VIVIAN LINDMAYER FERREIRA

**Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*)
em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo**

São Paulo

2012

VIVIAN LINDMAYER FERREIRA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CERTIFICADO

**Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*)
em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso

São Paulo

2012

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO

032290

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2613
FMVZ

Ferreira, Vivian Lindmayer

Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo / Vivian Lindmayer Ferreira. -- 2012.

78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso.

1. Pombo. 2. *Chlamydophila psittaci*. 3. *Mycoplasma* spp. 4. *Salmonella* spp. 5. Paramixovírus aviário tipo 1. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Status sanitário de aves sinantrópicas (*Columbia sp* e *Zenaida sp*) residentes em áreas de armazenamento de grãos e sementes destinados ao consumo humano e avícola", protocolado sob o nº1605/2009, utilizando 360 (trezentos e sessenta) pombos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Sanitary status of sinantropic birds (*Columba sp* and *Zenaida sp*) residents in areas of storage of grains and seeds destined to the human and poultry consumption", protocol number 1605/2009, utilizing 360 (three hundred sixty) pigeons, under the responsibility Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 19 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Ministério do Meio Ambiente - MMA

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

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 18919-1	Data da Emissão: 23/03/2009 11:41	Data de Validade: 23/03/2010
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2483108	Nome: Tânia de Freitas Raso	CPF: 737.841.846-34
Título do Projeto: Status sanitário de aves sinantrópicas (Columba sp e Zenaida sp) residentes em áreas de armazenamento de grãos e sementes destinados ao consumo humano e avícola		
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP		CNPJ: 63.025.530/0019-33

Observações, ressalvas e condicionantes

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 passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. 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). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
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	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.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	Os procedimentos e métodos de eutanásia em animais deverão atender as resoluções específicas do Conselho Federal de Medicina Veterinária, RESOLUÇÃO CFMV Nº 714, DE 20 DE JUNHO DE 2002.
---	--

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO PAULO	SP	CEAGESP	Fora de UC
2	TATUI	SP	CEAGESP	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Columba, Zenaida
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Zenaida (*Qtde: 180), Columba (*Qtde: 180)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue, Animal morto ou partes (carcassa)/osso/pele, Fezes, Fragmento de tecido/orgão, Ectoparasita
2	Método de captura/coleta (Aves)	Puçã, Alçapão de rede

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
---	--------------------	--------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 26511891

Página 1/3

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERREIRA, Vivian Lindmayer

Título: Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho à Irene Lindmayer, pelo apoio
em todos os momentos dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Tânia de Freitas Raso pela orientação e comprometimento. Especialmente por me mostrar o universo de possibilidades que existe para quem se dedica e ama o que faz.
- À Irene Lindmayer e Tércio de Souza Ferreira, por estarem sempre ao meu lado.
- À toda minha querida família pelo apoio incondicional e compreensão pelos meus momentos de ausência.
- À Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo pelo auxílio nas capturas das aves.
- Ao Bruno Rogério Rui e Omar Gonzales pela sincera amizade e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.
- Ao Aparecido, Walter, Flaviano, Denis, Flávio, João, Raimundo e todos os demais funcionários da FMVZ/USP pelo auxílio no transporte das aves.
- Aos colegas de Departamento Marina Galvão Bueno, Catia Dejuste, Fabíola Prioste, Roseli, Alessandra Salles e Jean pela agradável convivência.
- Ao Professor Dr. Silvio Arruda Vasconcellos pelo auxílio na análise dos resultados.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido à realização deste trabalho (Processo 2010/01288-0).
- À BIOVET pelo fornecimento dos antígenos utilizados nas reações sorológicas.
- A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

FERREIRA, V. L. **Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo.** [Seasonal health status survey of feral pigeons (*Columba livia*) in areas used for the storage of grains and seeds in São Paulo State]. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Columbiformes sinantrópicos podem ter um importante papel na epidemiologia de patógenos com potencial zoonótico ou de impacto econômico para a indústria avícola. Dentre eles destacam-se: *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., paramixovírus aviário tipo 1 (APMV-1), inseridos no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) e a *Chlamydophila psittaci*, agente de uma das principais zoonoses relacionada com aves silvestres. Dentro desse contexto, este trabalho objetivou pesquisar, sazonalmente, a ocorrência destes patógenos em pombos-domésticos (*Columba livia*) em dois entrepostos no Estado de São Paulo. Ao longo de um ano, mensalmente 10 pombos foram capturados em cada entreposto para a colheita de amostras de suabe cloacal e sangue. A técnica de soroaglutinação rápida em placa (SAR) foi utilizada para a detecção de anticorpos anti-*M. synoviae*, anti-*M. gallisepticum* e anti-*S. Pullorum/Gallinarum*; para a confirmação dos sororeagentes foram utilizadas a prova de inibição da hemaglutinação e soroaglutinação lenta, respectivamente. Para a detecção do DNA de *C. psittaci* e RNA de APMV-1 foram utilizados métodos moleculares, PCR e RT-PCR. Para investigação de anticorpos anti-APMV-1 foi empregada a técnica de HI. Na SAR, 3,3% dos soros foram reagentes para *M. synoviae*; 2,5% para *M. gallisepticum* e 0,4% para *S. Pullorum/Gallinarum*. No entanto, essas amostras foram negativas nas técnicas confirmatórias. A ocorrência do APMV-1 não foi detectada. O DNA de *C. psittaci* foi detectado em 13,3% das amostras sendo 10,8% provenientes de aves capturadas na estação seca e 15,8% na estação chuvosa. Tais resultados são relevantes, pois demonstram que a *C. psittaci* ocorre em pombos presentes em áreas públicas frequentadas por um grande número de pessoas. Frente à escassez de pesquisas realizadas em Columbiformes no país, novos estudos são necessários para a determinação do real risco que pombos-domésticos podem representar quanto à transmissão de patógenos para aves comerciais e a influência da sazonalidade na disseminação desses microrganismos.

Palavras chave: Pombo, *Chlamydophila psittaci*, *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., paramixovírus aviário tipo 1.

ABSTRACT

FERREIRA, V. L. Seasonal health status survey of feral pigeons (*Columba livia*) in areas used for the storage of grains and seeds in São Paulo State [**Avaliação sazonal do perfil sanitário de pombos-domésticos (*Columba livia*) em áreas de armazenamento de grãos e sementes no Estado de São Paulo**]. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Columbiformes may play an important role in the epidemiology of pathogens with zoonotic potential or economic impact in the poultry industry. Among these pathogens there are *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., Avian Paramyxovirus type 1 (APMV-1), included in the National Poultry Health Program (PNSA) and *Chlamydophila psittaci*, etiologic agent of an important zoonosis associated with wild birds. Thus, the aim of this study was to investigate, seasonally, the occurrence of the pathogens listed above in feral pigeons (*Columba livia*) in two warehouses in São Paulo State. During one year, 10 birds were captured monthly in each locality and cloacal swabs and blood samples were collected from each pigeon. The rapid seroagglutination test was performed for the detection of antibodies against *M. synoviae*, *M. gallisepticum* and *Salmonella* Pullorum/Gallinarum. Positive results were submitted to the hemagglutination inhibition and slow seroagglutination test, respectively. For the *C. psittaci*'s DNA and APMV-1's RNA diagnosis, molecular techniques PCR and RT-PCR were performed. Hemagglutination inhibition test was also performed in order to detect antibodies against APMV-1. From the serum samples analyzed by rapid seroagglutination test, 3.3% were positive for *M. synoviae*, 2.5% for *M. gallisepticum* and 0.4% for *S. Pullorum/Gallinarum*. However, none of these samples was positive on the confirmatory tests. APMV-1 was not detected in any of the laboratory tests used. *C. psittaci*'s DNA was detected in 13.3% of the samples being, 10.8% from pigeons captured during the dry season and 15.8% in the rainy season. These results are relevant since they indicate that *C. psittaci* occurs in birds living in public areas frequented by a large number of people. The occurrence of the other pathogens was not detected. Nevertheless, due to lack of information about the pigeon's sanitary status in the country, additional researches are necessary to determine the risk that feral pigeons can pose in the transmission of pathogens for poultry and the influence of each season in the spread of these microorganisms.

Key words: Pigeons, *Chlamydophila psittaci*, *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., Avian paramyxovirus type 1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	A) Pombos (<i>C. livia</i>) alimentando-se dos restos de uma feira. B) Acúmulo de excretas de pombos em locais próximos ao trânsito de pessoas e comercialização de alimentos.....	34
Figura 2-	Pombos (<i>C. livia</i>) pousados em cima do telhado de um armazém de grãos na cidade de Tatuí - SP	35
Figura 3-	Armadilha utilizada para a captura de pombos (<i>C. livia</i>) na cidade de São Paulo (A) e Tatuí (B)	35
Figura 4-	A) Utilização de EPI (equipamento de proteção individual) para a manipulação dos pombos. B) Veículo utilizado para o transporte das aves (Notar que o motorista e os passageiros não ficam em contato com os animais que permanecem isolados na parte posterior da caminhonete)	36
Figura 5-	Pombo (<i>C. livia</i>): A) Colheita de suabe cloacal. B) Colheita de sangue da veia braquial.....	37
Figura 6-	Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos na PCR (300 pb) para a detecção de <i>C. psittaci</i> em amostras biológicas de pombos (<i>C. livia</i>)	46
Figura 7-	Médias mensais de chuvas ao longo de um ano em São Paulo.....	47
Figura 8-	Médias mensais de chuvas ao longo de um ano em Tatuí	47
Gráfico 1-	Número de machos e fêmeas de pombos (<i>C. livia</i>) capturados mensalmente nas cidades de São Paulo e Tatuí ao longo de um ano.....	43
Gráfico 2-	Resultados da soroglutinação rápida (SAR) realizada para detecção de anticorpos anti- <i>Mycoplasma synoviae</i> (MS), anti- <i>M. gallisepticum</i> (MG) e anti- <i>Salmonella Pullorum/Gallinarum</i> (SAL) em amostras de pombos capturados na cidade de São Paulo e Tatuí, SP ao longo de um ano	45
Gráfico 3-	Resultados positivos obtidos na reação em cadeia pela polimerase (PCR) realizada em amostras de suabes cloacais de pombos para a detecção de DNA de <i>C. psittaci</i> . A figura ilustra os resultados dos pombos capturados em São Paulo e Tatuí, SP ao longo de um ano.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Médias das temperaturas diárias ao longo de um ano em São Paulo e Tatuí..... 47
- Tabela 2 - Técnicas laboratoriais e resultados em percentual da pesquisa realizada em pombos (*C. livia*) no Estado de São Paulo frente aos patógenos: *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *Salmonella Pullorum*/ *Gallinarum*, Paramixovírus aviário tipo 1 e *Chlamydophila psittaci* 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APMV-1	Paramixovírus aviário tipo 1
APPA	Administração dos Portos de Paranaguá e Antonina
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CEAGESP	Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CVS	Centro de Vigilância Sanitária
DN	Doença de Newcastle
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HI	Inibição da hemaglutinação
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMbio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
Ig	Imunoglobulina
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
NASPHV	<i>National Association of State Public Health Veterinarians</i>
OIE	Organização Internacional de Epizootias
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogenionico
PIB	Produto Interno Bruto
pmol	Picomol
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPMV-1	<i>Pigeon paramyxovirus type 1</i>
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa
SAL	Soroaglutinação lenta
SAR	Soroaglutinação rápida em placa
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
VN	Vírus neutralização

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Entrepósitos de Armazenamento de Grãos.....	17
2.2	Aves sinantrópicas.....	18
2.3	<i>Mycoplasma spp</i>.....	20
2.4	<i>Salmonella spp</i>.....	23
2.5	Paramixovírus aviário tipo 1.....	26
2.6	<i>Chlamydophila psittaci</i>	30
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivos gerais.....	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Período e local do desenvolvimento do estudo	34
4.2	Colheita e armazenamento das amostras.....	36
4.3	Deteção de anticorpos anti-<i>Mycoplasma spp</i>.....	37
4.4	Deteção de anticorpos anti-<i>Salmonella spp</i>	38
4.5	Paramixovírus aviário do tipo 1.....	38
4.5.1	Extração do RNA viral	38
4.5.2	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>)	39
4.5.3	Síntese do cDNA - transcrição reversa do RNA viral.....	39
4.5.4	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	39
4.5.5	Eletroforese dos produtos amplificados	40
4.5.6	Deteção de anticorpos anti-APMV-1	40
4.6	Deteção de <i>Chlamydophila psittaci</i>	40
4.6.1	Extração de DNA.....	40
4.6.2	Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	41
4.6.3	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	41
4.6.4	Eletroforese dos produtos amplificados	41
4.7	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Pombos.....	43
5.2	<i>Mycoplasma spp.</i> e <i>Salmonella spp</i>.....	44

5.3	Paramixovírus aviário tipo 1.....	45
5.4	<i>Chlamydophila psittaci</i>	46
5.5	Análise estatística	49
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente é um dos maiores produtores de grãos do mundo e de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento a estimativa da produção para 2012 é de 159,20 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Entre os principais grãos cultivados encontra-se a soja, o arroz, o trigo e o milho, sendo parte dessa safra destinada à alimentação de animais de produção. Em 2007, a safra de milho foi superior à 35 milhões de toneladas e 25% dessa produção foi utilizada para a avicultura brasileira (NERY et al., 2007; CONAB, 2012).

A indústria avícola está diretamente ligada à economia do país, não só pelo consumo de uma parcela importante da produção nacional de grãos, mas também por empregar mais de 4,5 milhões de pessoas e responder por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. É um dos segmentos agropecuários com os melhores índices de produtividade. O Brasil é o terceiro produtor mundial de frangos de corte e líder em exportação, fornecendo carne para 142 países (BRASIL, 2012). A indústria avícola brasileira também é mundialmente reconhecida pela qualidade de sua produção e pela utilização de tecnologias sofisticadas. Tais fatos decorrem do intenso esforço dos órgãos governamentais e dos produtores em implementar métodos de vigilância sanitária e profilaxia de patógenos que possam comprometer a saúde das aves comerciais (SALLES; MORAES, 2009).

Um dos pontos-chaves das boas práticas agropecuárias é a adoção de ações que evitem a introdução e disseminação de microrganismos patogênicos no plantel comercial. Para tanto, a origem e a boa qualidade das rações, farelo de soja e outras farinhas são essenciais para assegurar uma alimentação que não veicule contaminação às aves de produção. Preconiza-se também a proteção das granjas para evitar a entrada de insetos, roedores e outras aves que possam atuar como vetores ou reservatórios de microrganismos patogênicos (CERUTTI, 2009).

Entre os microrganismos que podem ser transmitidos por aves infectadas estão os *Mycoplasma* spp., as *Salmonella* spp. e o paramixovírus aviário do tipo I (APMV-1), todos inseridos no Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 2009b). Este programa foi elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) visando o controle e erradicação de doenças relacionadas com a avicultura industrial. Outro agente importante relacionado com aves silvestres é a *Chlamydophila psittaci*, agente etiológico da psitacose, uma zoonose considerada rara, mas potencialmente fatal ao ser humano (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESEBROUCK, 1995).

