 quadros graves de doença e resultar em óbito. Os hospedeiros que não
166 desenvolvem sinais clínicos, na maioria das vezes, tornam-se reservatórios da
167 bactéria podendo ser importantes disseminadores do micro-organismo no meio
168 ambiente (SILVA *et al.*, 2010). As aves aparentemente saudáveis podem portar
169 *Salmonella* spp. em seu organismo e excretar o patógeno de forma intermitente
170 (GOPEE *et al.*, 2000).

171 A microbiota cloacal das aves é diretamente influenciada por fatores
172 ecológicos, pela dieta e pelo habitat podendo variar entre espécies e até mesmo
173 entre indivíduos de uma mesma espécie (HIDASI, 2013). A microbiota cloacal da
174 maioria das aves é composta predominantemente por bactérias Gram-positivas,
175 tais como *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus*
176 sp., *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp. e *Pediococcus* sp.,
177 entretanto, alguns gêneros de bactérias Gram-negativas também podem ocorrer
178 (XENOULIS *et al.*, 2010; DONGEN *et al.*, 2013; FRAZÃO, 2014). Estudos
179 demonstram que a microbiota intestinal das aves varia conforme a porção do
180 intestino, aumentando em densidade e diversidade nas regiões mais distais do
181 trato (WISE e SIRAGUSA, 2007; ALEGRETTI, 2009).

182 A higiene inadequada dos recintos, associado a aglomerações favorece o
183 acúmulo e dispersão de *Salmonella* no ambiente. Assim, a probabilidade de
184 animais de cativeiro serem expostos ao patógeno aumenta, tornando-os
185 portadores intestinais e dispersantes desta bactéria. Sendo assim, existe uma
186 correlação direta entre a prevalência de *Salmonella* spp. no trato intestinal de
187 várias espécies silvestres de aves e a infecção de pessoas e animais de produção
188 (HIDASI, 2013). A principal forma de infecção ocorre por via fecal-oral, na qual os
189 indivíduos se infectam principalmente ingerindo água e alimentos contaminados,
190 também podem se infectar indiretamente pelo contato com animais ou superfícies
191 contaminadas e pela inalação de partículas aerolizadas. Animais com infecções
192 crônicas são fontes de contaminação e aves de vida livre podem ser carreadoras
193 e servirem como reservatórios para animais mantidos em cativeiro (FRIEND,
194 1999).

2.3 Patogênese

O conhecimento da microbiota residente ou transitória que compõem as diferentes áreas do organismo é essencial para a compreensão das doenças infecciosas que acometem homens e animais. A microbiota residente conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças no trato gastrointestinal. Já a microbiota transitória é formada por microorganismos patogênicos ou não, que provêm do meio ambiente e que se estabelecem no tecido por um tempo menor que a microbiota residente (ISOLAURI *et al.*, 2004).

As espécies de *Salmonella* habitam o trato gastrointestinal de várias espécies de animais e do homem, resultando em diferentes manifestações da doença incluindo, febre entérica, bacteremia e gastroenterites. Cepas que acometem um hospedeiro específico levam a forma mais grave da doença, enquanto aquelas relacionadas a mais de um hospedeiro apresentam sinais clínicos mais brandos (KARASOVA *et al.*, 2009). As diferentes formas clínicas ocorrem devido à variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (OCHOA e RODRÍGUEZ, 2005). O mecanismo de patogenicidade da *Salmonella* é multifatorial e complexo, incluindo presença de fatores de virulência que são codificados por genes de virulência. Os fatores de virulência são necessários aos micro-organismos patogênicos para invadir, colonizar, sobreviver, multiplicar no interior das células do hospedeiro e causar doença. Os genes de virulência podem fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, chamadas de ilhas de patogenicidade (SPI) (VAN ASTEN e VAN DIJK, 2005). Ao todo já foram descritas 17 SPIs, algumas são conservadas para o gênero enquanto outras são específicas para determinados sorotipos (OLIVEIRA *et al.*, 2013) . A abordagem sobre patogenicidade e genes de virulência de *Salmonella* não é estática, uma vez que decorre das alterações dos perfis epidemiológicos quanto às modificações do microrganismo, às alterações nos ambientes de criação dos animais, dos hábitos comportamentais e alimentares das populações.

2.4 Sinais clínicos

Nas aves, a doença normalmente se manifesta com sinais entéricos, contudo, sinais extra-intestinais podem ocorrer. Apenas uma pequena quantidade de *Salmonella* são espécie-específicas e a gravidade da doença está diretamente

229 correlacionada à condição imune da ave desafiada e ao sorotipo de *Salmonella*
230 envolvido. Sabe-se que alguns indivíduos infectados podem desenvolver desde
231 diarreia branda até quadros septicêmicos. Dentre os sinais citados por Back
232 (2010) estão: sonolência, tendência das aves amontoarem-se junto à fonte de
233 calor, anorexia severa, polidipsia, retardo no crescimento, falhas no
234 empenamento, desidratação, diarreia, emplastamento das penas ao redor da
235 cloaca, cegueira, conjuntivite e morte súbita.

236 Com relação aos aspectos clínicos da salmonelose, podem ser
237 diferenciados quatro grupos distintos: 1- Gastroenterite com desinteria leve a
238 fulminante que pode ser acompanhada de náuseas, vômitos e febre baixa. É a
239 manifestação clínica mais comum da salmonelose; 2- Bacteremia e septicemia
240 sem sintomas gastrointestinais, caracterizada por picos de febre alta e
241 hemocultivos positivos. Está associada a sorotipos altamente invasivos como
242 *Salmonella Choleraesuis*; 3- Febre entérica que manifesta-se por meio de diarreia
243 acompanhada de febre baixa (exceto para febre tifóide); 4- Estado de portador em
244 que a bactéria está presente no intestino, porém o indivíduo permanece
245 assintomático. Ocorre em indivíduos que foram infectados previamente e
246 sobreviveram a doença, sendo que esse estado pode estender-se por até 1 ano
247 (KONEMAN *et al.*, 2001).

248 As aves silvestres podem ser muito sensíveis as espécies de *Salmonella* e
249 algumas infecções resultam em lesões de diversos órgãos e sistemas podendo
250 inclusive levar ao óbito (PENNYCOTT *et al.*, 2006). Lesões generalizadas em
251 diversos órgãos são resultantes de septicemia. Enterites severas com congestão
252 e necrose do intestino podem ocorrer. Dependendo da duração das lesões, a ave
253 infectada pode apresentar perda de peso e atrofia da musculatura peitoral.
254 Congestão, hemorragias e foco necrótico podem ser observados em pulmão, rim,
255 baço, fígado, tecido subcutâneo, músculo peitoral e cérebro. Devido ao intenso
256 processo inflamatório, pode haver deposição de fibrina no pericárdio, peritônio e
257 sacos aéreos. Em infecções crônicas podem ser observadas artrites, bursites,
258 tenossinovites, aerosaculites e osteomielite multifocal (DAOUST e PRESCOTT,
259 2007).

260

261

262

263 **2.5 Diagnóstico**

264 Ainda que provas sorológicas possam fornecer evidências da infecção por
265 *Salmonella*, a cultura bacteriana é considerada o padrão ouro, permitindo tanto o
266 isolamento quanto a identificação, mas é uma técnica que requer certo período de
267 tempo.

268 Diversos são os meios de cultura disponíveis, tanto na forma de Ágar, para
269 realização do isolamento, como na forma de caldos para enriquecimento. Dentre
270 esses caldos, os mais utilizados e recomendados são: Tetrionato, Selenito e
271 Rappaport-Vassiliadis, entanto, cada um desses possuem vantagens e
272 desvantagens. O Tetrionato pode inibir alguns sorotipos se o inóculo for
273 demasiadamente pequeno, o Selenito é tóxico para alguns sorotipos como
274 *Salmonella Choleraesuis*, enquanto o Rappaport-Vassiliadis permite uma baixa
275 recuperação de *Salmonella* do subgrupo III. Desse modo, a utilização paralela de
276 dois caldos de enriquecimento aumenta as chances de recuperação do patógeno
277 (MITCHELL e SHANE, 2000).