O amplo espectro de hospedeiros aviários infectados pelos patógenos descritos indica a existência de um meio de transmissão comum inter e intra-espécies na natureza. Possivelmente existe uma variedade de mecanismos de transmissão responsáveis pela manutenção de uma determinada infecção em uma população, os quais podem ser dependentes do nicho ecológico e das adaptações comportamentais da espécie hospedeira (KALETA; BALDAUF, 1988; KALETA; TADAY, 2003; BENSKIN et al., 2009). Tal fato tem maior relevância quando focamos as aves da ordem Columbiformes (pombos, rolinhas), as quais vivem em grandes bandos, reproduzindo no Brasil até seis ninhadas por ano, sendo algumas espécies consideradas sinantrópicas em quase todo o país (SICK, 2001; NUNES, 2003).

No Estado de São Paulo estas aves tornaram-se sinantrópicas nocivas, pois interagem de maneira negativa com a população humana, causando-lhe transtornos de ordem econômica e riscos à saúde pública. A quantidade de pombos presentes em entrepostos, armazéns e silos utilizados para o comércio e armazenamento de produtos agropecuários, e em áreas portuárias, exemplifica essa problemática. Além disso, pessoas que frequentam um ambiente com alta densidade de pombos têm o risco de se infectarem com patógenos de potencial zoonótico. Na literatura mundial, existem diversos relatos de zoonoses adquiridas por pessoas após contato direto ou indireto com pombos e/ou suas excreções (HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004). Apesar disso, no Brasil ainda são poucos os estudos epidemiológicos sobre o perfil sanitário de espécies da Ordem Columbiforme em áreas urbanas.

Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil sanitário de Columbiformes em áreas de armazenamento e comercialização de grãos e sementes destinados ao consumo avícola e/ou humano. Para tanto alguns dos patógenos inseridos no PNSA foram selecionados e, em face do grande número de pessoas que frequenta esses locais diariamente, a ocorrência da bactéria *C. psittaci* nos pombos também foi pesquisada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Entrepósitos de Armazenamento de Grãos

A Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais do Estado de São Paulo (CEAGESP) é uma das principais empresas estatais brasileiras de abastecimento. A unidade da cidade de São Paulo é considerada um dos maiores centros de comercialização atacadista do mundo, com a movimentação mensal de 250 mil toneladas de frutas, legumes, verduras, pescados e flores. A rede de armazenagem, com silos horizontais, tem capacidade de estocagem superior a 1 milhão de toneladas de grãos, sementes e produtos peletizados. Instaladas junto à pólos de produção e consumo, as unidades de armazenagem estão interligadas à malha ferroviária e atingem todas as regiões do Estado de São Paulo. Além disso, recebem a produção não apenas deste Estado, mas também de Estados vizinhos, como Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás e Rio Grande do Sul (CEAGESP, 2012).

Em vista das grandes quantidades de frutas, verduras, carnes, grãos e sementes estocados e comercializados nestes locais, uma preocupação constante é a manutenção da boa qualidade desses produtos. Dentre os diversos fatores relacionados com a contaminação de produtos dessa natureza está a circulação de vetores e pragas urbanas. Define-se como praga urbana qualquer animal que infeste ambientes urbanos podendo causar agravos à saúde e/ou prejuízos econômicos (ANVISA, 2006). O pombo-doméstico (*Columba livia*) é considerado praga em diversas regiões do mundo, pois, devido à vasta oferta de alimento e abrigo, sua população nos centros urbanos é cada vez maior (MAGNINO et al., 2009).

No Estado de São Paulo, o Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconizam a adoção de ações preventivas e corretivas destinadas a impedir a atração, o abrigo, o acesso e a proliferação de pragas urbanas em locais de comercialização e armazenamento de alimentos, visando minimizar o risco à saúde dos trabalhadores, usuários e consumidor final (CVS, 2000; FUNASA, 2001). O porto de Paranaguá no litoral do Paraná, por exemplo, chegou a ser multado em 6,7 milhões de reais e indiciado pelo Ministério Público Federal por não limpar corretamente a área dos portos e as vias públicas em seu entorno (BRASIL, 2011). Contribuindo dessa forma para a manutenção das populações de pombos e roedores no local e oferecendo risco à saúde da comunidade. A partir de então foram estabelecidas medidas de higienização e reformas das instalações para

evitar a oferta de alimento e abrigo para esses animais. Segundo a Administração dos Portos de Paranaguá e Antonina (APPA) (2012), em seis meses a população de pombos, estimada em mais de 5 mil aves passou para menos de 1.000 indivíduos.

A adoção de medidas que minimizem a oferta de alimento e abrigo é essencial para o controle da população de animais sinantrópicos. No entanto, o estudo do perfil sanitário também contribui na implementação de medidas profiláticas eficazes para proteger a saúde de outros animais e/ou de seres humanos. Particularmente em grandes entrepostos, onde circulam milhares de pessoas por dia e cujos produtos são destinados para o consumo humano e animal.

2.2 Aves sinantrópicas

As principais aves sinantrópicas encontradas nas grandes áreas urbanas no Brasil são da Ordem Columbiformes, mais comumente o pombo-doméstico (*Columba livia*) e, em algumas regiões, os pombos-de-bando (*Zenaida auriculata*). Os Columbiformes têm vasta distribuição no planeta, são granívoros e frugívoros, com excelente capacidade de voo e convivem em bandos. O pombo-doméstico, proveniente da Europa, foi introduzido no Brasil por volta do século XVI como ave doméstica. Contudo, com o passar do tempo, exemplares que saíram do cativeiro se adaptaram à vida livre e atualmente são considerados sinantrópicos. Esta ave possui o hábito de nidificar em rochedos, razão de sua provável adaptação à vida em cidades, já que encontra edificações de estatura elevada (SICK, 2001); além disso, neste ambiente o número de predadores é reduzido.

Espécies de Columbiformes nativas como, por exemplo, a *Zenaida auriculata*, têm sido consideradas sinantrópicas no Estado do Paraná, em decorrência de fatores antrópicos, como alimentação abundante. Assim, passaram a se reproduzir de forma desordenada tornando-se um sério problema, tanto no meio urbano, quanto no meio rural (BUCHER; RANVAUD, 2006). Nas monoculturas de soja, por exemplo, além de consumir o grão, a ave ao pousar sobre a planta acaba quebrando seu caule, impossibilitando a coleta pelas máquinas, com consequente redução das plantas nascidas por metro de linha de cultivo, causando ainda mais prejuízos ao produtor (OKAWA et al., 2001).

De maneira geral os pombos são monogâmicos e realizam de duas a três oviposições por ano. Entretanto, quando recebem alimentação em abundância, podem aumentar a sua

capacidade reprodutiva para até seis posturas por ano, comprovando assim que o ciclo reprodutivo é influenciado pela oferta de alimento (SICK, 2001). Como essa oferta de alimentos é farta nas grandes cidades suas populações são cada vez maiores (NUNES, 2003).

No Brasil, apesar de não existirem estudos fidedignos que indiquem a quantidade exata dessas aves nos centros urbanos, cada vez mais os pombos estão se tornando alvo de pedidos de controle populacional pelos municípios aos Centros de Controles de Zoonoses (CCZ). O número de reclamações sobre pombos urbanos por parte de municípios da Grande São Paulo durante o ano de 2002 alcançou quase 50% do total de reclamações sobre roedores, considerados pelos CCZ's as de maior ocorrência dentre as pragas urbanas (SCHULLER, 2003). Além disso, ressalta-se a espantosa população de pombos existentes nos locais de armazenamento de grãos e sementes, como silos, entrepostos, armazéns, fábricas de rações e áreas portuárias. Em virtude deste aumento populacional, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) através de sua Instrução Normativa nº141, de 19/12/2006, regulamentou o controle e o manejo ambiental da fauna sinantrópica nociva (IBAMA, 2006), estando os pombos inseridos nesta lista.

Atualmente, locais com barracas de alimentos, comércio varejista e áreas de armazenagem, carregamento e descarregamento de grãos e sementes, tornaram pontos de frequente visita pelos pombos. Tal fato aumenta a probabilidade de contaminação de alimentos, grãos e sementes destinados ao consumo humano e animal. Além disso, por terem o hábito de se alimentarem no chão e pousarem em locais elevados, os pombos requerem um deslocamento constante do ponto de pouso até a região mais inferior. Este fenômeno provoca o bater de suas asas, aumentando e favorecendo o processo de suspensão de partículas secas, contendo pó, sujeira, fezes ressecadas destas aves e, porventura, agentes patogênicos (SCHULLER, 2003). Assim, a grande concentração de pombos em determinada área representa um risco para a saúde pública, seja de forma direta, através da inalação das excretas contaminadas; seja da forma indireta, por meio da contaminação de fontes de água, grãos e sementes destinados ao consumo animal, além de alimentos destinados ao consumo humano. Ademais, o acúmulo de fezes, penas e ninhos, pode levar ao entupimento de tubulações de drenagem de água da chuva, apodrecimento de forros de madeira e comprometimento de equipamentos, além das sujidades que as aves provocam, causando consideráveis e constantes prejuízos (NUNES, 2003).

Uma extensa revisão envolvendo doenças em pombos relaciona 60 patógenos encontrados, identificados e comprovadamente diagnosticados nestas aves (HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004). Alguns destes patógenos, como o *Mycoplasma* spp.,

Salmonella spp., Paramixovírus aviário tipo 1 e *C. psittaci* têm grande importância para a avicultura comercial e para saúde pública. No entanto, no Brasil, ainda são poucos os estudos realizados sobre o real risco que essas aves representam quanto à disseminação de patógenos para seres humanos e/ou outros animais.

2.3 *Mycoplasma* spp.

Mycoplasma spp. são bactérias que pertencem à Ordem *Mollicutes* e não apresentam parede celular. Por essa razão são naturalmente resistentes aos antibióticos que atuam impedindo a síntese da parede celular bacteriana. Assemelham-se em tamanho aos grandes vírus (cerca de 300nm) e são capazes de infectar animais, insetos e plantas. Existem aproximadamente 180 espécies descritas, a maioria de origem animal. Cerca de 25 espécies de micoplasmas já foram relatadas em aves, no entanto, pouco se sabe sobre o potencial patogênico da maioria desses microrganismos (GERLACH, 1994a; TIMENESKY, 2009). Em aves de interesse econômico (frango, galinhas e perus) quatro espécies são consideradas importantes como causadoras de doenças: *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. meleagridis* (KLEVEN, 2003; CFSPH, 2007; TIMENESKY, 2009).

Os micoplasmas estão distribuídos de forma cosmopolita, causando surtos da doença em diversos países, de tal modo que muitos destes incluem tais agentes em planos de controle e erradicação (KLEVEN, 2003). No Brasil, calcula-se que anualmente ocorra uma perda de 30 mil toneladas de carne de frango decorrente de problemas respiratórios na fase final de produção. Fato que gera prejuízos de 30 milhões de dólares, sendo o *M. gallisepticum* a espécie de micoplasma com o maior impacto econômico na avicultura industrial (METTIFOGO; BUIM, 2009; BUIM, 2012). Essa é uma das razões pela qual a micoplasmose está inserida no Programa Nacional de Sanidade Avícola do MAPA (BRASIL, 2009b).

Os micoplasmas podem ser transmitidos rapidamente pela via horizontal, através do contato direto ou indireto das aves susceptíveis com aves infectadas. As principais vias de entrada no hospedeiro são o trato respiratório e o genital. Outras formas de transmissão horizontal incluem o contato com fômites, poeira ou penas contaminadas. A transmissão vertical ocorre quando os sacos aéreos infectados entram em contato com o ovário (e com os folículos em desenvolvimento) (GERLACH, 1994a; LEY, 2003). Fatores externos podem influenciar a predisposição das aves à infecção pelos *Mycoplasma* spp., entre eles alta

densidade populacional, confinamento, ambientes fechados, extremos de temperatura, ar quente e seco e infecções respiratórias concomitantes (KLEVEN, 2003).

Em geral as doenças causadas por micoplasmas são crônicas, sendo os sinais clínicos e as lesões associados principalmente ao sistema respiratório, seguido do sistema articular. As doenças classicamente conhecidas em aves comerciais são: doença respiratória crônica das galinhas e sinusite infecciosa dos perus, causadas pelo *M. gallisepticum*; sinovite infecciosa causada pelo *M. synoviae*; e aerossaculite das aves causada por *M. gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. meleagridis* (LEY, 2003; KLEVEN, 2003; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). *M. iowae* acomete principalmente perus sendo normalmente assintomático em aves adultas, porém o maior impacto da infecção está na diminuição dos percentuais de eclodibilidade dos ovos (FIORENTIN, 2009).

Diversas técnicas laboratoriais podem ser realizadas para o diagnóstico das micoplasmoses aviárias. O isolamento de micoplasmas, de modo geral, é um procedimento que exige meios nutritivos específicos, laboratórios e pessoal especializado, além de representar um alto custo e consumir um tempo prolongado. Além disso, muitas vezes a presença de outros microrganismos de crescimento mais rápido (fungos e outras bactérias) prejudica o sucesso da cultura e o isolamento do agente (METTIFOGO; BUIM, 2009).

As técnicas sorológicas são úteis para o monitoramento dos plantéis e proporcionam um diagnóstico mais rápido quando há suspeita de infecção. Um teste sorológico reagente, associado ao histórico e sinais clínicos característicos permite a obtenção de um diagnóstico presuntivo enquanto o resultado do isolamento não for obtido (LEY, 2003).

A soroaglutinação rápida em placa (SAR) é um teste barato e rápido, sendo o de eleição para a triagem das amostras. É um teste de alta sensibilidade que detecta primariamente IgM. No entanto a especificidade da SAR é baixa em razão de diversos fatores inerentes ao soro e ao antígeno como, por exemplo, soro de aves previamente imunizadas e seleção da cepa para a produção do antígeno, respectivamente. Ainda, a relação antigênica de determinadas cepas de *Mycoplasma* spp. contribui para obtenção de resultados falso-positivos, uma vez que podem apresentar determinantes antigênicos comuns. Outras bactérias também podem desencadear a produção de anticorpos que reagem com o antígeno utilizado na SAR, como *S. aureus* e *E. rhusiopathiae* (METTIFOGO; BUIM, 2009). Assim, para a confirmação das amostras reagentes na SAR, são realizadas técnicas sorológicas de inibição da hemaglutinação (HI) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), pois são testes mais específicos, porém mais trabalhosos e caros (KLEVEN, 2003). Estes testes sorológicos são amplamente

utilizados para diagnóstico em aves, sendo preconizados tanto pelo PNSA como pela OIE (BRASIL, 2009b; OIE, 2011a).