278 Com relação aos meios para isolamento, existem os considerados de baixa
279 seletividade como Ágar MacConkey, Ágar Eosina Azul de Metileno e Ágar Verde
280 Brilhante que são utilizados para o desenvolvimento de uma ampla gama de
281 micro-organismos e aqueles que são descritos como de alta seletividade: Ágar
282 Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), Ágar Xilose-Lisina-Tergitol 4 (XLT4), Ágar
283 *Salmonella-Shigella* (SS) e Ágar Rambach utilizados para selecionar as espécies
284 que serão isoladas, impedir o crescimento de micro-organismos indesejados e
285 promover mudança na coloração das colônias das bactérias possibilitando a
286 distinção de vários gêneros e espécies de micro-organismos (KONEMAN *et al.*,
287 2001; MITCHELL e SHANE, 2000). Diante da relativa abundância de caldos de
288 enriquecimento e meios para isolamento, muitas são as combinações e
289 metodologias possíveis, não se observando a utilização de uma metodologia
290 universal, mas sim diferentes combinações de meios de cultura.

291 Outra técnica bastante empregada para identificação de *Salmonella* é a
292 PCR, que permite realizar várias cópias de um segmento específico de DNA com
293 rapidez e precisão em um tempo muito menor. É uma técnica que identifica
294 quantidades mínimas do micro-organismo presente na amostra, e é possível fazer
295 a identificação dos sorotipos específicos (DILMAGHANI *et al.*, 2011).

296 A amplificação de DNA na técnica de PCR envolve três etapas, cada uma
297 repetida muitas vezes. Essas etapas incluem: Etapa 1 – Desnaturação, a dupla
298 fita é aberta, tornando-se uma fita única. Etapa 2 - Anelamento: Após a separação
299 das fitas, um par de iniciadores ou *primers* complementam a fita oposta da
300 sequência de DNA a ser amplificada. Etapa 3 – Extensão: Com o molde já
301 identificado, a enzima DNA-polimerase adiciona as bases complementares,
302 formando uma nova fita de DNA.

303 Hidasí (2013) observou que os resultados positivos foram mais frequentes
304 na análise por PCR em relação aos resultados obtidos pela bacteriologia
305 convencional, alegando que resultados negativos na cultura bacteriana podem
306 estar correlacionados com um alto número de células de *Salmonella* spp. não
307 cultiváveis ou mortas, interferindo no crescimento das colônias bacterianas, ou
308 ainda que os meios de enriquecimento bacteriano utilizados podem diminuir a
309 sensibilidade da técnica bacteriológica, o que pode justificar a maior positividade
310 na técnica molecular.

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323 **3. OBJETIVOS**

324

325 **3.1 Objetivo Geral**

326 Detectar a presença de *Salmonella* spp. em psitacídeos provenientes do
327 estado de Mato Grosso do Sul, enviadas ao Centro de Reabilitação de Animais
328 Silvestres (CRAS) em Campo Grande.

329 **3.2 Objetivos Específicos**

- 330 • Avaliar a frequência de infecção dos psitacídeos na chegada, durante a
331 quarentena e nos recintos de convívio coletivo.
- 332 • Comparar a eficiência dos métodos de diagnóstico: empregando cultura
333 bacteriana e reação em cadeia da polimerase.
- 334 • Propor medidas preventivas mais efetivas para reduzir a circulação desse
335 patógeno em ambiente de cativeiro.

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349 **4. REFERÊNCIAS**

- 350 ALEGRETTI, L. **Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp.**
351 ***Bifidobacterium* spp. *Enterococcus* spp. *Pediococcus* spp. e *Lactococcus***
352 **spp. da microbiota intestinal de Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*).**
353 2009. 102f. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e
354 Zootecnia da Universidade de São Paulo).
- 355 BACK, A. Manual de doenças de aves. 2ª edição. Cascavel-PR: **Editora**
356 **Integração**, 2010. 311p.
- 357 CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente** N° 489/2018 – Define as
358 categorias de atividade ou empreendimentos e estabelece critérios gerais para a
359 autorização de uso e manejo, em cativeiro, da fauna silvestre e da fauna exótica.
360 DOU n° 69, de 29/10/2018, seção 01, página 117, 2018.
- 361 Cubas, Z.S., Silva, J.C.R., Catão-Dias, J.L. **Tratado de animais selvagens:**
362 **Medicina veterinária**. 2 edição. São Paulo: Roca; 2014. 1172-1174p.
- 363 DAOUST, P.Y.; PRESCOTT, J.F. Salmonellosis. In: THOMAS, N.J.; HUNTER,
364 D.B.; ATKINSON, C.T. (Eds.). **Infectious diseases of wild birds**. Ames, Iowa:
365 Blackwell, 2007. c.13, p.270-288.
- 366 DILMAGHANI, M.; AHMADI, M.; SALERI, T. Z.; TALEBI, A. The analysis of *groEL*
367 gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from avians by PCR-
368 Restriction fragment length polymorphism method. **Veterinary Research**
369 **Communications**, v. 35, p.133-143, 2011.
- 370 DONGEN, W.F.D.V.; WHITE, J.; BRANDL, H.B.; MOODLEY, Y.; MERKLING, T.;
371 LECRAIRE, S.; BLANCHARD, P.; DANCHIN, E.; HATCH, S.A.; WAGNER, R.H.
372 Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. **BMC**
373 **Ecology**, v. 13, p. 11, 2013.
- 374 FRAZÃO, L. A. **Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de**
375 **susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a**
376 **caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da**
377 **microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil.**
378 2014. 104f. (Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
379 da Universidade de São Paulo).
- 380 FRIEND, M. "Bacterial Diseases (Field Manual of Wildlife Diseases)" (1999).
381 **Other Publications in Zoonotics and Wildlife Disease**. Paper 12.
- 382 GOPEE, N.V.; ADESIYUN, A.A.; CAESAR, K. Retrospective and longitudinal
383 study of salmonellosis in captive wildlife in Trinidad. **Journal of wildlife diseases**,
384 v. 36, n. 2, p. 284-293, 2000.
- 385 HIDASI, H. W. **Detecção de *Salmonella* sp., *Mycoplasma* spp. e *E. coli* de**
386 **aves sinantrópicas da região metropolitana de Goiânia-Goiás**. 2013. 116f.
387 (Tese de Doutorado – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da
388 Universidade Federal de Goiás).
- 389 HIRSH, D.C.; MACLACHLAN, N.J.; WALKER, R.L. **Veterinary microbiology**, 2nd
390 Edition. Massachusetts: Wiley-blackwell. 536p. 2004.
- 391 ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best practice and**
392 **research clinical gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

- 393 ISSENHUTH-JEANJEAN, S., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, M.,
394 GUIBOURDENCHE, M., PINNA, E., NAIR, S., FIELDS, P.I., WEILL, F.X.
395 Supplement 2008 e 2010 (no. 48) to the Whitee Kauffmanne Le Minorscheme,
396 **Research in Microbiology**, 2014.
- 397 KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; VOLFF, J.;
398 FALDYNA, M.; ONDRACKOVA, P.; KUMMER, V.; RYCHLIK, I. Influence of 5
399 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with
400 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **BMC Microbiology**, v.10, n.72, p.1-11,
401 2010.
- 402 KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.;
403 WINN J.R., W.C. **Diagnóstico microbiológico** – texto e atlas colorido. 5 edição.
404 Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.
- 405 MARIETTO-GONÇALVES, G.A; ALMEIDA, S.M.; LIMA, E.T.; OKAMOTO,A.S.;
406 PEDRO, P.; FILHO R.L.A. Isolation of *Salmonella entérica* Serovar Enteritidis in
407 Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*). **Avian Diseases**, v.54, n.1,
408 p.151-155, 2010.
- 409 MITCHEL, M. A.; SHANE, S. M. Preliminary findings *Salmonella* spp. in captive
410 green iguana (*Iguana iguana*) and their environment. **Preventive Veterinary**
411 **Medicine**, v. 45, p. 279-304, 2000.
- 412 OCHOA, I.M.F.; RODRIGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidade
413 de *Salmonella* sp. **Review Article**, v.47, n.1-2, p.25-42, 2005.
- 414 OLIVEIRA, A.P; SOLA, M.C; FEISTEL, J.C; MOREIRA, N.M; OLIVEIRA, J.J.
415 *Salmonella enterica*: genes de virulencia e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia**
416 **Biosfera, centro científico conhecer – Goiânia**, v.9, n.16, p. 1947, 2013.
- 417 PENNYCOTT, T. W.; PARK, A.; MATHER, H. A. Isolation of different serovars of
418 *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003.
419 **Veterinary record**, v. 158, p. 817-820, 2006.
- 420 SILVA, M. A.; MARVULO, M. F. V.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. A importância da
421 ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde
422 pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa veterinária**
423 **brasileira**, v. 30, n. 7, p. 573-580, 2010.
- 424 SMITH, W. A.; MAZET, J. A. K.; HIRSH, D. C. *Salmonella* in California wildlife
425 species: Prevalence in Rehabilitation centers and characterization of isolates.
426 **Journal of zoo and wildlife medicine**, v. 33, n. 3, p. 228-235, 2002.
- 427 THORNLEY, C.N.; SIMMONS, G.C.; CALLAGHAN, M.L.; NICOL, C.M.;BAKER,
428 M.G.; GILMORE, K.S.; GARRET, N.K.G. First incursion of *Salmonella*
429 Typhimurium DT 160 into New Zealand. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.4,
430 p.493-495, 2003.
- 431 VAN ASTEN,A.J.A.M.; VAN DIJK,J.E. Distribution of "classic" virulence factors
432 among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v.44,
433 n.3, 251-259, 2005
- 434 VIGO, G.B.; ORIGLIA, J.; GORNATTI, D.; PISCOPO, M.; SALVE, A.;CAFFER,
435 M.I.; PICHEL, M.; BINSZTEIN, N.; LEOTTA, G.A. Isolation of *Salmonella*
436 Typhimurium from dead blue and gold macaws(*Ara ararauna*). **Avian Diseases**,
437 v.53, n.1, p.135-138, 2009.

438 WISE, M. G.; SIRAGUSA, G. R.; Quantitative analysis of the intestinal bacterial
439 community in one-to three-week-old commercially reared broiler chickens fed
440 conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. **Journal of Applied**
441 **Microbiology**, v.102, p. 1138-1149, 2007.

442 XENOULIS, P. G.; GRAY, P. L.; BRIGHTSMITH, D.; PALCULICT, B.; HOPPES,
443 S.; STEINER, J. M.; TIZARD, I.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular characterization
444 of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. **Veterinary microbiology**, v.
445 146, p. 320-325, 2010.

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464 **CAPÍTULO 2**

465 **DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. EM PSITACÍDEOS DE UM CENTRO DE**
466 **REABILITAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES EM CAMPO GRANDE, MATO**
467 **GROSSO DO SUL E COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

468 **DETECTION OF *Salmonella* spp. IN PSITTACINES OF A WILDLIFE**
469 **REHABILITATION CENTER IN CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL**
470 **AND COMPARISON OF DIAGNOSTIC TECHNIQUES**

471 Michelli Lopes de Souza¹, Lucas Bezerra da Silva Azuaga², Cláudia Regina Macedo Coutinho Netto²,
472 Mateus Lotério Coelho³, Angélica Oliveira³, Carlos Alberto do Nascimento Ramos⁴

473 ¹ Mestranda - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e
474 Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

475 ² Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – PMCG – Campo Grande, MS.

476 ³ Alunos de graduação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato
477 Grosso do Sul.

478 ⁴ Docente - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

479

480 **RESUMO**

481 Em busca de informações sobre a importância das aves silvestres na transmissão de
482 agentes patogênicos, teve-se o intuito de investigar a presença de *Salmonella* spp. em
483 psitacídeos mantidos no centro de reabilitação de animais silvestres (CRAS) de Campo
484 Grande, MS e comparar a eficiência das técnicas de diagnóstico. Foram coletadas 379
485 amostras de *swabs* cloacais de psitacídeos em seus recintos de permanência no CRAS,
486 dentre estes, no momento de entrada da ave no CRAS, no recinto de quarentena e nos
487 recintos de convívio coletivo das aves. As amostras coletadas foram submetidas à cultura
488 bacteriana, as quais foram negativas para o isolamento de *Salmonella* spp. e Reação em
489 Cadeia da Polimerase (PCR) que apresentou resultado positivo em 1,05% (4/379) das
490 amostras, sendo três no momento de chegada das aves ao CRAS e uma no recinto de
491 quarentena. Os resultados sugerem que mesmo com uma baixa frequência, as aves podem
492 ser reservatórios para *Salmonella* spp., e seu potencial disseminador não deve ser
493 desprezado.

494 **Palavras-chave:** Aves Silvestres, Cultura bacteriana, Doenças infecciosas, PCR,
495 Salmonelose.

496

497

498 ABSTRACT

499 In search of information about the importance of wild birds in the transmission of
500 pathogens, the present study aimed to detect the *Salmonella* spp. presence in birds kept at
501 the Wild Animal Rehabilitation Center (CRAS) in Campo Grande, MS and also compare
502 the diagnostic techniques efficiency for this microorganism. 379 samples of Cloacal swabs
503 were collected of the psittacines in the CRAS-MS enclosures. The enclosures were, arrival,
504 quarantine and collective enclosure. The samples were submitted to bacterial culture,
505 which were negative for the isolation of *Salmonella* spp., and Polymerase Chain Reaction
506 (PCR) which showed positive results in 1.05% (4/379) of the samples, being three at the
507 momento f the arrival of the birds to the CRAS-MS and one in the quarantine enclosure.
508 The results suggest that even with a low frequency, the birds can be reservoirs of
509 *Salmonella* spp., and its potential disseminator should not be despised.

510 **Key-words:** Bacterial culture, Infectious diseases, PCR, Salmonellosis, Wild birds.

511

512 INTRODUÇÃO

513 Nas últimas décadas houve uma crescente procura para a criação de animais
514 silvestres como animais de companhia e dentre estes destacam-se os psitacídeos, que são
515 conhecidos por serem sociáveis, inteligentes, terem uma coloração exuberante e por sua
516 capacidade em imitar sons (CUBAS *et al.*, 2014).

517 As aves de vida livre são potenciais carreadoras de patógenos para animais criados
518 em cativeiro e em ambientes domésticos, por serem consideradas um importante
519 reservatório de *Salmonella* spp. na natureza (CORRÊA *et al.*, 2013), o que demonstra a
520 importância sanitária que esses animais apresentam para o meio ambiente e para o homem,
521 porém sua frequência é considerada baixa quando comparada às outras espécies, como
522 répteis e mamíferos (ALLGAYER *et al.*, 2009). Em aves silvestres o sorotipo mais isolado
523 é *Salmonella* Typhimurium (VIGO *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2018).
524 Aves clinicamente sadias podem ser portadoras de *Salmonella*, e eliminar
525 intermitentemente nas fezes quando em condições de estresse ou imunodepressão tornando
526 possível a ocorrência de resultados falsos-negativos nas análises microbiológicas
527 (DLUGOSZ *et al.*, 2015). Apesar da baixa frequência de isolados de *Salmonella* em aves
528 silvestres, quando um grande número de aves está confinada em um mesmo local, um
529 potencial risco para a saúde do ser humano e dos demais animais pode ocorrer (VAZ *et al.*,
530 2015). Objetivou-se com o presente trabalho detectar a presença *Salmonella* spp. em

531 psitacídeos recebidos e mantidos em cativeiro em Mato Grosso do Sul e comparar a
532 eficiência dos métodos de diagnóstico: cultura bacteriana e PCR.