Devido ao prejuízo que causam à indústria avícola, as micoplasmoses aviárias têm sido estudadas detalhadamente em aves comerciais. Consequentemente, os resultados obtidos nessas pesquisas contribuem para a implementação de medidas profiláticas essenciais no controle dessas enfermidades (BUTCHER, 2012). No entanto, estudos sobre as micoplasmoses em aves silvestres ou de vida livre ainda são escassos quando comparados às pesquisas realizadas em aves de produção.

Segundo Luttrell et al. (2001) espécies de Passeriformes de vida livre (*Carpodacus mexicanus*, *Baeolophus bicolor*) capturadas próximo a granjas comerciais demonstraram resultados positivos para *M. gallisepticum* em exames sorológicos e moleculares. Esse agente já havia sido descrito previamente nessas espécies. Em 1997, Fisher et al. descreveram um surto de micoplasmose em tentilhões (*Carpodacus mexicanus*) cujo principal sinal clínico era conjuntivite. A partir de então observou-se um aumento significativo de casos de Passeriformes de vida livre com conjuntivite.

Um estudo epidemiológico realizado por Hartup et al. (2001) evidenciou a ocorrência de conjuntivite atribuída ao *M. gallisepticum* em diversas espécies de Passeriformes na América do Norte. Dos 675 casos observados, 75% ocorreram em três espécies: pintassilgo-americano (*Carduelis tristis*), tentilhão (*Carpodacus purpureus*) e pardal (*Passer domesticus*). Tais resultados são ainda mais preocupantes quando observados em populações de aves que crescem de maneira desordenada. O pardal (*P. domesticus*), por exemplo, assim como o pombo-doméstico, é considerado ave sinantrópica em diversas regiões do mundo (JOHNSTON, 2001). Ressalta-se aqui a problemática do controle de patógenos em aves de vida livre, que podem atuar como fonte de infecção prejudicando tanto outras espécies silvestres susceptíveis como aves de plantéis comerciais (STALLKNECHT et al., 1998; LUTTRELL et al., 2001).

Os métodos mais eficazes para a profilaxia e controle das micoplasmoses incluem medidas restritas de biossegurança, vigilância epidemiológica e erradicação de plantéis infectados (KLEVEN, 2008; BUTCHER, 2012). No Brasil, o PNSA (BRASIL, 2009b) estabeleceu o plano “Normas técnicas para o controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária” visando assim diminuir os prejuízos relacionados com essa enfermidade. Garantindo, dessa forma, a viabilidade de exportação de produtos avícolas, uma vez que, para isso, os estabelecimentos responsáveis devem estar certificados como livre de micoplasmose aviária.

Em relação à transmissão horizontal dos micoplasmas preconiza-se rigorosas medidas de biossegurança, como o controle do trânsito de pessoas, veículos, equipamentos e materiais nas áreas internas das instalações avícolas. No entanto, o potencial de aves de vida livre em transmitir microrganismos patogênicos para aves de produção muitas vezes não é estimado. Estas, quando infectadas podem transmitir o patógeno para as aves comerciais pelo contato direto ou indireto, contaminando o ambiente com suas excreções (BUTCHER, 2012).

Um dos maiores fatores de risco para a ocorrência da micoplasmose aviária em um plantel livre da doença é a presença de aves infectadas nas proximidades do estabelecimento comercial (KLEVEN, 2008). Falhas na biossegurança de um único estabelecimento avícola já são suficientes para colocar em risco grande parte da produção de um Estado. Isso por que muitas granjas ficam localizadas em áreas próximas umas às outras. No Estado de São Paulo, por exemplo, o município de Bastos possui aproximadamente 100 granjas avícolas, com um plantel de cerca de 11 milhões de aves de postura comercial, sendo considerado o maior polo avícola do país (RESENDE, 2012).

2.4 *Salmonella* spp.

As *Salmonella* spp. constituem um gênero extremamente heterogêneo de bactérias Gram-negativas, possuindo mais de 2.600 variantes sorológicas, sendo aproximadamente 90 delas mais frequentemente envolvidas nas infecções humanas e animais. São agrupadas em 5 subgêneros definidos por métodos bioquímicos. As classificações dos subgêneros e variantes sorológicas, bem como a sua patogenicidade, são determinadas de acordo com as proteínas de adesão e proteínas fimbriais apresentadas (GAST, 2003; STEVENS; HUMPHREY; MASKELL, 2009).

O termo “salmonelose aviária” é utilizado para designar as diversas doenças nas aves causadas por qualquer bactéria do gênero *Salmonella*. No entanto, somente a *Salmonella* Pullorum, agente etiológico da pulorose e a *Salmonella* Gallinarum, agente do tifo aviário, determinam doenças clínicas características que podem acarretar enormes prejuízos à avicultura mundial, sendo classificadas como sorotipos hospedeiro-específicos das aves e com peculiaridade comum de ausência de motilidade. Os demais sorotipos de *Salmonella* com potencial para determinar problemas para as aves ou apenas colonizá-las estão agrupados como paratifo aviário, cuja característica comum é a motilidade (SHIVAPRASAD, 2000).

A pulorose é uma doença septicêmica que ocorre principalmente em aves jovens. As aves afetadas manifestam sinais clínicos variáveis e inespecíficos que incluem depressão, diarreia esbranquiçada e anorexia. A taxa de mortalidade é variada, mas em casos extremos pode chegar a 100% do plantel. Quando as aves adultas são afetadas pela bactéria pode haver redução da produção e eclodibilidade dos ovos, além dos sinais inespecíficos mencionados (REVOLLEDO, 2009).

O tifo aviário, embora causado por uma *Salmonella* muito semelhante ao agente da pulorose, é mais comum entre aves adultas. Os sinais clínicos incluem prostração, diarreia amarelo-esverdeada, queda de postura, dispnéia, anemia e morte. A mortalidade pode variar de 40 a 80% do plantel. No início de uma epidemia algumas aves ficam doentes e, entre essas, há alguma mortalidade. Posteriormente esse quadro se repete diversas vezes, de modo que grande parte do lote pode ser acometida e a mortalidade final torna-se significativa (BARROW, 1993; BARROW, 1998; SHIVAPRASAD, 2000).

Assim como em muitas outras doenças bacterianas, ambos os agentes podem ser transmitidos por diversos mecanismos. Entretanto, a ave infectada é o principal meio de disseminação e perpetuação desses patógenos, pois além de infectarem outras aves pela transmissão horizontal (fecal-oral), podem infectar também sua prole pela infecção vertical (transovariana). As galinhas são os hospedeiros naturais de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, no entanto, existem relatos desses agentes em galinha-d'angola, codornas, faisões, pardais e papagaios. A susceptibilidade de pombos é variável, mas aves silvestres têm sido relacionadas como potenciais disseminadoras desses patógenos (SHIVAPRASAD, 2003).

Em relação ao paratifo aviário, a maioria dos sorovares existentes pode colonizar o intestino das aves sem causar doença, mas aves portadoras possuem um significado importante para a saúde pública. As aves infectadas constituem o reservatório mais frequentemente associado aos surtos de salmoneloses em humanos, principalmente devido às contaminações que ocorrem durante a cadeia de produção e beneficiamento de alimentos (GAST, 2003; PEDERSEN et al., 2006).

Durante a evisceração das aves pode haver contaminação da carcaça pelo conteúdo intestinal, colocando em risco a saúde do consumidor da carne se esta estiver contaminada. Dentre as salmonelas de maior importância para a saúde humana destacam-se *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis, agentes causadores de gastroenterites (KUMAR et al., 2009; SÁNCHEZ-VARGAS; ABU-EL-HAIJA; GÓMEZ-DUARTE, 2011).

No Brasil, em decorrência da perda econômica que as salmoneloses causam à avicultura e por afetar a exportação de produtos avícolas brasileiros, o PNSA contempla a *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* no controle desta enfermidade. Quando comprovado a ocorrência de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em aves ou ovos férteis de reprodutoras importadas e aves de linhas puras, bisavós e avós nascidas no Brasil, o plantel deve ser sacrificado e todos os ovos eliminados. No caso da ocorrência da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, as aves poderão ser tratadas com antibióticos específicos para enterobactérias, porém o comércio dos produtos avícolas fica impedido (BRASIL, 2009b).

Devido às sérias consequências implicadas quando tais agentes são diagnosticados em plantéis comerciais, o PNSA preconiza, além de exames bacteriológicos confirmatórios, técnicas laboratoriais que auxiliem no monitoramento frequente do perfil sanitário das aves, visando dessa forma manter a certificação das granjas como livre de *Salmonella* spp. (BRASIL 2009b). Técnicas sorológicas são utilizadas para detectar diversas classes de imunoglobulinas, como IgM que são produzidas pela ave infectada no início da infecção e IgG, cuja produção é mais tardia. Assim, é possível detectar anticorpos inclusive em aves sem sinais clínicos, mas que foram expostas ao agente infeccioso presente no ambiente, alimento e/ou outras aves do plantel. Isso permite a correção imediata do manejo das aves e a adoção de medidas para evitar a disseminação do patógeno (PHALEN, 2001).

Em aves de produção, a SAR é amplamente utilizada para o monitoramento de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e quando reagente deve ser complementada pela soroaglutinação lenta em tubos. De acordo com o PNSA tais técnicas também podem ser empregadas em amostras de aves silvestres (BRASIL, 2009b). De fato, a técnica de SAR já foi utilizada na pesquisa da soroprevalência de anticorpos anti-*Salmonella* Pullorum e anti-*Salmonella* Gallinarum em populações de pombos do gênero *Zenaida* spp. no México, com 26,3% (53/201) das amostras reagentes (ESPINOSA-AGÜELLES, 2010).

No Brasil, no entanto, informações sobre a ocorrência de *Salmonella* spp. em Columbiformes são escassas. Um estudo realizado na cidade de Jaboticabal, no Estado de São Paulo, demonstrou o isolamento de *Salmonella* spp. em cerca de 8% (10/126) dos órgãos e fezes de pombos (*C. livia*) urbanos amostrados, sendo encontrados os sorotipos *S. Typhimurium* e *S. enterica* subsp. *enterica* (MARCIANO, 2004). Ressalta-se que dependendo do método de colheita da amostra biológica para isolamento, como suabes cloacais, podem haver resultados falso-negativos, uma vez que a excreção de *Salmonella* spp. em aves infectadas, muitas vezes, é intermitente (IMMERSEEL et al., 2004).

O controle da *Salmonella* spp. no Brasil e em diversos outros países têm sido realizado pela adoção de medidas coordenadas de vigilância sanitária, associada aos exames sorológicos e sacrifício compulsório das aves infectadas por *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*. O último surto notificado para a OIE ocorreu em 2011 em Belize, na América Central, no qual 1.200 poedeiras foram abatidas pelas autoridades governamentais. A fonte de infecção ainda permanece desconhecida (OIE, 2011b). Sabe-se, porém, que a manutenção do ambiente livre de microrganismos patogênicos ou pelo menos a sua manutenção em um nível mínimo de contaminação, reduz a ocorrência dos quadros clínicos da doença. Para a redução do desafio ambiental por *Salmonella* spp. necessita-se de granjas isoladas, limpas e desinfectadas (aviário e equipamentos), manejo correto da cama, idade única de criação, monitoramento de visitas e, controle de insetos, roedores e aves de vida livre (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2009).

Um estudo realizado por Lapuz et al. (2012) demonstrou claramente que a prevalência da infecção por *Salmonella* Enteritidis em poedeiras comerciais é significativamente maior em granjas com altas densidades de roedores. Assim, evitar o contato de aves comerciais com outros animais que possam atuar como vetores biológicos ou mecânicos do agente é imprescindível para o controle da doença (REVOLLEDO, 2009). Dentro desse contexto, a investigação direta ou indireta de *Salmonella* spp. em aves de vida livre com potencial de comprometer a saúde de aves comerciais ou que contribuam para a perpetuação destes agentes no ambiente é importante para a implementação adequada de medidas profiláticas eficazes.

2.5 Paramixovírus aviário tipo 1

O Paramixovírus aviário do tipo I (APMV-1) é um RNA vírus envelopado de fita simples que pertence à família Paramyxoviridae, gênero *Avulavirus* (ALEXANDER, 2011). É o agente etiológico da doença de Newcastle (DN), enfermidade altamente contagiosa que acomete aves domésticas e selvagens. Já foi detectado em cerca de 250 espécies de aves, representando 27 das 50 ordens aviárias (KALETA; BALDAUF, 1988; SEAL et al., 1998; ALEXANDER, 2009). Na avicultura industrial é uma doença relacionada com sérios impactos sócio-econômicos, pois além de desencadear grandes perdas em plantéis avícolas, compromete o comércio internacional de aves e seus subprodutos (ALEXANDER, 2003).

O primeiro relato da enfermidade ocorreu em 1926, desde então, três panzootias foram descritas. A primeira em 1926, atingindo aves comerciais no Sudeste Asiático, Oriente Médio e Europa, principalmente na Inglaterra. A segunda, na década de 60 no Oriente Médio, com difusão mais intensa, atingindo todos os continentes em 1973. A rápida disseminação da doença foi atribuída à importação e ao comércio intenso de psitacídeos, provenientes do Sudeste Asiático, América Central e América do Sul. Os sérios efeitos deletérios desta segunda panzootia impulsionaram o desenvolvimento de vacinas e a implantação de leis que regulamentaram o comércio e a produção de aves. A terceira Panzootia emergiu no Oriente Médio no final dos anos 70, tendo sido relatada em pombos de competição como uma doença neurotrópica, sem sintomatologia respiratória. Em pouco mais de 10 anos disseminou-se em mais de 20 países, sendo a principal forma a exposição e o comércio indiscriminado de pombos (ALEXANDER, 2003).

A transmissão do APMV-1 ocorre principalmente pelo contato direto com secreções de aves infectadas; especialmente pela ingestão (via fecal/oral) e inalação. Há controvérsias quanto a transmissão vertical do vírus (OIE, 2010). A virulência do APMV-1 é variável, de uma maneira geral, a susceptibilidade da ave infectada varia de acordo com a idade, estado imunológico e estirpe viral envolvida (ALEXANDRE, 2011). Uma vez que os sinais clínicos e a gravidade da doença também podem variar entre uma espécie e outra, não pode ser descartado o risco de que o vírus, apesar de não-patogênico para uma espécie, possa causar doença grave em outra (BRASIL, 2009a; KOMMERS et al., 2001). Existem relatos de estirpes que provocaram 100% de mortalidade em galinhas, mas produziram doença branda ou inaparente em outras espécies aviárias (TAKAKUWA et al., 1998; CARRASCO, 2008).