533

534 **METODOLOGIA**

535 Foram coletadas amostras de aves silvestres, mais precisamente psitacídeos,
536 provenientes de ações de apreensão, resgate ou entrega voluntária ao Centro de
537 Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) de Campo Grande-MS no período de
538 Novembro de 2017 a Julho de 2018. Para tanto, o projeto recebeu autorização do SISBio
539 (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) número 59465-1 de acordo com
540 o art. 28 da IN 03/2014, CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais)/UFMS protocolo
541 N° 898/2017 e SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do
542 Conhecimento Tradicional Associado) sob o código de acesso A763D91.

543 Como amostras clínicas foram coletados *swabs* cloacais dos animais em estudo por
544 Médicos Veterinários devidamente habilitados, com experiência na contenção de animais
545 silvestres. Para contenção e imobilização foram utilizados puçás e luvas de couro e a
546 identificação das aves foi realizada por anilhas numeradas. A escolha dos animais ocorreu
547 de acordo com a disponibilidade da instituição e não incluiu animais em tratamento com
548 antimicrobianos.

549 Após a coleta, as amostras foram devidamente identificadas e acondicionadas em
550 meio de transporte de Stuart e em caixas térmicas contendo gelo reciclável, para envio ao
551 laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
552 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Chegando ao laboratório, as amostras foram
553 imediatamente processadas.

554 As coletas foram realizadas de acordo com o recinto que as aves se encontravam.
555 Foram feitas coletas de aves que deram entrada no CRAS-MS no período estudado, coletas
556 de aves que estavam no recinto de quarentena e coletas de todo o grupo de aves em cada
557 recinto coletivo.

558 Após a coleta das amostras biológicas, foram coletados dados clínicos e
559 epidemiológicos (espécie, procedência, idade, condições corporais e comportamentais) de
560 cada animal amostrado. Os dados clínicos foram obtidos por meio de exame físico dos
561 animais amostrados pelos médicos veterinários do CRAS-MS, já as informações
562 epidemiológicas foram coletadas por meio da análise das fichas de recebimento das aves
563 no CRAS-MS. Um total de 379 amostras, provenientes de 258 aves foram obtidas.

564 Como o centro de reabilitação de animais silvestres é um centro que recebe animais
565 de todo o estado de Mato Grosso do Sul, as amostras foram provenientes de diversos
566 municípios deste estado (Campo Grande, Camapuã, Jardim, Nova Andradina, Rio Negro,
567 Três Lagoas e Bonito).

568 Para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp., as amostras foram submetidas
569 à três diferentes técnicas de bacteriologia convencional.

570 A primeira técnica consiste em semeadura direta do *swab* sem pré-enriquecimento
571 em meio de baixa seletividade (Ágar MacConkey).

572 A segunda técnica consiste em pré-enriquecimento da amostra em água peptonada e
573 caldo Rappaport-Vassiliadis e posterior semeadura em meio de baixa seletividade (Ágar
574 MacConkey).

575 E a terceira técnica consiste em pré-enriquecimento da amostra em água peptonada
576 e caldo Rappaport-Vassiliadis e posterior semeadura em meio de alta seletividade (XLD e
577 Hektoen).

578 Os *swabs* cloacais foram semeados em Ágar MacConkey e inoculados em solução
579 de água peptonada e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 18-24 horas. Em
580 seguida, 1 mL desta solução foi transferida para um tubo contendo caldo Rappaport-
581 Vassiliadis que foi incubado a 37°C por 18-24 horas.

582 Após o período de crescimento inicial as amostras provenientes do cultivo em Ágar
583 MacConkey foram avaliadas quanto à morfologia de colônias e pela coloração de Gram.

584 Após o enriquecimento seletivo em caldo Rappaport-Vassiliadis, as amostras foram
585 plaqueadas em três diferentes meios de cultivo: Ágar MacConkey, Ágar XLD e Ágar
586 Hektoen e incubadas a 37°C por mais 18-24 horas.

587 Foi observado se houve crescimento bacteriano e se apareceu alguma colônia com
588 morfologia sugestiva de pertencer ao gênero *Salmonella*. As colônias sugestivas foram
589 analisadas quanto as suas características morfotintoriais (coloração de Gram) e bateria de
590 provas bioquímicas específicas para enterobactérias utilizando Ágar TSI (Triplo Açúcar
591 Ferro), SIM (Sulfureto, Indol, Motilidade), Citrato de Simmons, Lisina descarboxilase,
592 Fenilalanina e Uréia.

593 Para a análise em PCR, os tubos contendo caldo Rappaport-Vassiliadis foram
594 centrifugados a 3.500 rpm por 30 minutos, descartou-se o sobrenadante e alíquotas de
595 500µL foram resuspendidas e armazenadas em microtubos de 2mL. As amostras foram
596 congeladas a -20°C e posteriormente processadas por Reação em Cadeia da Polimerase
597 (PCR). As amostras foram submetidas à extração de DNA de acordo com (ARAÚJO *et al.*,

598 2009), utilizando 500 µL de volume da amostra. A reação de PCR foi realizada para o gene
599 *fliC* (*flagelin gene*) com os *primers* *fliC-F* (5'-CCTGTCGCTGTTGACCCAGA-3') e *fliC-*
600 *R* (5'-GAGAGGACGTTTTGCGGAACC-3'). Os *primers* foram desenhados com o
601 auxílio do programa Primer-Blast (YE *et al.*, 2012) para reconhecer as extremidades 5' e 3'
602 do gene, conservadas no gênero *Salmonella* spp., delimitando um fragmento de
603 aproximadamente 1400 *pb*. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 25µL
604 contendo 2,5µl de tampão 10x (20 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl), 1,5 mM de
605 MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfatado, 10 pmol de cada *primer*, 1,5 U de
606 *Taq*DNA polimerase (Ludwig Biotec®) e aproximadamente 100ng de DNA genômico. A
607 termociclagem foi realizada como descrito a seguir: desnaturação inicial a 95°C por 3 min,
608 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 90 seg, anelamento a 57°C por 30 seg, e extensão a
609 72°C por 90 seg. Uma etapa de extensão final a 72°C por 2 min foi realizada. Os produtos
610 amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% e após purificados conforme
611 instruções do fabricante, com o kit *Clean Sweep PCR Purification Reagent* (Thermo Fisher
612 Scientific®) foram sequenciados em ambas as direções pelo método de Sanger em
613 sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems®). Os cromatogramas foram
614 avaliados com o auxílio do programa BioEditv.7.2.5 (HALL, 1999), e as sequências
615 consenso submetidas à busca por homologia com o programa BLASTn (ALTSCHUL *et*
616 *al.*, 1990).

617 A comparação entre as frequências de infecção (chegada, quarentena e recinto
618 coletivo) bem como a comparação entre as metodologias de diagnóstico para avaliar a
619 sensibilidade frente às técnicas de Cultivo Bacteriano e PCR foram realizadas por meio de
620 estatística descritiva e análise exploratória de dados.

621

622 **RESULTADOS**

623 Dentre as espécies de aves amostradas encontram-se Araras (*Ara chloropterus* e
624 *Ara ararauna*), Jandaia (*Eupsittula aurea*), Maracanã (*Diopsittaca nobilis*), Maitaca
625 (*Pionus maximiliani*), Papagaio Verdadeiro (*Amazona aestiva*) e Periquito de Encontro
626 Amarelo (*Brotogeris chiriri*) (Tabela 1).

627

628

629

630

631 Tabela 1: Número de aves coletadas de acordo com a espécie no CRAS

Espécie	Nome popular	Número Coletados	Número Positivos	Recinto Positivo
<i>Ara chloropterus</i>	Arara Vermelha	01	00	-
<i>Ara ararauna</i>	Arara Canindé	69	01	Entrada
<i>Eupsittula áurea</i>	Jandaia	07	01	Quarentena
<i>Diopsittaca nobilis</i>	Maracanã	02	00	-
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca	13	00	-
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio	90	00	-
<i>Brotogeris chiriri</i>	Periquito	76	02	Entrada
Total		258	04	

632

633 Dos 258 animais avaliados, 80 animais foram coletados em dois momentos, entre
634 entrada, quarentena e recinto coletivo e 17 foram coletados em três momentos, os demais
635 houve uma única coleta, obtendo-se 379 amostras.

636 Das 379 amostras processadas pelo exame bacteriológico convencional, nenhuma
637 apresentou resultado positivo para *Salmonella* spp., independente da metodologia utilizada.
638 Tanto em meios não seletivos que foram utilizados com o intuito de aumentar as chances
639 de recuperação do patógeno, quanto em meios seletivos, utilizados para selecionar a
640 espécie desejada e impedir o crescimento de contaminantes.

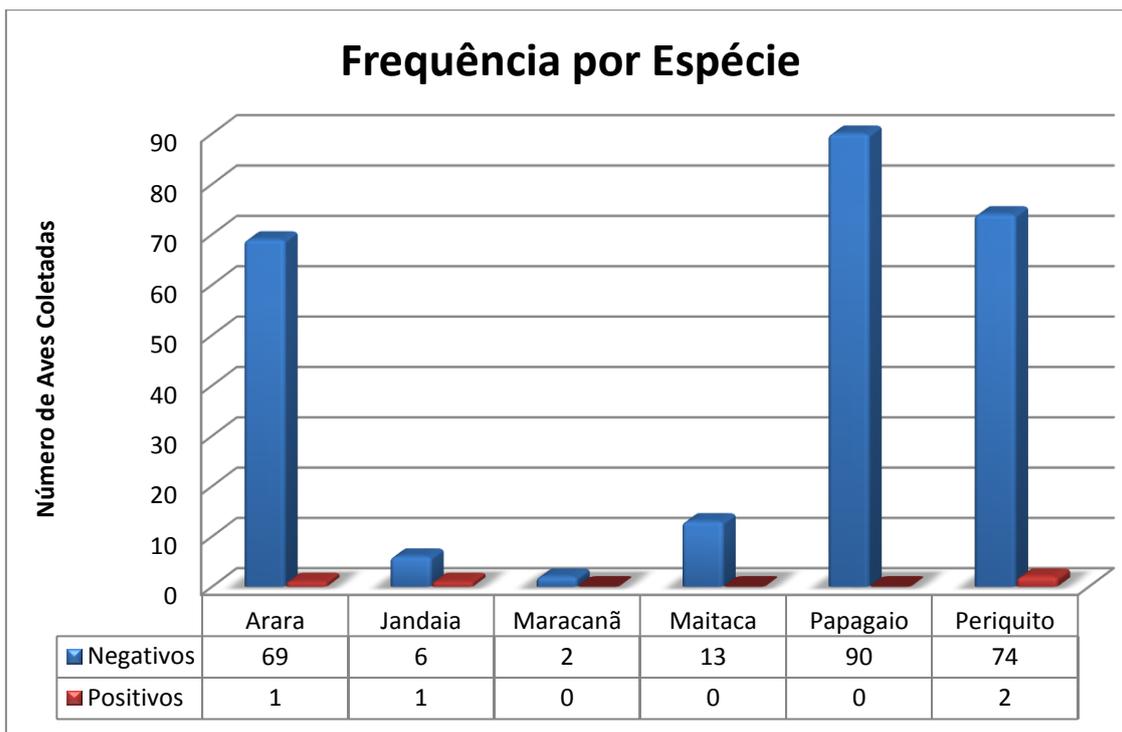
641 Foram encontradas colônias de *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Serratia* sp.,
642 *Citrobacter freundii*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Shigella* sp. e
643 *Morganella* sp.

644 Pela técnica de PCR, 1,05% (4/379) das amostras apresentaram amplificação
645 positiva para *Salmonella* spp.

646 Apesar das amostras processadas pela técnica de PCR serem oriundas de um pré-
647 enriquecimento bacteriano, confirmando, portanto a presença do micro-organismo, não foi
648 possível a identificação de *Salmonella* spp. por cultura bacteriana.

649 Considerando o total de aves analisadas separadas por espécie, foram positivas
650 1,42% das Araras (*Ara ararauna*) amostradas, 14,28% das Jandaias (*Eupsittula aurea*) e
651 2,63% dos Periquitos (*Brotogeris chiriri*) (Figura 1).

652



653

654 Figura 1: Comparativo entre positivos e negativos para *Salmonella* spp. entre as espécies
655 de aves estudadas.

656 Dentre as quatro aves identificadas positivas, três estavam eliminando *Salmonella*
657 no momento de sua entrada no CRAS e uma enquanto permanecia no recinto de
658 quarentena. Todos foram reavaliados no momento em que se encontravam no recinto
659 coletivo, e nenhuma deles apresentou novamente resultado positivo para *Salmonella*.

660 Foram coletadas amostras das aves em nove diferentes recintos, sendo a Entrada e a
661 Quarentena o local por onde todas as espécies também são recebidas e os Recintos
662 divididos por espécies, sendo: Recinto 10 (Papagaios), Recinto 11 (Araras), Recinto 13
663 (Papagaios), Recinto 17 (Periquitos, Maitacas, Maracanã e Jandaia), Recinto 20 (Araras),
664 Recinto 25 (Papagaios) e Recinto 26 (Araras). Exceto o momento de entrada e o recinto de
665 quarentena em que as coletas eram feitas de acordo com a chegada das aves, nos outros
666 recintos foi feita uma única coleta de todos os indivíduos que ali estavam.

667 Os momentos com maior frequência de aves positivas para *Salmonella* spp. foram
668 na entrada do animal no CRAS, com 75% das amostras positivas por PCR, e durante a
669 quarentena, com 25% das amostras positivas também por PCR.

670 A procedência dos animais avaliados abrange todas as regiões do estado de Mato
671 Grosso do Sul (Campo Grande, Camapuã, Jardim, Nova Andradina, Rio Negro, Três
672 Lagoas e Bonito), no entanto, os quatro animais positivos foram originários do município
673 de Campo Grande. Todos os animais apresentavam bom escore corporal e não

674 apresentavam comportamento compatível com domesticação. Com exceção da Arara
675 Canindé, que era jovem, todas as outras aves positivas eram adultas.

676 As coletas para o presente estudo estenderam-se por nove meses, entre novembro
677 de 2017 a julho de 2018. Porém, todas as aves positivas foram amostradas em novembro
678 de 2017.

679 As amostras amplificadas por PCR foram encaminhadas para sequenciamento e
680 apresentaram identidade com os seguintes sorotipos: Jandaia – *Salmonella* Javiana (busca
681 por homologia com 1142pb, 99% de cobertura e 99,91% de identidade); Periquito –
682 *Salmonella* Newport (busca por homologia com 1386pb, 99% de cobertura e 99,49% de
683 identidade) e *Salmonella* Javiana (busca por homologia com 1246pb, 100% de cobertura e
684 99,92% de identidade), e Arara Canindé – *Salmonella* Arizonae (busca por homologia com
685 474pb, 100% de cobertura e 93,05% de identidade).