Testes de inoculação intracerebral em pintos de 1 dia, cujos resultados determinam o índice de patogenicidade intracerebral (IPIC), permitem caracterizar e classificar o APMV-1 em patótipos. Por patótipo entende-se o grau de patogenicidade do vírus e, portanto, a severidade da doença causada por uma determinada estirpe viral. Cinco são os patótipos relacionados com IPIC, sendo eles velogênico viscerotrópico, velogênico neurotrópico, mesogênico, lentogênico e entérico. As estirpes classificadas como velogênicas são as mais virulentas; as aves acometidas manifestam sinais clínicos e lesões severas, como sinais nervosos e hemorragias intestinais e respiratórias. Nesses casos a taxa de mortalidade das aves é alta. As estirpes classificadas como mesogênicas desencadeiam sinais clínicos mais brandos, principalmente respiratórios, sendo a taxa de mortalidade normalmente menor. Os patótipos lentogênicos desencadeiam infecções respiratórias brandas ou subclínicas e, por fim, há o patótipo entérico que é assintomático (BRASIL, 2009a; ALEXANDER, 2011). Os vírus de

baixa virulência podem não causar doença ou mortalidade significativa, no entanto, quando houver infecções concomitantes ou condições insalubres podem causar prejuízos comparáveis aos causados pelas estirpes mais virulentas (LESLIE, 2000).

Na prática, para se definir se um vírus é patogênico e, portanto, implicado em surtos da doença, são seguidas normas internacionais que definem a metodologia e critérios para caracterizar o grau de patogenicidade do vírus isolado das aves. De acordo com a OIE (Organização Internacional de Epizootias), da qual o Brasil é signatário, a doença de Newcastle é uma doença infecciosa das aves causada por um paramixovírus aviário do tipo 1, que apresenta um dos seguintes critérios de virulência: o vírus tem um índice de patogenicidade intracerebral maior ou igual a 0,7 em pintos de um dia; ou a presença de múltiplos aminoácidos básicos demonstrada na porção C-terminal da proteína F2 e na porção N-terminal da proteína F1. O termo “múltiplos aminoácidos básicos” se refere a pelo menos três resíduos de arginina ou lisina entre os resíduos 113 e 116. Portanto, a infecção por amostras de vírus com índices de patogenicidade igual ou maior que 0,7 ou com sequências de aminoácidos especificadas nesta definição é o que caracteriza a ocorrência da doença (BRASIL, 2009a; OIE, 2010).

Além da determinação da presença de múltiplos aminoácidos básicos, metodologias moleculares têm sido empregadas na rotina laboratorial para a detecção do APMV-1 independentemente de sua virulência. Sendo o APMV-1 um RNA vírus, a RT-PCR (reação em cadeia pela polimerase-pós transcrição reversa) é o ponto de partida para a maioria das técnicas moleculares a serem utilizadas para a diferenciação de suas estirpes. Por meio da transcrição reversa, o RNA viral passa a DNA complementar (cDNA), que por sua vez pode ser utilizado na PCR (reação em cadeia pela polimerase) (JESTIN; JESTIN, 1991; KHO et al., 2000; CAVANAGH, 2001; CARRASCO et al., 2008).

Já para a detecção de anticorpos anti-APMV-1 podem ser utilizadas diversas técnicas sorológicas, como a HI, vírus neutralização (VN) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Dentre tais testes a HI é considerada internacionalmente a técnica de referência para o diagnóstico indireto do patógeno (OIE, 2010) e tem sido amplamente utilizada tanto em amostras de aves comerciais como de aves silvestres (DIMITROV; MANVELL; GOUJGOULOVA, 2010).

É importante ressaltar que a espécie hospedeira é de crucial importância na disseminação do agente. Espécies de aves de vida livre são relatadas como possíveis reservatórios do APMV-1, sendo ainda responsáveis pelo surgimento de novas variantes virais patogênicas, atuando como disseminadoras do patógeno. As investigações sorológicas e os isolamentos virais a partir destas aves vêm sendo realizados em alguns países e uma

espécie particularmente envolvida como sendo causadora de surtos da DN em aves silvestres e comerciais é o pombo (*C. livia*) (ALEXANDER, 1985a; ALEXANDER; PARSONS, 1986; IRVINE et al., 2009; SCHULER et al., 2012).

Em pombos as variantes virais do APMV-1 são denominadas de PPMV- 1 (*pigeon paramyxovirus type 1*). Amostras do APMV-1 foram descritas primeiramente na década de 1970 em pombos no Oriente Médio. No entanto somente em 1985 com a utilização de anticorpos monoclonais, estirpes isoladas de pombos foram diferenciadas das demais estirpes de paramixovírus aviários tipo 1, sendo denominadas de PPMV-1 (ALEXANDER et al., 1985b). As análises filogenéticas realizadas em cerca de 70 isolados provenientes de pombos demonstraram que a variante de pombo, PPMV-1, emergiu como um resultado de múltiplos eventos da transmissão entre pombos e galinhas e/ou frangos (UJVÁRI, 2003). Contudo, independente da nomenclatura adotada, estirpes do APMV-1 que apresentarem os critérios de virulência mencionados anteriormente são atribuídas como causadoras da DN em aves susceptíveis.

Assim, a partir do momento em que aves de vida livre podem ser responsabilizadas por serem fonte primária de introdução do APMV-1, estudos envolvendo comparações entre estirpes virais provenientes destas aves e estirpes provenientes de vacinas e/ou de aves de granja e o monitoramento epidemiológico em aves silvestres e sinantrópicas tornaram-se de crucial importância (CLAVIJO et al., 2000; ALEXANDER, 2003).

No Brasil, Oliveira Júnior et al. (2003) analisando diversas espécies de aves domésticas e silvestres cativas no Estado do Rio de Janeiro encontraram 1,4% de aves soropositivas no HI para APMV-1. Silva (2006) ao estudar pardais (*Passer domesticus*) no agreste pernambucano encontrou um total de 10,7% das amostras analisadas positivas para o teste de HI para APMV-1. Em contrapartida, Carrasco (2005) avaliando uma população de pombos urbanos (*C. livia*) da região nordeste do Estado de São Paulo, não detectou a excreção do genoma viral pela RT-PCR.

No período de 1970 a 1975 foram registrados aproximadamente 1.350 focos da doença em diversas regiões do Brasil; de 1975 a 1995 alguns focos ocorreram, porém em menor escala. Entre 1995 a 2006 não foram notificados focos relevantes da doença em criações de exploração comercial, provavelmente devido ao controle sistemático e intensivo da DN por meio de vacinas eficientes e da execução do PNSA. Contudo, em 2006, um surto da enfermidade ocorrido no Rio Grande do Sul colocou em alerta todos os avicultores do país (PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009), reafirmando a necessidade de uma vigilância

constante e da avaliação do papel das aves silvestres e sinantrópicas na disseminação deste patógeno.

2.6 *Chlamydophila psittaci*

Aves silvestres têm sido reconhecidas por serem importantes reservatórios de *Chlamydophila psittaci* (*C. psittaci*) na natureza, destacando-se os Psittaciformes e Columbiformes (GERLACH, 1994b). Em relação à indústria avícola, embora a clamidiose não tenha ocorrência na criação de frangos e poedeiras, é de suma importância na criação de perus, uma vez que causa considerável prejuízo decorrente do tratamento das aves doentes, descartes no abatedouro e consequente contaminação humana (ANDERSEN, 1998, DICKX, et al., 2010).

A *C. psittaci* é uma bactéria intracelular obrigatória, agente etiológico da clamidiose em aves e psitacose em humanos. Atualmente seis sorotipos são conhecidos nas aves (A ao F). Esses sorotipos não são espécies-específicos e diferem apenas quanto à virulência. Os mais virulentos replicam-se com mais rapidez e atingem um amplo espectro de hospedeiros, enquanto os de baixa virulência induzem, na maioria das vezes, infecção assintomática (GERLACH, 1994b; OIE 2008a).

A manifestação clínica da doença varia conforme a concentração e virulência da cepa infectante, espécie aviária acometida, estado imune do hospedeiro e fatores inerentes ao ambiente. Podem ocorrer desde infecções assintomáticas até infecções severas com altas taxas de mortalidade no plantel. Portadores assintomáticos são comuns e podem albergar o microrganismo durante anos até a emergência dos sinais clínicos, geralmente após algum evento estressante tais como início da estação reprodutiva, alteração no manejo e mudança brusca de temperatura (FLAMMER, 1997). Os principais sistemas afetados são o respiratório e digestivo, podendo também causar conjuntivite, infecções do sistema reprodutor ou sistêmicas (GRIMES, 1996).

Aves infectadas eliminam o patógeno de maneira intermitente nas secreções conjuntival, cloacal, nasal e orofaríngea. A transmissão da *C. psittaci* entre as aves ocorre por inalação ou ingestão do microrganismo presente em excreções contaminadas. A infecção pode também ocorrer no ninho, quando os pais regurgitam alimentos para os filhotes

contendo células infectadas, provavelmente provenientes da descamação do epitélio do trato digestório superior (GERLACH, 1994b).

O diagnóstico definitivo é obtido por isolamento e/ou detecção do agente. Os métodos de isolamento são dispendiosos e demorados, sendo aplicados somente em laboratórios especializados e com biossegurança de nível 3, devido à natureza zoonótica da *C. psittaci*. Para a detecção do patógeno em aves a técnica da reação em cadeia pela polimerase e suas variações têm sido aplicadas com sucesso. No entanto, estabelecer um diagnóstico confirmatório muitas vezes pode ser difícil devido a eliminação intermitente da bactéria pelo hospedeiro (FUDGE, 1997; VANROMPAY, 2000; RASO, 2007).

A *Chlamydophila psittaci* já foi descrita em cerca de 30 ordens de aves, sendo que a Ordem Columbiformes é uma das mais frequentemente acometida (KALETA; TADAY, 2003). O primeiro relato de clamidiose em pombos (*C. livia*) foi realizado em 1940 por Pinkerton e Swank, desde então diversos estudos têm sido conduzidos nessa espécie (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK, 1995).

Segundo Magnino et al. (2009) de 1966 a 2005 cerca de 38 estudos foram realizados em pombos em países europeus, cujos resultados demonstraram uma soroprevalência variando de 12,5 a 95,6%. Esses autores relatam a presença do DNA de Chlamydiaceae em 3,4 a 52,6% das amostras coletadas de pombos em pesquisas realizadas com técnicas moleculares durante os anos de 2003 a 2007. Atualmente estas aves são consideradas reservatórios de *C. psittaci*, uma vez que a identificação direta ou indireta desse agente vem sendo relatada por diversos autores em âmbito mundial (TRAVNICEK et al., 2002; HARKINEZHAD; GEENS; VANROMPAY, 2008; MAGNINO et al., 2009).

Para o ser humano a psitacose representa uma das principais zoonoses de origem aviária e se o paciente não for tratado adequadamente, a doença pode ser fatal. A infecção de seres humanos normalmente ocorre quando as pessoas inalam aerossóis de fezes secas ou secreções respiratórias de aves infectadas (GOSBELL et al., 1999; BELCHIOR et al., 2011). De 2005 a 2009, 66 casos de psitacose foram reportados ao CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) nos Estados Unidos (NASPHV, 2010).

No Brasil, em 2007, um surto de psitacose ocorreu em pessoas que tiveram contato com caturritas (*Myiopsitta monachus*) apreendidas em Pântano Grande, RS originárias do tráfico de aves silvestres e destinadas a diferentes localidades. Após algum tipo de contato com as aves (transporte, manejo e cuidados gerais) 43 pessoas em cinco locais diferentes apresentaram sinais clínicos sugestivos de psitacose, sendo oito delas hospitalizadas. Estudos moleculares confirmaram a presença da bactéria nas aves (RASO et al., 2009).

Estudos nacionais indicam que a prevalência de *C. psittaci* é elevada em Psittaciformes (araras, papagaios e periquitos) cativos e de vida livre no Brasil (RASO; BERCHIERI JÚNIOR; PINTO, 2002; RASO et al., 2006). No entanto, em condições naturais pouco se sabe sobre a ocorrência dessa bactéria em outras espécies de aves no país. Em um estudo realizado com pombos capturados no zoológico de Bauru/SP, a presença do agente foi detectada em 27,4% (14/51) das aves (LIMA; RASO; ARAÚJO JÚNIOR, 2003).

Segundo Salinas, Caro e Cuello (1993) o fato dos pombos estarem presentes em áreas públicas e apresentarem comportamento migratório faz com que eles representem uma das principais fontes de disseminação do agente infeccioso para o meio ambiente, apresentando riscos de dispersão da doença tanto para seres humanos como para outras aves susceptíveis. Tal fato é preocupante especialmente em regiões onde a população de pombos cresce desordenadamente, como no Estado de São Paulo, onde essa espécie é considerada sinantrópica nociva (NUNES, 2003; ANVISA, 2006).

Ainda, devido à maior competição pelo alimento, essas aves têm apresentado maior variação alimentar, ingerindo não apenas grãos, mas também alimentos industrializados, restos de frutas, de vegetais e lixo em geral. Isso justifica a assiduidade destas aves em locais de carregamento e descarregamento de grãos, lixões, praças com barracas de alimentos e com transeuntes provedores de alimentos. O movimento constante dos pombos provoca um deslocamento do ar por onde a ave passa, favorecendo a suspensão de partículas contendo fezes ressecadas e, porventura, agentes patogênicos presentes nelas (SCHULLER, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo principal deste trabalho foi de avaliar, ao longo de um ano, o perfil sanitário de pombos (*Columba livia*) residentes em locais de armazenagem de grãos e sementes nas cidades de São Paulo e de Tatuí, SP. Para tanto os seguintes patógenos foram pesquisados: *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., paramixovírus aviário tipo 1 e *Chlamydophila psittaci*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de anticorpos anti-*Mycoplasma synoviae* e anti-*M. gallisepticum* utilizando a reação de soroaglutinação rápida (SAR);
- Avaliar a presença de anticorpos anti-*Salmonella Pullorum/Gallinarum* utilizando a reação de soroaglutinação rápida (SAR);
- Avaliar a presença do genoma do paramixovírus aviário do tipo 1 (APMV-1), utilizando a reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR);
- Avaliar a presença do genoma de *Chlamydophila psittaci* utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR);
- Avaliar a presença destes microrganismos e anticorpos ao longo de um ano, com coletas mensais, para avaliação de sazonalidade.
- Adquirir dados para o conhecimento dos aspectos sanitários destas populações sinantrópicas, possibilitando desta forma um maior conhecimento acerca do papel destas aves na disseminação dos agentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Período e local do desenvolvimento do estudo

Este projeto foi conduzido nas instalações de dois entrepostos de armazenagem de grãos e sementes onde havia o problema de superpopulação de pombos (Figuras 1 e 2): São Paulo/SP e Tatuí/SP. A distância entre as duas localidades é de cerca de 140 km. Mensalmente, ao longo de 12 meses, foram capturados 10 pombos (*Columba livia*) em cada localidade, de forma aleatória, através do uso de armadilhas (Figuras 3). Para avaliação da influência da sazonalidade no perfil sanitário das aves foram consideradas duas estações no ano: seca (de abril a setembro) e chuvosa (de outubro a março).

Durante a captura, transporte e manipulação dos pombos para colheita de material biológico, medidas de biossegurança foram estabelecidas com o intuito de evitar a potencial transmissão de patógenos para a equipe envolvida (Figura 4).