686

687 **DISCUSSÃO**

688 Dentre os caldos seletivos mais utilizados e que possuem boas taxas de recuperação
689 de *Salmonella* spp. estão os caldos Rappaport-Vassiliadis, Tetrionato e Selenito (SAIF,
690 2003; CORRENTE *et al.*, 2004). Apesar da alta eficiência de recuperação do Caldo
691 Rappaport-Vassiliadis, no presente estudo ele não foi suficiente para garantir o isolamento
692 de bactérias do gênero *Salmonella* com auxílio de meios seletivos, ao passo que para a
693 identificação pela técnica de PCR, observou-se DNA de bactérias do gênero *Salmonella* no
694 caldo. A escolha por diferentes técnicas de isolamento e diferentes meios de cultura foi
695 feita em busca de uma maior eficiência na recuperação de *Salmonella* spp. nas amostras
696 coletadas.

697 Os meios XLD e Hektoen são meios de cultura indicados para o isolamento de
698 *Salmonella* spp. por sua seletividade e poder discriminatório, enquanto o Ágar MacConkey
699 possui menor seletividade porém maior poder de recuperação da bactéria. Em meios menos
700 seletivos há um grande crescimento de outras bactérias indesejáveis, o que pode dificultar
701 o isolamento de *Salmonella*. Os meios XLD e Hektoen, apesar de serem seletivos, não são
702 exclusivos para *Salmonella* spp. e também permitem o crescimento de outros micro-
703 organismos indesejáveis, dificultando a identificação das colônias de interesse. Devido à
704 dificuldade de recuperação, Mitchell e Shane (2000) e Lopes (2008) recomendaram a
705 utilização conjunta de meios menos seletivos, como MacConkey, e meios mais seletivos,
706 como XLD, pois em seus estudos, algumas colônias de *Salmonella* só foram observadas

707 em meios menos seletivos enquanto outras apenas em meios mais seletivos. E mesmo com
708 a associação dessas técnicas, não foi possível o isolamento de *Salmonella* nas amostras
709 avaliadas.

710 No isolamento de salmonelas oriundas de amostras clínicas, resultados negativos na
711 cultura bacteriana podem estar relacionados à ausência de células viáveis de *Salmonella*,
712 sua eliminação intermitente em baixo número, ou a inibição/competição com outros micro-
713 organismos devido ao crescimento de outras colônias bacterianas na cultura (ERIKSSON e
714 ASPAN, 2007). Além disso, meios de enriquecimento bacteriano podem diminuir a
715 sensibilidade da técnica bacteriológica, o que pode justificar a maior positividade na
716 técnica molecular.

717 Outros estudos em aves tiveram pouco sucesso em isolar *Salmonella* por
718 bacteriologia convencional (TEMELLI *et al.*, 2010; SOMMER *et al.*, 2012; CORRÊA *et*
719 *al.*, 2013; DLUGOSZ *et al.*, 2015), corroborando nossos resultados.

720 Outros micro-organismos identificados no presente estudo são compostos em sua
721 totalidade por bactérias Gram-negativas. Analisando dados da literatura observa-se que a
722 microbiota intestinal dos psitacídeos é composta principalmente por bactérias Gram-
723 positivas (XENOULIS *et al.*, 2010; FRAZÃO, 2014). No presente estudo utilizou-se meios
724 seletivos para bactérias Gram-negativas, e por isso o não isolamento de bactérias Gram-
725 positivas. Outra possível explicação é o fato de serem aves de cativeiro, uma vez que estas
726 apresentam quantidade de bactérias Gram-negativas significativamente mais abundante
727 que aves de vida livre (XENOULIS *et al.*, 2010).

728 A rapidez na identificação do agente etiológico através da detecção do seu material
729 genético, em comparação aos métodos bacteriológicos, faz com que a técnica de PCR se
730 torne uma alternativa prática aos laboratórios de diagnóstico, uma vez que este método
731 elimina o tempo de incubação, isolamento e testes bioquímicos em micro-organismos
732 permitindo uma identificação precisa, rápida e com custos reduzidos. Por ser uma técnica
733 altamente específica, a PCR pode detectar uma região única para a espécie e não apresentar
734 homologia com outros micro-organismos, também não é vulnerável a reações atípicas e
735 não depende de variações fenotípicas evitando, assim, resultados falso-negativos
736 fornecidos pela técnica microbiológica (ANDRADE *et al.*, 2010).

737 As técnicas moleculares vêm sendo usadas com sucesso na detecção de *Salmonella*,
738 inclusive de sorotipos específicos (DILMAGHANI *et al.*, 2011). A maior sensibilidade da
739 técnica molecular pode ser justificada por sua maior capacidade em detectar pequenas

740 quantidades de DNA dos microorganismos, mesmo que estes estejam inviáveis
741 (MALORNY *et al.*, 2004).

742 Das aves positivas para *Salmonella* no presente estudo, 75% foram identificadas no
743 momento da entrada no CRAS-MS. Esse é um período bastante estressante para o animal
744 devido ao processo de resgate/captura, e também devido às más condições de transporte,
745 restrição de água e alimentos que pode ter sofrido antes da captura. Nas aves, o estresse e a
746 imunodepressão estão na maioria dos casos relacionados ao aumento da ocorrência de
747 agentes patogênicos (ROCHA *et al.*, 2014). Os animais portadores de patógenos como a
748 *Salmonella* spp. podem atuar como disseminadores dentro de centros de triagem (JIJÓN *et*
749 *al.*, 2007). Além disso, na presença da doença clínica, os micro-organismos são eliminados
750 em grande quantidade, o que pode aumentar os riscos de contaminação ambiental. Dessa
751 forma, a ocorrência de imunodepressão pode representar um risco, uma vez que pode haver
752 o desenvolvimento de doenças com potencial zoonótico relevante e a maior taxa de
753 eliminação de micro-organismos potencialmente patogênicos no ambiente. Sendo assim,
754 animais que chegam ao CRAS-MS eliminando agentes patogênicos podem contaminar o
755 ambiente, desta forma, uma atenção especial deve ser dada aos animais nesses momentos.

756 O período de reprodução das aves ocorre entre a primavera e o verão, com o
757 aumento das chuvas e do calor (DANTAS, 2013). Além do período reprodutivo, todo o
758 processo de captura e transporte desses animais até o CRAS-MS desencadeiam o aumento
759 do estresse nas aves, que pode estar relacionado ao fato das amostras positivas serem
760 identificadas todas no mês de novembro e serem em sua maioria no momento de chegada
761 da ave.

762 Apesar de não ser possível a caracterização do sorotipo pelo não isolamento
763 microbiológico, pelo sequenciamento de DNA de um fragmento de aproximadamente
764 1000pb do gene *fliC* com uma identidade significativa ($\geq 99\%$) foi observada com os
765 sorotipos *Salmonella* Newport, *Salmonella* Javiana e *Salmonella* Arizonae. Esses sorotipos
766 são todos relacionados a casos de salmonelose em humanos, com doenças transmitidas por
767 alimentos, sendo *Salmonella* Newport o terceiro sorotipo mais associado com doenças
768 transmitidas por alimentos, e *Salmonella* Javiana o quarto (REDDY *et al.*, 2016). De
769 acordo com Daoust e Prescott (2007), existe uma correlação entre a prevalência de
770 *Salmonella* no trato intestinal de várias espécies de aves silvestres e sua proximidade com
771 humanos, produtos de origem animais e animais silvestres. Essas aves geralmente
772 aproveitam a proximidade com humanos e animais domésticos para obter comida e,
773 portanto, se infectam. Todas as aves positivas foram resgatadas na Cidade de Campo

774 Grande e não apresentavam comportamento de domesticação, entretanto, mesmo sendo
775 animais de vida livre, vivem em um ambiente urbano e sua aproximação com residências
776 são comuns e frequentemente também são alimentados pelos humanos. Essa aproximação
777 pode provavelmente infectar as aves com sorotipos não espécie-específicos.