Figura 1 – A) Pombos (*C. livia*) alimentando-se dos restos de uma feira. B) Acúmulo de excretas de pombos em locais próximos ao trânsito de pessoas e comercialização de alimentos

Figura 2- Pombos (*C. livia*) pousados em cima do telhado de um armazém de grãos na cidade de Tatuí – SP

Figura 3 – Armadilha utilizada para a captura de pombos (*C. livia*) na cidade de São Paulo (A) e Tatuí (B)

Figura 4 – A) Utilização de EPI (equipamento de proteção individual) para a manipulação dos pombos. B) Veículo utilizado para o transporte das aves (Notar que o motorista e os passageiros não ficam em contato com os animais que permanecem isolados na parte posterior da caminhonete)

4.2 Colheita e armazenamento das amostras

Após a contenção manual, foram coletadas amostras de suabes da cloaca de cada ave (Figura 5A). Para detecção do APMV-1 e de *C. psittaci* os suabes foram acondicionados em microtubos plásticos contendo 1 mL de PBS estéril (*Phosphate Buffer Saline* – solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2) adicionado de 100 µg de vancomicina, 100 µg de estreptomicina e 50 µg de gentamicina, sendo imediatamente congelados a -70°C.

A colheita de sangue foi realizada por punção da veia braquial por meio de agulhas e seringas estéreis e descartáveis (Figura 5B). O soro foi separado do sangue total por centrifugação e as reações de SAR realizadas no mesmo dia. As amostras foram então armazenadas à temperatura de -20°C e, aquelas reagentes na SAR, foram posteriormente encaminhadas para um laboratório particular credenciado pelo MAPA para serem processadas pela técnica de HI (*Mycoplasma* spp.) e soroaglutinação lenta (*Salmonella* spp.).

Esse estudo foi realizado com uma licença obtida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO), protocolo N°17593-1 e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo 1605/2009.

Figura 5 – Pombo (*C.livia*): A) Colheita de suabe cloacal. B) Colheita de sangue da veia braquial

4.3 Detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma* spp.

Para detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma synoviae* e anti-*Mycoplasma gallisepticum* as amostras de soro fresco foram testadas individualmente pelo teste de soroaglutinação rápida em placa. Foram utilizados antígenos comerciais (Synovitest® e Myco-Galli Teste®, Biovet, São Paulo). Os testes foram realizados de acordo com o PNSA (BRASIL, 2009b) e recomendações do fabricante dos antígenos. Como controle negativo e positivo foram utilizados soros conhecidos não-reagentes e reagentes, respectivamente.

Para o processamento das amostras foi utilizada uma placa de vidro subdividida em 30 quadrados de 2,5 x 2,5 cm. Em cada quadrado foram adicionados 50 µl de soro e 50 µl de antígeno, mantidos na temperatura ambiente (22-25°C). Em seguida os 100 µL de soro/antígeno foram homogenizados em movimentos circulares de 2 cm de diâmetro por cerca de 5 segundos com o auxílio de uma ponteira. Movimentos suaves de rotação da placa foram realizados para facilitar a leitura do teste. Após dois minutos foi realizada a leitura pela observação da formação ou não-formação de grumos característicos. O soro da ave foi considerado reagente perante a formação de grumos e não-reagente quando a reação permanecia uniforme ou com grumos inespecíficos e grosseiros.

4.4 Detecção de anticorpos anti-*Salmonella* spp.

Para detecção de anticorpos anti- *Salmonella* Pullorum/Gallinarum as amostras de soro fresco foram testadas individualmente pelo teste de soroaglutinação rápida em placa. Foi utilizado antígeno comercial (Pulor test[®], Biovet, São Paulo). Os testes foram realizados de acordo com o PNSA (BRASIL, 2009b) e com as recomendações do fabricante do antígeno. Como controle negativo e positivo foram utilizados soros conhecidos não-reagentes e reagentes, respectivamente.

Para o processamento das amostras foi utilizada uma placa de vidro subdividida em 30 quadrados de 2,5 x 2,5 cm. Em cada quadrado foram adicionados 50 µl de soro e 50 µl de antígeno, mantidos na temperatura ambiente (22-25°C). Em seguida os 100 µL de soro/antígeno foram homogenizados em movimentos circulares de 2 cm de diâmetro por cerca de 5 segundos com o auxílio de uma ponteira. Movimentos suaves de rotação da placa foram realizados para facilitar a leitura do teste. Após dois minutos foi realizada a leitura pela observação da formação ou não-formação de grumos característicos. O soro da ave foi considerado reagente perante a formação de grumos e não-reagente quando a reação permanecia uniforme ou com grumos inespecíficos e grosseiros.

4.5 Paramixovírus aviário tipo 1

4.5.1 Extração do RNA viral

As amostras destinadas à extração de RNA foram descongeladas à temperatura de 4°C e agitadas em vortex por 1 minuto, sendo em seguida utilizado o Kit de Extração *NucleospinViral RNA Isolation*[®] (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG), conforme recomendações do fabricante.

4.5.2 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os oligonucleotídeos utilizados são específicos para uma região do genoma viral que faz parte da porção responsável pela transcrição da proteína F_o, próximo ao sítio de clivagem desta proteína, sendo capaz de identificar todas as estirpes do APMV-1 já conhecidas. Foram utilizados: P1F (5'-TTGATGGCAGGCCTCTTGC-3') e P2R (5'-GGAGGATGTTGGCAGCATT-3') conforme descrito por Toyoda et al. (1989) e utilizado por Carrasco et al. (2008). Os produtos obtidos na RT-PCR possuem 362 pb.

4.5.3 Síntese de cDNA – Transcrição reversa do RNA viral

Para a reação de pré-transcrição 4 µL do RNA extraído foram adicionados a 50 pmol do oligonucleotídeo P1F e a 1 µL de água ultrapura autoclavada. A mistura foi submetida a um ciclo de 95°C por 3 minutos, 56°C por 25 minutos e a 4°C em termociclador automático (Axygen Scientific INC, EUA). Em seguida, foram adicionados 4 µl de ImProm II 5X Reaction Buffer; 25 mM de MgCl₂; 10 mM de dNTP, 40U de RnaseOUT (Invitrogen Life Technologies, Applied Biosystems Inc.) e 1 µL de ImProm II (Promega Corporation) para a reação de transcrição reversa. As amostras foram incubadas em termociclador por 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C e a 4°C até a retirada da máquina. O cDNA obtido foi utilizado na reação de PCR.

4.5.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A amplificação foi efetuada em um volume total de 25 µL sendo 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos; 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, Applied Biosystems Inc.); 1,25 mM de dNTP (Promega Corporation); 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies, Applied Biosystems Inc.); 2,5µl de *Standard Amplification Buffer*[®] (Invitrogen Life Technologies, Applied Biosystems Inc.), 5µL de cDNA e água ultrapura autoclavada q.s.p. Em seguida as amostras foram submetidas aos ciclos de amplificação de

94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 90 segundos, 72°C por 1 minuto e uma etapa final de 72°C por 5 minutos e por fim, mantido a 4°C até a retirada das amostras do termociclador.

4.5.5 Eletroforese dos produtos amplificados

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Uniscience do Brasil Ind. Com. Ltda) preparado a 1,5% em tampão TAE 1X (Tris, EDTA, ácido acético glacial) corado com GelRed™ (Uniscience do Brasil Ind. Com. Ltda.) numa concentração de 0,5 µg/10 mL. O gel foi submetido à eletroforese a 100 volts, durante 70 minutos e os produtos amplificados (*amplicons*) visualizados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

4.5.6 Detecção de anticorpos anti-APMV-1

Para a detecção de anticorpos anti-APMV-1 as amostras de soro foram processadas pela técnica de HI em um laboratório particular credenciado pelo MAPA de acordo com o PNSA (BRASIL, 2009b).

4.6 Detecção de *Chlamydophila psittaci*

4.6.1 Extração de DNA

As amostras de suabes cloacais contidas em microtubos com 1 mL de PBS adicionado de antibióticos foram vortexadas por 1 minuto; os suabes descartados e os tubos centrifugados a 20.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 180 µL de tampão lisozima. A cada amostra foram adicionados 25 µL de proteinase K

(Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG) incubando-se a 56°C por 90 minutos. Após inativação da proteinase K por 15 minutos a 90°C, a amostra foi centrifugada a 2.000g por 2 minutos a 22°C. Em seguida, o DNA foi extraído utilizando-se o *Nucleic Acid and Protein Purification Kit*[®] (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG), de acordo com as recomendações do fabricante e armazenado a -20°C até o uso.

4.6.2 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Foram utilizados oligonucleotídeos correspondentes à região conservada do gene da proteína principal da membrana externa de *C.psittaci*, conforme descrito por Laroucau et al. (2001). Foram utilizados os iniciadores externos CpsiA (5'-ATGAAACATCCAGTCTAC TGG-3') e CpsiB (5'-TTGTGTAGTAATATTATCAAA-3'), obtendo-se um fragmento de 300 pares de bases.

4.6.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A amplificação das amostras de DNA foi realizada em volume total de 25 µL sendo 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 4 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5U de Taq DNA polimerase (Dream Taq[™] Green PCR Master Mix, Fermentas[®], Life Sciences), 5 µl da amostra e água ultrapura autoclavada q.s.p.. Em seguida, a reação foi colocada em termociclador automático (Axygen Scientific INC, EUA) programado para 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Foram utilizados controles positivos e negativos para cada lote de reações.

4.6.4 Eletroforese dos produtos amplificados

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Uniscience do Brasil Ind. Com. Ltda) preparado a 1,5% em tampão TAE 1X (Tris, EDTA, ácido acético glacial) corado com GelRed[™] (Uniscience do Brasil Ind. Com. Ltda)

numa concentração de 0,5 µg/10 mL. O gel foi submetido à eletroforese a 100 volts, durante 70 minutos e os produtos amplificados (*amplicons*) visualizados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

4.7 Análise estatística

Para a comparação entre os resultados obtidos nas estações seca e chuvosa e entre as duas localidades foi utilizado o teste de qui-quadrado ao nível de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Pombos

Na cidade de São Paulo, das 120 aves capturadas ao longo do ano, 55,8% (67/120) eram fêmeas e 44,2% (53/120) eram machos. O peso variou de 150 a 360 gramas, com uma média de 270 gramas.

Na cidade de Tatuí das 120 aves capturadas ao longo de um ano, 50,8% (61/120) eram fêmeas e 49,2% (59/120) machos. O peso variou de 143 a 326 gramas, com uma média de 250 gramas.

Assim, no total, ao longo de um ano, foram capturadas 240 aves, sendo 53,3% (128/240) fêmeas e 46,7% (112/240) machos (Gráfico 1), com pesos variando de 140 a 360 gramas (média de 270 gramas).

Gráfico 1 – Número de machos e fêmeas de pombos (*C. livia*) capturados mensalmente nas cidades de São Paulo e Tatuí ao longo de um ano

5.2 *Mycoplasma* spp. e *Salmonella* spp.

Na avaliação sorológica dos pombos observou-se que, na cidade de São Paulo, 3,3% (4/120) dos soros foram reagentes no teste de SAR utilizado para detecção de anticorpos anti-*M. synoviae*. Em relação à estação do ano, 1,7% (1/60) das amostras positivas foram de aves capturadas na estação seca e 5% (3/60) de aves capturadas na estação chuvosa. Nenhuma ave apresentou resultado reagente no teste de SAR utilizado para a detecção de anticorpos anti-*M. gallisepticum*.

Na cidade de Tatuí 3,3% (4/120) das aves foram sororeagentes no teste de SAR utilizado para a detecção de anticorpos anti-*M. synoviae*. Destas, 5% (3/60) foram capturadas na estação seca e 1,7% (1/60) na estação chuvosa. Na detecção de anticorpos anti-*M. gallisepticum*, 5% (6/120) das aves apresentaram soropositividade, sendo 6,7% (4/60) delas capturadas na estação seca e 3,3% (2/60) na estação chuvosa.

No total, das 240 aves analisadas ao longo do ano em ambas localidades, 3,3% (8/240) foram sororeagentes no teste da SAR utilizado para a detecção de anticorpos anti-*M. synoviae*, sendo 3,3% (4/120) provenientes de aves capturadas na estação seca e 3,3% (4/120) de aves capturadas na estação chuvosa. Na detecção de anticorpos anti-*M. gallisepticum*, 2,5% (6/240) das amostras foram sororeagentes, sendo 3,3% (4/120) provenientes de aves capturadas na estação seca e 1,7% (2/120) na estação chuvosa. Foram reagentes em ambos os testes 1,3% (3/240) das amostras.

As amostras reagentes na SAR foram enviadas para um laboratório particular credenciado pelo MAPA para confirmação diagnóstica pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI). Das 11 amostras enviadas, nenhuma foi reagente no teste de inibição da hemaglutinação.

Na pesquisa de anticorpos anti-*Salmonella* Pullorum/Galinarum pela SAR, nenhuma ave foi soropositiva na cidade de São Paulo. Já na cidade de Tatuí 0,8% (1/120) das amostras foram reagentes, representando 1,7% (1/60) das amostras provenientes de aves capturadas na estação seca. No total, 0,4% (1/240) das aves foram reagentes na SAR realizada para a detecção de anticorpos anti-*S. Pullorum/Gallinarum*. Esse soro foi enviado para um laboratório particular credenciado pelo MAPA para confirmação do diagnóstico pela técnica de soroaglutinação lenta em tubos, cujo resultado foi não-reagente.

O gráfico 2 ilustra os resultados reagentes pela SAR realizada para detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma* spp. e *Salmonella* spp. em soros de pombos capturados em São Paulo e Tatuí.

Gráfico 2 – Resultados da soroaglutinação rápida (SAR) realizada para detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma synoviae* (MS), anti-*M. gallisepticum* (MG) e anti-*Salmonella Pullorum/Gallinarum* (SAL) em amostras de pombos capturados na cidade de São Paulo e Tatuí, SP ao longo de um ano

5.3 Paramixovírus aviário do tipo 1

Em relação ao APMV-1, o RNA viral não foi detectado em nenhuma das amostras (0/240) de suabe cloacal analisadas pela RT-PCR. Assim, em vista dos resultados negativos na detecção direta do agente e de sua importância na medicina aviária optou-se por realizar a investigação indireta do APMV-1. Para tanto, foram selecionadas aleatoriamente amostras de soros para serem submetidas à um laboratório particular credenciado pelo MAPA para a detecção de anticorpos anti-APMV-1 pela técnica de HI. Na cidade de São Paulo 96 amostras de soros foram testadas, no entanto, nenhuma foi reigente. Na cidade de Tatuí 91 amostras de soro foram testadas, sendo todas não reagentes.

No total o soro de 187 aves foi testado, representando 78% do número total de aves, sendo todos não-reagentes no teste de HI realizado para a detecção de anticorpos anti-APMV-1.