778 No Mato Grosso do Sul, não existe muita informação sobre a ocorrência e
779 prevalência de sorotipos de *Salmonella* circulantes tanto entre animais quanto em
780 humanos. Entretanto, a região tem uma grande diversidade de répteis, mamíferos e aves,
781 além de um ecossistema (pantanal), que favorece a manutenção dos reservatórios de
782 *Salmonella*. Além do mais, com a crescente exploração do ecoturismo, o contato entre
783 humanos e animais, principalmente aves, tem aumentado, favorecendo a troca de
784 patógenos. Essa complexa relação interespecífica na região favorece a infecção de aves
785 silvestres por *Salmonella* spp.

786 Apesar de ter ocorrido um surto prévio de salmonelose por *Salmonella*
787 Typhimurium nos papagaios (*Amazona aestiva*) do CRAS-MS no ano de 2016 (SOUZA *et*
788 *al.*, 2018) e medidas de manejo terem sido adotadas e que podem ter ajudado a reduzir a
789 frequência de infecção das aves por *Salmonella*, a frequência encontrada no presente
790 estudo está dentro dos valores esperados para animais clinicamente sadios (MARIETTO-
791 GONÇALVES *et al.*, 2010; HIDASI *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2014). No entanto, nossos
792 resultados sugerem que a possibilidade de recontaminação ambiental no CRAS-MS é
793 considerável, tendo em vista que alguns animais recém chegados encontram-se eliminando
794 bactérias nas fezes. Se faz necessário a implementação de medidas preventivas
795 principalmente na recepção e quarentena desses animais.

796 Os pássaros, quando capturados e levados para o centro de reabilitação, podem
797 eliminar bactérias através das fezes, devido ao estresse da captura, contaminando o
798 ambiente e permitindo a infecção de outras aves e conseqüentemente ocorrência de surtos.
799 Assim, com base no observado no presente estudo, é recomendado que existam em centros
800 de reabilitação como o CRAS-MS, um período de quarentena com melhores instalações e
801 também um suporte para diagnóstico de *Salmonella* spp, para minimizar a probabilidade de
802 contaminação dos compartimentos coletivos, e possíveis surtos de salmonelose. Além
803 disso, o contato entre humanos e animais selvagens, seja em ambientes selvagens ou de
804 cativeiro, devem ser restringidos a profissionais qualificados, minimizando assim a troca
805 de patógenos, entre qual *Salmonella* spp.

806

807 CONCLUSÕES

808 A frequência de animais infectados encontrou-se dentro dos valores esperados para
809 um ambiente de cativeiro, porém, medidas preventivas devem continuar sendo tomadas e
810 mantidas devido ao risco de contaminação por animais recém chegados ao CRAS-MS. O
811 transporte e chegada do animal ao CRAS-MS é um momento de muito estresse o que leva
812 a eliminação de patógenos em maior quantidade. Portanto, um melhor manejo dos animais
813 no momento da entrada e da quarentena deve ser feito a fim de se evitar a entrada desses
814 micro-organismos para os demais recintos.

815 Mesmo a cultura bacteriana sendo o padrão ouro para identificação de *Salmonella*,
816 quando se trata de amostras clínicas, de aves saudáveis, a técnica de PCR mostrou-se mais
817 eficiente em detectar pequenas quantidades do micro-organismo e mais rápida no
818 diagnóstico.

819

820 AGRADECIMENTOS

821 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento
822 de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

823

824 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

825 ALLGAYER, M.C., OLIVEIRA, S.J., MOTTIN, V.D., LOIKO, M.R., FERNANDA
826 ABILLEIRA, F., GUEDES, N.M.R., PASSOS, D.T., WEIMER, T.A. Isolamento de
827 *Salmonella* Braenderup em arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Ciência Rural**,
828 v.39, p. 2542-2545,2009.

829 ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local
830 alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403- 410, 1990.

831 ANDRADE, R.B.; GEMELLI, L.P.; DALL ONDER, L.P.; CRISTINA, K.; BRITO, T.;
832 BARBOZA, A.A.L.; BRITO, B.G. Métodos diagnóstico para os patógenos alimentares
833 *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos Instituto**
834 **Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, 2010

835 ARAÚJO F.R, RAMOS C.A.N, LUIZ H.L, PÉRES I.A.H.F.S, OLIVEIRA R.H.M,
836 SOUZA I.I.F, RUSSI L.S. 2009. Avaliação de um protocolo de extração de DNA
837 genômico a partir de sangue total. **Embrapa Gado de Corte**, 5. (Embrapa Gado de corte.
838 Comunicado Técnico, 120).

- 839 CORRÊA, I.M.O, FLORES, F., SCHNEIDERS, G.H., PEREIRA, L.Q., BRITO, B.G.,
840 LOVATO, M. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de
841 *Salmonella* spp. em psitacídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.2, p.241-246, 2013.
- 842 CORRENTE, M.; MADIO, A.; FRIEDRICH, K. G.; GRECO, G.; DESARIO, C.;
843 TAGLIABUE, S.; D'INCAU, M.; CAMPOLO, M.; BUONAVOGLIA, C. Isolation of
844 *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. **Journal**
845 **of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 709-715, April 2004.
- 846 CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens:**
847 **Medicina veterinária**. 2 edição. São Paulo: Roca; 2014. 1172 - 1174.
- 848 DANTAS, T. **Ciclos anuais em aves de ambiente florestal: muda de penas e**
849 **reprodução** 2013. 51f. (Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Uberlândia).
- 850 DAOUST, P.Y.; PRESCOTT, J.F. Salmonellosis. In: THOMAS, N.J.; HUNTER, D.B.;
851 ATKINSON, C.T. (Eds.). **Infectious diseases of wild birds**. Ames, Iowa: Blackwell,
852 2007. chap.13, p.270-288.
- 853 DILMAGHANI, M.; AHMADI, M.; SALERI, T. Z.; TALEBI, A. The analysis of *groEL*
854 gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from avians by PCR-
855 Restriction fragment length polymorphism method. **Veterinary research**
856 **communications**, v. 35, p. 133-143, 2011.
- 857 DLUGOSZ, A.P., SANTIN, E., HAYASHI, R.M., LOURENÇO, M.C., SILVA, A.B.
858 Prevalência de *Salmonella* sp. em calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) mantidas em
859 cativeiro comercial. **Archives of Veterinary Science**. v.2, p. 155-160, 2015.
- 860 ERIKSSON, E.; ASPAN, A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for
861 *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. **BMC Veterinary**
862 **Research**, v.3, n.21, 2007.
- 863 FRAZÃO, L. A. **Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de**
864 **susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização**
865 **fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de**
866 **Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil**. 2014. 104f. (Tese de Doutorado –
867 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo).
- 868 HALL, R. E.; KESTLER, D. P.; AGARWAL, S.; GOLDSTEIN, K. M. Expression of the
869 monocytic differentiation/activation factor P48 in *Mycoplasma* species. **Microbial**
870 **Pathogenesis**, v.27(3), p.145-53, 1999.
- 871 HIDASI, H. W; NETO, J. H; MORAES, D. M. C; LINHARES, G. F. C; JAYME, V. S;
872 ANDRADE, M. A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance

- 873 in parrots seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**,
874 v.44, n. 1, p. 1-7, 2013.
- 875 JIJÓN, S.; WETZEL, A.; LEJEUNE, J. *Salmonella enterica* isolated from wildlife at two
876 Ohio rehabilitation centers. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 38, n. 3, p. 409-
877 413, 2007
- 878 LOPES, E. S.; CARDOSO, W. M.; ALBUQUERQUE, A. H.; TEIXEIRA, R. S. C.;
879 SALLES, R. P. R.; BEZERRA, W. G. A.; ROCHA E SILVA, R. C.; LIMA, S. V. G.;
880 SALES, R. J. P. F.; VASCONCELOS, R. H. Isolation of *Salmonella* spp. in captive
881 Psittaciformes from zoos and commercial establishment of Fortaleza, Brazil. **Arquivo**
882 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n.3, p. 965-968, 2014.
- 883 LOPES, L. F. L. *Salmonella* sp em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo:
884 frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as consequências para o
885 manejo em cativeiro e reintrodução. 2008. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -
886 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo,
887 2008.
- 888 MALORNY, B.; PACCASSONI, E.; FACH, P.; BUNGE, C.; MARTIN, A.; HELMUTH,
889 R. Diagnostic Real-Time PCR for detection of *Salmonella* in food. **Applied and**
890 **Environmental Microbiology**, v.70, n.12, p. 7046-7052, 2004.
- 891 MARIETTO-GONÇALVES, G.A; ALMEIDA, S.M.; LIMA, E.T.; OKAMOTO,A.S.;
892 PEDRO, P.; FILHO R.L.A. Isolation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis in Blue-
893 Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*). **Avian Diseases**, v.54, n.1, p.151-155, 2010.
- 894 MITCHEL, M. A.; SHANE, S. M. Preliminary findings *Salmonella* spp. in captive green
895 iguana (*Iguana iguana*) and their environment. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, p.
896 279-304, 2000.
- 897 REDDY, S. P; WANG, H; ADAMS, J. K; FENG, P. H. Prevalence and characteristics of
898 *Salmonella* serotypes isolated from fresh produce marketed in the United States. **Journal**
899 **of food production**, v. 79, n. 1, p. 6-16, 2016.
- 900 ROCHA, T. M; ANDRADE, M. A; SANTANA, E.S; FAYAD, A. R; MATIAS, T. D.
901 Aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos de doenças imunossupressoras em aves.
902 **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** – Goiânia, v. 10, n.18, p.355, 2014.
- 903 SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.;
904 SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State Press, 2003. 1231 p.

- 905 SOMMER, D.; ENDERLEIN, D.; ANTAKLI, A.; SCHONENBRUCHER, H.;
906 SLAGHUIS, J.; REDMANN, T.; LIERZ, M. *Salmonella* detection in poultry samples.
907 **Tierärztliche Praxis Großtiere**, v.6, p. 383-389, 2012.
- 908 SOUZA, M. L; AZUAGA, L. B. S; COUTINHO-NETTO, C. R. M; GOMES, D. C;
909 RAMOS, C. A. N; LEAL, C. R. B. Infecção Sistêmica por *Salmonella* Typhimurium em
910 papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
911 **Zootecnia**, V. 70, p. 637-640, 2018.
- 912 TEMELLI, S.; KAHYA, S.; EYIGOR, A.; CARLI, K.T. Incidence of *Salmonella*
913 Enteritidis in Chicken layer flocks in Turkey: Results by Real-time polymerase chain
914 reaction and international organization culture methods. **Poultry Science**, v.89, p. 1406-
915 1410, 2010.
- 916 Vaz, A.N., Armando, A.P., Ribeiro, A.R., Zancan, F.T., Brisola, M.L. Pesquisa de
917 *Salmonella* em mutuns (*Mitu mitu*) mantidos em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**.
918 v.16, p.68-72, 2015.
- 919 VIGO, G.B.; ORIGLIA, J.; GORNATTI, D.; PISCOPO, M.; SALVE, A.;CAFFER, M.I.;
920 PICHEL, M.; BINSZTEIN, N.; LEOTTA, G.A. Isolation of *Salmonella* Typhimurium
921 from dead blue and gold macaws (*Ara ararauna*). **Avian Diseases**, v.53, n.1, p.135-138,
922 2009.
- 923 XENOULIS, P. G.; GRAY, P. L.; BRIGHTSMITH, D.; PALCULICT, B.; HOPPES, S.;
924 STEINER, J. M.; TIZARD, I.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular characterization of the
925 cloacal microbiota of wild and captive parrots. **Veterinary microbiology**, v. 146, p. 320-
926 325, 2010.
- 927 YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.;
928 MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase
929 chain reaction. **BMC Bioinformatics**,v.13, p.134, 2012.
- 930
931
932
933
934
935
936
937
938

939

ANEXOS

940 Anexo 1

941 Autorização SISBio – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59465-1	Data da Emissão: 03/08/2017 09:22	Data para Revalidação*: 02/09/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carlos Alberto do Nascimento Ramos	CPF: 032.353.314-09
Título do Projeto: Avaliação da cinética de infecção de aves silvestres por Salmonella spp em um Centro de Reabilitação de animais Silvestres em Campo Grande, Mato Grosso do Sul	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	CNPJ: 15.461.510/0001-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta das amostras	10/2017	12/2017
2	Processamento das amostras (testes microbiológicos e moleculares)	10/2017	01/2018
3	Tabulação e análise dos dados	01/2018	08/2018
4	Divulgação dos resultados	08/2018	02/2019

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAMPO GRANDE	MS	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS) - MS	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Aves

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82765629



Página 1/4

942



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59465-1	Data da Emissão: 03/08/2017 09:22	Data para Revalidação*: 02/09/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carlos Alberto do Nascimento Ramos	CPF: 032.353.314-09
Título do Projeto: Avaliação da cinética de infecção de aves silvestres por Salmonella spp em um Centro de Reabilitação de animais Silvestres em Campo Grande, Mato Grosso do Sul	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	CNPJ: 15.461.510/0001-33

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes
2	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(Swab)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82765629



Página 2/4

943

944

945

946



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 59465-1	Data da Emissão: 03/08/2017 09:22	Data para Revalidação*: 02/09/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Carlos Alberto do Nascimento Ramos	CPF: 032.353.314-09
Título do Projeto: Avaliação da cinética de infecção de aves silvestres por Salmonella spp em um Centro de Reabilitação de animais Silvestres em Campo Grande, Mato Grosso do Sul	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL	CNPJ: 15.461.510/0001-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 82765629



Página 4/4

951
 952
 953
 954

955 **Anexo 2**

956 Autorização CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais/UFMS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da cinética de infecção de aves silvestres por *Salmonella spp.* em um centro de reabilitação de animais silvestres em Campo Grande, Mato Grosso do Sul", registrada com o nº 898/2017, sob a responsabilidade de **Carlos Alberto do Nascimento Ramos** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 9ª reunião ordinária do dia 18/10/2017.

Vigência do Projeto	1º/11/2017 a 28/02/2019
FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Número da Solicitação ou Autorização SISBIO	59465-1
Atividade (s)	Captura Coleta/transporte Amostras biológicas
Espécies/Grupos Taxonômicos	Psittacidae (Papagaio, Arara, Periquito e Maritaca) – Machos e Fêmeas 100
Local (is) de realização das atividades	Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – CRAS Campo Grande/MS


Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 19 de outubro de 2017.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7925

957

958

959 **Anexo 3**

960 Autorização SisGen – Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do
 961 Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A763D91

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A763D91**
 Usuário: **Carlos Alberto do Nascimento Ramos**
 CPF/CNPJ: **032.353.314-09**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Salmonella enterica

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE INFECÇÃO DE AVES SILVESTRES POR SALMONELLA SPP. EM UM CENTRO DE REABILITAÇÃO DE ANIMAIS SILVESTRES EM CAMPO GRANDE, MATO GROSSO DO SUL**

Equipe

Carlos Alberto do Nascimento Ramos	UFMS
Cassia Rejane Brito Leal	UFMS
Michelli Lopes de Souza	UFMS

Data do Cadastro: **28/05/2018 14:02:59**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:20** de **13/03/2019**.