5.4 *Chlamydophila psittaci*

O DNA de *C. psittaci* foi detectado em 9,2% (11/120) das amostras (Figura 6) provenientes das aves capturadas na cidade de São Paulo, sendo 5% (3/60) das amostras provenientes de pombos capturados na estação seca e 13,3% (8/60) na estação chuvosa. Das aves capturadas na cidade de Tatuí, 17,5% (21/120) tiveram o DNA de *C. psittaci* detectado nas amostras dos suabes cloacais coletadas. Destas, 16,7% (10/60) foram aves capturadas na estação seca e 18,3% (11/60) na estação chuvosa.

No total, o DNA de *C. psittaci* foi detectado em 13,3% (32/240) das amostras analisadas, sendo 10,8% (13/120) provenientes de aves capturadas na estação seca e 15,8% (19/120) na estação chuvosa. O gráfico 3 ilustra os resultados obtidos na pesquisa de *C. psittaci* em cada localidade.

Na cidade de São Paulo as médias mensais de chuva foram maiores em ambas as estações em relação à cidade de Tatuí (Figuras 7 e 8). Em relação às temperaturas médias diárias a cidade de Tatuí apresentou temperaturas mais elevadas ao longo de todo o ano, com exceção dos meses de julho e agosto (Tabela 1).

Figura 6- Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos na PCR (300 pb) para a detecção de *C. psittaci* em amostras biológicas de pombos (*C. livia*)

Colunas 1 a 5: amostras negativas, colunas 6 a 9: amostras positivas, coluna 10: controle positivo, coluna 11: controle negativo, coluna 12: marcador de peso molecular DNA de 100pb.

Figura 7- Médias mensais de chuvas ao longo de um ano em São Paulo

Fonte: www.ciiagro.sp.gov.br

Figura 8- Médias mensais de chuvas ao longo de um ano em Tatuí

Fonte: www.ciiagro.sp.gov.br

Tabela 1- Média das temperaturas diárias ao longo de um ano em São Paulo e Tatuí.

Mês	Temperatura média diária São Paulo (°C)	Temperatura média diária Tatuí (°C)
Janeiro	24,8	26,5
Fevereiro	25,9	27,9
Março	24,2	25,8
Abril	21,5	22,2
Maio	19,4	20,1
Junho	17,9	19,6
Julho	19,4	19,3
Agosto	18,6	17,5
Setembro	21,1	21,5
Outubro	20,3	21,0
Novembro	22,5	23,3
Dezembro	23,9	24,1

Fonte: www.ciiagro.sp.gov.br

Gráfico 3 – Resultados positivos obtidos na reação em cadeia pela polimerase (PCR) realizada em amostras de suabes cloacais de pombos para a detecção de DNA de *C. psittaci*. A figura ilustra os resultados dos pombos capturados em São Paulo e Tatuí, SP ao longo de um ano

A tabela 2 ilustra os resultados obtidos nesse estudo de acordo com o patógeno investigado e técnica laboratorial utilizada para diagnóstico.

Tabela 2- Técnicas laboratoriais e resultados em percentual da pesquisa realizada em pombos (*C. livia*) no Estado de São Paulo frente aos patógenos: *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *Salmonella Pullorum/Gallinarum*, Paramixovírus aviário tipo 1 e *Chlamydophila psittaci*

Microrganismo	Técnica	São Paulo	Tatuí	Total
MS	SAR	3,3% (4/120)	3,3% (4/120)	3,3% (8/240)
	HI	0% (0/4)	0% (0/4)	0% (0/8)
MG	SAR	0% (0/120)	5% (6/120)	2,5% (6/240)
	HI	NT	0% (0/6)	0% (0/6)
S. Pul./Gal.	SAR	0% (0/120)	0,8% (1/120)	0,4% (1/240)
	SAL	NT	0% (0/1)	0% (0/1)
<i>C. psittaci</i>	PCR	9,2% (11/120)	17,5% (21/120)	13,3% (32/240)
APMV-1	RT-PCR	0% (0/120)	0% (0/120)	0% (0/240)
	HI	0% (0/96)	0% (0/91)	0% (0/187)

MS=*Mycoplasma synoviae*, MG = *Mycoplasma gallisepticum*, S.Pul/Gal.= *Salmonella Pullorum/Gallinarum*, SAR= Soroaglutinação rápida em placa, SAL= Soroaglutinação lenta, HI = Inibição da hemaglutinação, PCR= reação em cadeia pela polimerase, RT-PCR = Reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa, NT = amostra não testada pela técnica.

5.5 Análise estatística

A análise estatística foi aplicada somente nos resultados da pesquisa para *C. psittaci*, uma vez que os demais patógenos pesquisados e/ou anticorpos correspondentes não foram detectados.

A análise comparativa entre o número de aves positivas nas diferentes estações do ano (seca e chuvosa) e entre as duas localidades (São Paulo e Tatuí) estudadas não demonstrou diferença significativa com o teste de qui-quadrado, ao nível de significância de 5%.

6 DISCUSSÃO

O pombo (*Columba livia*) é uma das aves mais conhecidas por sua proximidade com o ser humano. Nos ambientes urbanos adaptou-se rapidamente às estruturas arquitetônicas, que muitas vezes assemelham-se ao seu habitat selvagem, onde nidifica em rochedos. Além disso, nas grandes cidades há vasta oferta de alimento, consequentemente, com abrigo e alimentação em abundância a população de pombos é cada vez maior e diversos são os problemas associados à proliferação contínua dessas aves (NUNES, 2003).

Uma das preocupações relacionadas aos Columbiformes é o seu potencial em disseminar microrganismos patogênicos tanto para outros animais como para seres humanos (HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004). Dentro desse contexto, o presente estudo foi realizado ao longo de um ano em pombos capturados em áreas estratégicas, utilizadas para comercialização de produtos alimentícios e armazenamento de grãos e sementes destinados ao consumo humano e animal.

Os patógenos aqui pesquisados, *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, *Salmonella Pullorum/Gallinarum* e APMV-1 fazem parte do PNSA devido ao impacto que causam à indústria avícola nacional. A *C. psittaci* por sua vez, foi selecionada por ser o agente etiológico de uma das mais importantes zoonoses relacionadas com aves de vida livre (ANDERSEN; FRANSON, 2007).

Ao longo de um ano, das 240 amostras de soros de pombos analisadas com a técnica de SAR, 3,3% foram reagentes para anticorpos anti-*M. synoviae* e 2,5% para anti-*M. gallisepticum*. A SAR é uma técnica preconizada tanto pela OIE (2008b) como pelo PNSA (BRASIL, 2009b) para o monitoramento sorológico de plantéis avícolas preferencialmente ao diagnóstico de um único indivíduo. É um teste altamente sensível que detecta principalmente IgM, imunoglobulina produzida pelo hospedeiro normalmente de 3 a 5 dias pós-infecção persistindo por cerca de 80 dias. Por essas razões foi a técnica sorológica de eleição utilizada para a avaliação sazonal de anticorpos anti-*M. gallisepticum* e anti-*M. synoviae* nesse estudo.

No Brasil, desde a década de 1960 a SAR vem sendo amplamente utilizada para a detecção de anticorpos anti-*M. synoviae* e anti-*M. gallisepticum* em aves comerciais (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). No entanto, mesmo constando no PNSA (BRASIL, 2009b) que essa técnica também pode ser utilizada em aves silvestres e/ou ornamentais, poucos são os estudos epidemiológicos que demonstraram seu uso em populações de outras espécies aviárias.

Os resultados da SAR para a detecção de anticorpos anti-*Mycoplasma* spp. obtidos no presente estudo corroboram com o resultado de outra pesquisa realizada em Taiwan nessa mesma espécie. No qual soros de pombos-correios (*C. livia*) foram analisados pela SAR, sendo 1,8% dos soros reagentes para *M. synoviae* e 1,3% reagentes para *M. gallisepticum* (TSAI; LEE, 2006).

No entanto, pelo fato da SAR ser uma técnica muito sensível, resultados falso-positivos podem ocorrer. Dessa forma, amostras reagentes devem ser submetidas à outros testes sorológicos confirmatórios mais específicos, como por exemplo, o HI, que detecta principalmente IgG. Normalmente essa imunoglobulina é produzida pelo hospedeiro de 7 a 10 dias pós-infecção e persiste por cerca de 6 meses (BRASIL, 2009b; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Nesse estudo, todas as amostras reagentes na SAR foram enviadas para um laboratório particular credenciado pelo MAPA para serem confirmadas pela técnica de HI. Das 11 amostras enviadas, nenhuma foi reagente. Tais resultados são condizentes com os achados de Keymer et al. (1984) que não detectaram anticorpos anti-*M. gallisepticum* pela técnica de HI em pombos-correios na Inglaterra. Entretanto, deve ser levado em consideração o fato de que nem sempre soros não-reagentes no teste de HI indicam necessariamente ausência de anticorpos contra o patógeno investigado.

Alterações dos antígenos de superfície do microrganismo são mecanismos de escape do patógeno para não ser reconhecido pelo sistema imunológico do hospedeiro e têm sido descrito tanto em *M. gallisepticum* como em *M. synoviae* (NOORMOHAMMADI, 2007). Dessa forma, poderiam ocorrer diferenças na expressão de proteínas responsáveis pela hemaglutinação em determinadas cepas de *M. gallisepticum* e *M. synoviae* que estivessem circulando a campo. Tal fato poderia implicar em resultados falso-negativos, visto que a cepa utilizada como antígeno para realização do sorodiagnóstico não seria capaz de reagir com os anticorpos induzidos por esses isolados atípicos (METTIFOGO; BUIM, 2009).

Por outro lado, há que se considerar o fato das amostras reagentes na SAR serem de fato, decorrentes de reações inespecíficas. A relação antigênica entre *M. synoviae* e *M. gallisepticum* é outro fator relacionado a resultados falso-positivos, uma vez que essas duas espécies apresentam determinantes antigênicos comuns (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009). Há também a possibilidade de reação cruzada com anticorpos produzidos pela infecção por outras espécies de *Mycoplasma* spp., como por exemplo, *M. columborale*, *M. columbinum* e *M. columbinasale*, espécies de *Mycoplasma* mais frequentemente isoladas de pombos (KEYMER et al.; 1984, LORIA et al., 2005, HARLIN; WADE, 2009). O congelamento e descongelamento frequente

e/ou armazenamento prolongado da amostra a 4°C também são fatores que podem desencadear resultados falso-positivos (METTIFOGO; BUIM, 2009), contudo, isso não se aplica, pois nesta pesquisa as amostras foram processadas no mesmo dia da colheita do sangue.

Das amostras reagentes na SAR para a detecção de anticorpos anti-*M. synoviae*, 3,3% foram provenientes de aves capturadas na estação seca e 3,3% na estação chuvosa. Em relação ao *M. gallisepticum*, 3,3% foram provenientes de pombos capturados na estação seca e 1,7% na estação chuvosa. Apesar dos resultados reagentes na SAR, a presença de anticorpos anti-*M. synoviae* e anti-*M. gallisepticum* não foi confirmada pelo teste sorológico específico (HI). No entanto, a investigação contínua e sazonal de um patógeno pode contribuir para um melhor entendimento de sua distribuição em uma determinada população.

Nos EUA, desde 1994 ocorrem surtos de micoplasmose causada por *M. gallisepticum* em Passeriformes de vida livre, cuja principal manifestação clínica é a conjuntivite (FISHER et al., 1997). ALTIZER et al. (2004) investigaram a doença em tentilhões (*Carpodacus mexicanus*), uma das principais espécies acometidas. Ao longo de 29 meses, 16% (142/888) das aves capturadas apresentaram sinais clínicos compatíveis com conjuntivite decorrente de micoplasmose, sendo os sinais clínicos mais severos em aves jovens. Ainda, foi constatado que a prevalência da doença foi significativamente menor durante a estação reprodutiva (final da primavera e verão, nos EUA de abril a julho). Segundo esses autores essas epidemias regulares de micoplasmose podem ser causadas por uma combinação de fatores, incluindo o recrutamento de um grande número de juvenis imunologicamente *naives* dentro da população logo após a estação reprodutiva, proporcionando um número maior de hospedeiros susceptíveis. Tal fato não se aplica aos pombos no Brasil, pois se reproduzem ao longo de todo o ano.

A ocorrência de micoplasmose em espécies de aves de vida livre é uma questão preocupante no que diz respeito à profilaxia. Nos EUA, Luttrell et al. (2001) conduziram um estudo em Fringílídeos dentro de propriedades avícolas e em áreas de alimentação próximas às granjas. Anticorpos anti-*M. gallisepticum* foram detectados pela SAR em 19% (127/671) das aves silvestres capturadas dentro das propriedades e 11,6% (45/387) das aves capturadas em locais de alimentação próximos às granjas. Posteriormente, a detecção do agente foi obtida com sucesso tanto pela técnica de PCR como pela cultura e isolamento. Entretanto, os autores não relatam a pesquisa do agente em amostras das aves comerciais criadas nas instalações avícolas.

No Brasil, Alcântara et al. (2011) realizaram um estudo para a detecção de anticorpos anti- *M. gallisepticum* em frangos de cortes com a utilização da SAR. De 1.036 amostras analisadas 3,4% foram reagentes. Paralelamente, em cada local foi aplicado um questionário

quanto às medidas de biossegurança adotadas pela granja, incluindo limpeza e desinfecção das instalações, controle de pragas e acesso de aves de vida livre. Foi constatado que a probabilidade da ocorrência de micoplasmose é quatro vezes maior em locais onde medidas de segurança não são instituídas de maneira adequada.

Também no Brasil, Hurtado et al. (2011) capturaram aves de três ordens distintas próximas às granjas comerciais para a pesquisa de *M. gallisepticum* pela técnica de PCR. Nenhuma ave apresentou resultado positivo, sendo que dentre as aves estudadas, 18% (25/137) eram Columbiformes. No presente estudo não houve evidência da ocorrência do patógeno nas aves investigadas. No entanto, as técnicas diagnósticas selecionadas tiveram o objetivo de detectar a exposição prévia ao patógeno e não o microrganismo propriamente dito.

Dentre desse contexto é interessante abordar os resultados obtidos por Fiorentin e Jaenisch (1994) e Gharaibeh e Hailat (2011) que conduziram estudos experimentais em aves comerciais e Columbiformes. No experimento realizado por Fiorentin e Jaenisch (1994) a espécie de Columbiforme utilizada foi a pomba-rola (*Columbina picui*). As pombas ficaram isoladas durante quatro meses em uma câmara junto com frangos SPF que haviam sido infectados com uma cepa de *M. synoviae* proveniente de matrizes pesadas. Ao longo do experimento somente os frangos apresentaram soroconversão, detectada tanto pela SAR como pelo HI. No final da pesquisa as aves foram eutanasiadas e o isolamento do patógeno só foi obtido a partir de amostras traqueais dos frangos.

Por sua vez, no experimento de Gharaibeh e Hailat (2011) foi utilizada uma cepa de *M. gallisepticum* proveniente de frangos de corte. Esta foi inoculada em pombos, pardais e frangos sabidamente livres do agente. A partir de então as aves foram monitoradas quanto ao desenvolvimento de sinais clínicos, soroconversão e eliminação do patógeno. Os frangos desenvolveram sinais respiratórios brandos, a soroconversão foi detectada pela HI e o agente foi isolado da traquéia e sacos aéreos das aves. Por outro lado, os pombos e os pardais não apresentaram sinais clínicos, nem soroconversão. No entanto, *M. gallisepticum* foi isolado de suabes traqueiais até o 7º dia após a infecção experimental em ambas as espécies. Esses pesquisadores sugerem que, apesar de susceptíveis ao microrganismo, os pombos podem não manter um estado de portador da mesma maneira que frangos. Atuando principalmente como vetores mecânicos e não como vetores biológicos do patógeno, uma vez que após a infecção, só excretam o microrganismo por um curto período de tempo (GHARAIBEH; HAILAT, 2011). Tais hipóteses podem ser melhor entendidas com a realização de estudos mais amplos, especialmente para esclarecer o real potencial de Columbiformes em disseminar *M. synoviae* e *M. gallisepticum*.

A *Salmonella Pullorum* e a *Salmonella Gallinarum* são agentes etiológicos de doenças que acarretam enormes prejuízos à avicultura mundial, a pulorose e o tifo aviário, respectivamente (SHIVAPRASAD, 2003). Por essa razão, esses patógenos também fazem parte do PNSA (BRASIL, 2009b). Ações importantes dos planos de erradicação incluem a eliminação de aves infectadas, adoção de provas sorológicas para monitoramento de plantéis, identificação do sorotipo do patógeno isolado e medidas rigorosas de biossegurança nas instalações comerciais (BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2009).

Quanto à questão da biossegurança nas instalações comerciais, cada vez mais estudos vem sendo conduzidos quanto ao potencial de espécies sinantrópicas em transmitir patógenos e/ou contribuir para a sua manutenção no meio ambiente (SOUSA, 2007; LAPUZ et al.; 2012).

Uma característica importante das *Salmonella* spp. é o fato de permanecerem viáveis por longos períodos em condições ambientais favoráveis (SHIVAPRASAD, 2003). Em fezes de aves, por exemplo, podem sobreviver por até 28 meses (RODRIGUES, 2005). Essa característica é relevante em relação ao local onde os pombos deste estudo foram capturados, armazéns e silos utilizados para a estocagem de grãos destinados em parte para o consumo de animais de produção.

É importante considerar que animais portadores são importantes fontes de infecção, uma vez que podem excretar as bactérias pelas fezes intermitentemente por meses ou anos (CLARKE; GYLES, 1986; HALES; HALES, 2003). Dessa forma, o estudo da ocorrência de *Salmonella* sp. em qualquer espécie animal que possa atuar como potencial reservatório e disseminador desse patógeno contribui para a adoção de medidas profiláticas eficazes.

Assim como na investigação de *Mycoplasma* spp., a técnica sorológica inicial empregada para a detecção de anticorpos anti-*Salmonella Pullorum/Gallinarum* nos pombos foi a SAR, também preconizada pelo PNSA (BRASIL, 2009b). No total 0,4% das amostras analisadas foram reagentes. A SAR também foi empregada por Sousa (2007) em aves de vida livre capturadas próximo às instalações avícolas em São José do Rio Preto, São Paulo. Do total de 82 amostras analisadas, a única reagente foi de uma curicaca (*Theristicus caudatus*), da ordem Pelicaniformes. Embora 15% (12/82) das aves capturadas fossem da ordem Columbiformes, nenhuma foi sororeagente.

Por outro lado, Espinosa-Angüelles et al. (2010) realizaram um levantamento sorológico com a SAR em Columbiformes do gênero *Zenaidura* spp. de vida livre no México. Das amostras analisadas 26% (53/201) foram reagentes. Esses autores, no entanto, não realizaram outros testes sorológicos confirmatórios. No presente estudo, a amostra reagente foi encaminhada para

um laboratório particular credenciado pelo MAPA para a confirmação pelo teste de soroaglutinação lenta em tubos, sendo não-reagente.

De acordo com Friend e Franson (1999) a ocorrência natural de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em Columbiformes de vida livre é pouco frequente. Alguns autores inclusive sugerem a hipótese de pombos serem potencialmente resistentes à esses patógenos (SHIVAPRASAD, 2003; BERCHIERI JÚNIOR; OLIVEIRA, 2009). Porém, tal hipótese só pode ser confirmada através de pesquisas com infecções experimentais. Neste estudo, a presença de anticorpos anti-*S. Pullorum*/*Gallinarum* não foi confirmada pelo teste de soroaglutinação lenta realizado subsequente à SAR. Esse resultado sugere que, provavelmente as aves não foram expostas aos patógenos pesquisados. No entanto, na literatura veterinária, as *Salmonella* spp. mais frequentemente relacionadas com Columbiformes são as paratíficas e não as aqui pesquisadas.

Pasmans et al. (2004) isolaram *Salmonella* Typhimurim de 3,3% (5/152) de pombos de vida livre na cidade de Gent, na Bélgica. Marciano (2004) também isolou esse mesmo sorovar em 6,3% (8/126) dos órgãos de pombos analisados em um estudo conduzido na cidade de Jabotical, São Paulo. Já Pedersen et al. (2006) investigaram *Salmonella* spp. em 277 pombos, sendo esses capturados tanto em ambientes urbanos como em locais utilizados para a criação de gado leiteiro. *Salmonella* spp. foi isolada a partir de suabes cloacais somente de pombos capturados nos locais de criação de gado, sendo *S. Typhimurium* e *S. Montevideo* isoladas de 1% (3/277) das aves, entre outras. No entanto, *S. Montevideo* também foi isolada de amostras de água, alimento e esterco coletadas nas instalações da fazenda. Esse sorovar é conhecido por causar salmonelose no gado e é um dos 20 sorovares mais reportados pelo CDC como causa de toxinfecções em seres humanos (PEDERSEN et al., 2006; CDC, 2010). Dentro desse contexto, ressalta-se a importância da vigilância epidemiológica e a adoção de medidas de biossegurança em instalações vinculadas às criações comerciais.

Quanto à sazonalidade, em vista dos resultados negativos obtidos não foi possível avaliar se há algum fator que possa interferir em maiores prevalências da infecção ao longo de um determinado período ou época do ano. No entanto, de acordo com Friend e Franson (1999) nos EUA surtos de salmonelose em Passeriformes atribuídos à *S. Typhimurium* ocorrem principalmente durante o inverno. Nesse período a disponibilidade de alimento é menor e um grande número de aves se aglomera nos jardins onde às pessoas deixam grãos e sementes para que as aves de vida livre se alimentem. Provavelmente os surtos são decorrentes da contaminação desse alimento pelas fezes de aves carreadoras de *Salmonella* spp. (STROUD;

FRIEND, 1987), estando mais relacionados com a aglomeração das aves do que pela estação do ano em si.

O terceiro microrganismo estudado foi o APMV-1, agente etiológico da DN. Devido ao risco que a ocorrência dessa enfermidade representa para a avicultura brasileira, além do PNSA, existe também o “Plano de Contingência para a Influenza Aviária e Doença de Newcastle” formulado pela Coordenação de Sanidade Avícola do MAPA (BRASIL, 2009a). Entre as ações preventivas preconizadas em tal documento está a vigilância ativa do APMV-1 tanto em aves comerciais como em aves de vida livre.

Embora esse agente tenha sido investigado em 240 pombos, ao longo de 1 ano, não foi detectado pela RT-PCR. Esse resultado é condizente com uma pesquisa realizada em 172 pombos no Estado de São Paulo, na qual o patógeno não foi detectado pela mesma técnica (CARRASCO, 2005). Ainda assim, no Brasil, estudos epidemiológicos de microrganismos potencialmente patogênicos são escassos em Columbiformes quando comparados às investigações conduzidas em outros países.

Alexander (2011) publicou uma extensa revisão sobre o APMV-1 em aves silvestres e comerciais na União Européia (UE) entre os anos de 2000 a 2009. Dos 27 países que integram a UE, 23 possuem registros da ocorrência do APMV-1 em pombos, sendo que em determinados países a detecção do vírus a partir de amostras de Columbiformes ocorre anualmente. Ainda, nesses 10 anos investigados, o autor cita surtos importantes em aves comerciais: na Suécia em 2001 (em 6.370 frangos de corte), na França em 2005 (em 1.500 faisões) e na Estônia em 2007 (5.122 poedeiras). Em 2005 e 2006 ocorreram dois surtos em plantéis de pombos criados para consumo humano, com mortalidade de 8.500 e 5.250 aves, respectivamente. O autor não cita as fontes de infecções que desencadearam os surtos, no entanto, em todos eles métodos sorológicos e moleculares permitiram a caracterização viral do APMV-1 como um PPMV-1.

A análise filogenética de diferentes estirpes virais é importante para um melhor entendimento da adaptação do vírus ao hospedeiro e sua disseminação no mundo. Sabe-se, por exemplo, que o PPMV-1 foi o patógeno responsável pela panzootia da década de 1980, cuja rápida disseminação na Europa e em muitos outros países ocorreu principalmente devido à prática de competições de pombos correios (ALEXANDER, 1988; UJVÁRI et al., 2003). Ressalta-se, no entanto que, os *primers* aqui empregados permitem a amplificação do APMV-1 independentemente da variante, patogenicidade ou espécie hospedeira infectada (OBERDORFER; WERNER, 1998), detectando inclusive estirpes vacinais e o PPMV-1.

Técnicas moleculares também foram empregadas por Taddei et al. (2011) para diagnosticar um surto da doença de Newcastle em Columbiformes na Itália, onde foi observada uma mortalidade de 3.000 rolinhas-turcas (*Streptopelia decaocto*) de vida livre. O APMV-1 foi detectado pela técnica de RT-PCR em 90% (168/185) das amostras analisadas. Mortalidades nessa espécie aviária decorrentes da infecção pelo AMPV-1 também foram observadas nos EUA, onde 50 rolinhas-turcas foram introduzidas em 1974 e após 13 anos a população estimada era de cerca de 10.000 aves (SCHULER et al., 2012). Em 2001, 2006, 2008 e 2009 foram observadas mortalidades variáveis dessas aves no Estado da Flórida, Montana e Arizona. As amostras desses pombos foram enviadas para os laboratórios oficiais de sanidade animal que identificaram o vírus após isolamento e realização da RT-PCR. Schuler et al. (2012) ainda afirmam que uma das maiores preocupações quanto ao diagnóstico realizado e o crescimento contínuo dessa população é o potencial de disseminação do agente para aves comerciais.

Frente à importância desse patógeno e a escassez de informações sobre sua prevalência em populações de Columbiformes no país, amostras de soros dos pombos capturados no presente estudo foram enviadas para um laboratório credenciado pelo MAPA para a realização da técnica de HI, preconizada tanto pelo PNSA (BRASIL, 2009b) como pela OIE (OIE, 2011a). Das 178 amostras submetidas nenhuma apresentou resultado reagente. Esse resultado é compatível com os resultados obtidos por Chang, Icochea e Alba (1999) que investigaram a presença de anticorpos-anti APMV-1 pela técnica de HI em 398 pombos na cidade de Chancay no Peru, sendo todas não-reagentes.

Por outro lado, Vucemilo et al. (2003) realizaram um estudo soroepidemiológico em 179 pombos na Croácia, detectando anticorpos anti-APMV-1 pelo HI em 30% (36/123) dos pombos de vida livre e em 14% (8/56) dos pombos-correios. Outro estudo conduzido em 237 pombos na Polônia demonstrou a presença de anticorpos anti-APMV-1 em 48% das aves avaliadas (PIASECKI, 2006).

No Brasil, Carrasco (2005) detectou 2,3% (4/172) de pombos soropositivos, sendo duas aves provenientes da cidade de Ribeirão Preto e duas da cidade de São Paulo. Por sua vez, Sousa et al. (2010) detectaram anticorpos anti-APMV-1 em 5,5% (6/109) dos pombos analisados na cidade de Jaboticabal. Oliveira Júnior et al. (2003) pesquisaram anticorpos anti-APMV-1 pela técnica de HI em diversas espécies de aves silvestres e domésticas no Rio de Janeiro. Das amostras analisadas 1,4% (12/837) foram reagentes. As espécies silvestres soropositivas foram faisão prateado (*L. leucomelana*), carcará (*P. plancus*), coruja buraqueira (*A. cunicularia*) e urubutinga (*B. urubutinga*). As aves domésticas soropositivas eram galinhas criadas em fundo de quintal. Os autores relatam que previamente à realização do HI as

amostras de soro foram aquecidas por 30 minutos a 56°C para a remoção de fatores inespecíficos que inibem a hemaglutinação, evitando assim resultados falso-positivos. No entanto, os autores não discutem a possibilidade destes resultados serem provenientes da exposição das aves à uma estirpe vacinal, uma vez que vacinas constituídas de vírus vivo atenuado são amplamente utilizadas na avicultura comercial. Essa condição foi relatada por Silva et al. (2006) em um estudo conduzido em Pernambuco. Os autores realizaram uma pesquisa em pardais (*Passer domesticus*) capturados em granjas comerciais, sendo 3% (3/103) soropositivos pela técnica de HI. Além disso, o vírus foi isolado e posteriormente o índice de patogenicidade intracerebral foi determinado (0,21), sendo compatível com o índice da estirpe vacinal (0,21) utilizada nas granjas comerciais. Segundo Orsi et al. (2011) pesquisadores do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) obtiveram em 2010, 15 isolados de APMV-1 provenientes de amostras de aves silvestres. O autor não menciona as espécies de aves, mas afirma que de acordo com a análise filogenética todas as estirpes eram vacinais.

No presente estudo não houve evidência da ocorrência do APMV-1 nas amostras de pombos analisadas. No entanto, a vigilância epidemiológica constante realizada nas espécies aviárias que possam atuar como fonte de infecção para aves comerciais é uma medida importante para o sucesso da profilaxia do APMV-1. Especialmente quando levado em consideração a quantidade de surtos da DN relacionados com Columbiformes descritos na literatura veterinária mundial (ALEXANDER et al.; 1985a; TORO et al., 2005; IRVINE et al., 2006; ALEXANDER, 2011; TADDEI et al., 2011; SCHULER et al.; 2012).

Na Inglaterra em 1984, uma estirpe viral foi responsável por 20 surtos da DN em frangos de corte como resultado da contaminação da ração por fezes de pombos infectados que viviam em uma fábrica de ração (ALEXANDER, 1985a). Fato relevante em relação ao local onde os pombos foram capturados no presente estudo, armazéns e silos utilizados para a estocagem de grãos destinados em parte para o consumo animal. Frente aos resultados obtidos nessa pesquisa novos estudos epidemiológicos são necessários para a determinação da ocorrência de estirpes de APMV-1 nas populações de Columbiformes de vida livre no país.

O quarto patógeno investigado nessa pesquisa foi a *Chlamydophila psittaci*, bactéria com potencial zoonótico comumente detectada em pombos (MAGNINO et al., 2009). O DNA da *C. psittaci* foi detectado em 13,3% (32/240) das amostras de pombos aqui analisadas. De acordo com a literatura internacional, a prevalência desse patógeno em populações de pombos é bastante variável. Em uma pesquisa realizada na Bélgica, a presença de *C. psittaci* foi investigada pela técnica de PCR em pombos de vida livre sendo detectada em 1,6% (1/61) das amostras de suabe cloacal coletadas (DICKX et al., 2010). Os autores atribuem a baixa

prevalência de *C. psittaci* nos pombos ao fato da coleta do material biológico ter sido realizada na fase de baixa atividade reprodutiva. Alguns autores consideram a atividade reprodutiva um fator estressante para ave, que por sua vez, pode re-eliminar as bactérias em casos de infecções latentes (FLAMMER, 1997).

No Brasil a atividade reprodutiva dos pombos foi observada durante todo o período da pesquisa, nos 12 meses de captura houve presença de filhotes e juvenis nas armadilhas. Isso pode ser um dos fatores que contribuiu para a detecção da bactéria em um maior número de aves. No entanto, diversos outros fatores podem contribuir para que as aves fiquem mais susceptíveis à infecção quando expostas à *C. psittaci*, como por exemplo, ambientes insalubres, superpopulação, má nutrição e doenças concomitantes (FLAMMER, 1997).

Geigenfeind; Vanrompay e Haag-Wackernagel (2012) conduziram uma pesquisa ao longo de dois anos, com pombos na cidade de Basel na Suíça. Os autores detectaram o DNA de *C. psittaci* em somente 8,4% (17/202) das amostras analisadas pela técnica de nested PCR, técnica molecular mais sensível do que a empregada aqui. No entanto, na Suíça existem programas específicos direcionados ao controle populacional de pombos nos centros urbanos. Tais programas investem não só na redução do número de aves de vida livre, mas também na manutenção de aves mais saudáveis. As medidas adotadas consistem no fornecimento controlado de alimento de boa qualidade e abrigo para um número reduzido de pombos, ao mesmo tempo em que as aves doentes são eutanasiadas (GEIGENFEIND; VANROMPAY; HAAG-WACKERNAGEL, 2012).

Gasparini et al. (2011) observaram que a prevalência de *C. psittaci* em determinadas populações de pombos urbanos em Paris vêm diminuindo após a adoção destes programas específicos direcionados a melhoria da saúde das aves. Em algumas regiões da cidade foram construídas estruturas onde os pombos têm livre acesso, denominadas de “*pigeon houses*” (casas dos pombos). Nessas locais a oferta de alimento é controlada, há supervisão veterinária e um tratador para manter o local limpo. Assim, em locais onde há o problema de super população de pombos sem nenhum tipo de controle sanitário, é provável que haja um maior número de aves positivas para *C. psittaci*, visto que tais condições favorecem a transmissão de doenças infecciosas e parasitárias e o estresse pela disputa dos sítios de nidificação e alimentos (HAAG-WACKERNAGEL, 1995).

Ainda, nas cidades onde os programas de controle de pombos são empregados, as pessoas são educadas para não alimentar essas aves em locais públicos. Segundo Haag-Wackernagel (1995) essa medida é essencial para a manutenção de um número reduzido e constante de aves resultante dos programas adotados, uma vez que a alimentação controlada é o fator limitante

para evitar o crescimento populacional. Tais medidas poderiam servir de exemplo para instituições sanitárias de outros países, uma vez que os transtornos desencadeados por pombos ocorrem em centros urbanos em todo o mundo.

De uma maneira geral, pombos urbanos são considerados potenciais reservatórios de agentes zoonóticos. Haag-Wackernagel e Moch (2004) fizeram uma extensa revisão bibliográfica a respeito do potencial dessas aves em transmitir zoonoses para seres humanos. Os pombos estavam relacionados direta ou indiretamente com 101 casos de psitacose descritos na literatura. Cerca de 53% dos casos estavam relacionados com um contato próximo com pombos de vida livre e/ou suas excretas. Outros 27% estavam associados com exposição ocupacional à poeira contaminada, ou seja, casos em que o trabalhador de alguma forma inalou partículas de fezes, penas ou outras secreções de pombos infectados. Pospíšil et al. (1988) descreveram um surto de psitacose em 22 trabalhadores que estavam envolvidos na reconstrução de uma igreja em Kosice, na Eslováquia. Nesse caso, a fonte de infecção foi atribuída a presença de fezes de pombos contaminadas pelo agente.

Pesquisas de *C.psittaci* em pombos de vida livre são realizadas em diversos países da Europa. Segundo Magnino et al. (2009) métodos moleculares são utilizados com sucesso para o diagnóstico direto do patógeno, sendo o DNA de *C. psittaci* detectado em até 50% das populações estudadas. No Brasil, ao contrário de outros países, a ocorrência da *C. psittaci* em pombos de vida livre é pouco investigada. Em um estudo realizado por Lima, Raso e Araújo Júnior (2003) em um parque Zoológico na cidade de Bauru/SP, a presença da bactéria foi detectada pela técnica de nested PCR em 27,4% (14/51) dos pombos analisados. Pessoas que frequentam locais com altas densidades de aves sinantrópicas podem ser de alguma forma expostas à *C. psittaci*. Isso não significa que qualquer indivíduo que tiver contato com essas aves irá se infectar com a bactéria. No entanto, pessoas que são expostas com mais frequência, por atividades ocupacionais ou mesmo por lazer, devem ser informadas sobre essa zoonose e se proteger adequadamente. Por exemplo, funcionários devem utilizar luvas e máscaras para a higienização de locais com excretas de pombos e as pessoas devem ser orientadas para evitar um contato próximo com essas aves, não alimentá-las e não manipulando pombos enfermos (LONGBOTTOM; COULTER, 2003, HAAG-WACKERNAGEL; MOCH, 2004). Ressalta-se, contudo, que no Brasil os dois surtos de psitacose descritos em literatura foram decorrentes do contato próximo com caturritas (*Myiopsita monachus*) (ALMEIDA et al., 2004; RASO et al., 2009). De qualquer maneira, uma vez que a população de pombos é crescente em muitas cidades brasileiras, há que se avaliar os riscos que essas aves representam à saúde pública.

Outra questão a ser considerada no local onde o atual estudo foi conduzido é a contaminação de grãos e sementes destinados ao consumo de aves de produção. Apesar da principal via de transmissão do patógeno entre as aves ser inalatória, a infecção pela ingestão do microrganismo também pode ocorrer (VANROMPAY; DUCATELLE; HAESBROUCK; 1995).

De acordo com Locke (1987) e com Friend e Franson (1999) a transmissão de *C. psittaci* entre aves de vida livre pode ocorrer com maior frequência em determinada época do ano particularmente pelo comportamento biológico de algumas espécies. Por exemplo, aves aquáticas que se aglomeram em grandes colônias na estação reprodutiva ou aves migratórias que formam grandes bandos para migrar. No entanto, casos individuais da doença podem ocorrer ao longo de todo o ano especialmente pelo fato de algumas aves permanecerem com infecções latentes por longos períodos de tempo, podendo ser reativadas por causas diversas (mudança brusca de temperatura, doenças concomitantes, etc.).

Nessa pesquisa, na cidade de Tatuí a detecção da *C. psittaci* nas aves foi semelhante em ambas as estações, sendo 16,7% na estação seca e 18,4% na estação chuvosa. Por outro lado, em São Paulo, 13,3% das amostras positivas foram provenientes de aves capturadas na estação chuvosa e 5% de aves capturadas na estação seca. Não houve diferença estatística entre o número de amostras positivas em cada estação. Entretanto, no período de chuva em São Paulo houve inúmeros alagamentos no local de coleta (particularmente de dezembro a março). Isso poderia ter afetado a oferta de alimento para os pombos, comprometendo a saúde dessas aves, predispondo-as à novas infecções ou reativação de infecções latentes.

Em relação ao total de amostras positivas em cada localidade, em Tatuí, o DNA de *C. psittaci* foi detectado em 17,5% das amostras analisadas, quase o dobro do número total de amostras positivas observadas na cidade de São Paulo (9,2%). Apesar da variação da prevalência do patógeno nas duas populações estudadas, não houve diferença estatística significativa. Contudo, é interessante notar que a cidade de Tatuí teve temperaturas médias diárias mais elevadas que a cidade de São Paulo, com médias mensais de chuvas menores ao longo do ano (Tabela 1, Figuras 7 e 8).

Alguns autores descrevem a interferência do clima na eliminação de *C. psittaci* pelo hospedeiro. Lublin et al. (1996) conduziram estudos em espécies da Ordem Passeriformes, Psittaciformes e Columbiformes durante quatro anos e observaram que aves infectadas eliminam o agente com maior frequência nos meses mais quentes do ano. Posteriormente realizaram um estudo ao longo de um ano com 65 pombos e também observaram que a eliminação de *C. psittaci* foi maior durante o verão em relação às demais estações do ano

(LUBLIN; LEIDERMAN; WEISMAN, 1999). Dessa forma, seria interessante investigar se a maior prevalência da *C. psittaci* em aves de vida livre pode estar relacionada com climas mais quentes. Destaca-se ainda que um dos maiores surtos observados em aves de vida livre ocorreu no verão de 1986 na América do Norte, onde mais de 400 gaivotas (*Larus* sp.) vieram à óbito sendo a causa atribuída à *C. psittaci* (FRANSON; PEARSON, 1995). No entanto, as aves acometidas eram em sua maior parte, ninhegos presentes em ilhas utilizadas para reprodução. Nesse caso os fatores predisponentes podem ter sido também a maior susceptibilidade de indivíduos jovens e a aglomeração de aves na estação reprodutiva.

Para uma profilaxia eficaz da clamidiose aviária é fundamental a implementação de medidas rigorosas de higiene e desinfecção em ambientes contaminados, isolamento das aves doentes, manejo nutricional e sanitário adequado (RASO, 2007). No entanto, tais medidas são mais fáceis de serem adotadas em plantéis de aves cativas em relação às populações de vida livre. Assim, a vigilância epidemiológica da *C. psittaci* em potenciais reservatórios, como os pombos, pode incentivar as autoridades competentes a incrementar medidas de controle destas aves e conseqüentemente dos patógenos que circulam nessas populações.

7 CONCLUSÃO

Os resultados da pesquisa sazonal de patógenos inseridos no Programa Nacional de Sanidade Avícola e de *C. psittaci* em pombos de vida livre residentes em áreas de comercialização e armazenamento de grãos e sementes permitem às seguintes conclusões:

- Não houve evidências da ocorrência de *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *Salmonella Pullorum/Gallinarum* e paramixovírus aviário do tipo 1 nas populações estudadas.
- A *Chlamydophila psittaci* foi detectada nos pombos capturados em São Paulo e Tatuí, em ambas as estações, fato que serve como um alerta quanto aos riscos que estes podem representar para a saúde das pessoas.
- Na cidade de Tatuí a prevalência da *C. psittaci* foi semelhante em ambas as estações. Na cidade de São Paulo, entretanto, houve uma prevalência maior da *C. psittaci* nos pombos capturados na estação chuvosa sem, contudo, haver diferença estatística significativa.
- Estudos epidemiológicos mais amplos são necessários para a elucidação do real risco que Columbiformes sinantrópicos representam quanto a disseminação desses agentes.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTRA, J. B.; MENDES, F. R.; BARNABÉ, A. C. S.; CAFÉ, M. B.; JAIME, V. S.; ANDRADE, M. A. Avaliação dos testes sorológicos para *Mycoplasma gallisepticum* em relação às medidas de biossegurança In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2011 Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2011.

ALEXANDER, D. J.; WILSON, G. W. C.; RUSSEL, P. H.; LISTER, S. A.; PARSONS, G. Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. **Veterinary Record**, v. 117, p. 429-434, 1985a

ALEXANDER, D. J.; RUSSELL, P. H.; PARSONS, G.; ABU ELZEIN, E. M. E.; BALLOUH, A.; CERNIK, K.; ENGSTROM, B.; FEVEREIRO, M.; FLEURY, H. J. A.; GUITTET, M.; KALETA, E. F.; KIHM, U.; KOSTERS, J.; LOMNICZI, B.; MEISTER, J.; MEULEMANS, G.; NEROME, K.; PETEK, M.; POKOMUNSKI, S.; POLTEN, B.; PRIP, M.; RICHTER, R.; SAGHY, E.; SAMBERG, Y.; SPANOGHE, L.; TUMOVA, B. Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons – an international collaborative study. **Avian Pathology**, v. 14, p. 365-376, 1985b.

ALEXANDER, D. J.; PARSONS, G. Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-85. **Avian Pathology**, v.15, p. 487-493, 1986.

ALEXANDER, D. J. **Newcastle Disease**. London: Kluwer Academic Publishers, 1988. 378p.

ALEXANDER, D. J. Newcastle Diseases, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 63-86.

ALEXANDER, D. J. Doença de Newcastle. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri, São Paulo: Manole, 2009. p. 221-228.

ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease in European Union 2000 to 2009. **Avian Pathology**, v. 40, n. 6, p. 547-558, 2011.

ALMEIDA, M. A. B.; SANTOS, E.; RASO, T. F.; SALVI, M. L.; BERCINI, M. Ocorrência de psitacose humana em Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, associada ao contato com caturritas (*Myiopsitta monachus*) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ORNITOLOGIA, 7., 2004, Blumenau. **Anais...** Santa Catarina: CBO, 2004. p. 131.

ALTIZER, S.; DAVIS, A. K.; COOK, K. C.; CHERRY, J. J. Age, sex and season affect the risk of mycoplasmal conjunctivitis in a southeastern house finch population. **Canadian Journal of Zoology**, v. 82, p. 755-763, 2004.

ANDERSEN, A. A. Chlamydiosis. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4 ed. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists, 1998. p. 81-88.

ANDERSEN, A. A.; FRANSON, J. C. Avian chlamydiosis. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. H.; ATKINSON, C. T. **Infectious diseases of Wild Birds**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. p. 303-316.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n.º 354, 11 de agosto de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 ago. 2006. Sec. 1.

APPA. ADMINISTRAÇÃO DOS PORTOS DE PARANAGUÁ E ANTONINA. **APPA reduz a população de pombos na área portuária de Paranaguá**. 2012. Disponível em: <<http://www.portosdoparana.pr.gov.br>>. Acesso em 11 maio 2012.

BARROW, P. A. Monitorias e controle das salmonelas em reprodutoras na Europa. In: COFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1998. Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1998. p. 1-7.

BARROW, P. A. *Salmonella* control – past, present and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651-659, 1993.

BELCHIOR, E.; BARATAUD, D.; OLLIVER, R.; CAPEK, I.; LAROUCAU, K.; BARBEYRAC, B.; HUBERT, B. Psittacosis outbreak after participation in a bird fair, Western France, December 2008. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 10, p. 1637-1641, 2011.

BENSKIN, C. M. H.; WILSON, K.; JONES, K.; HARTLEY, I. R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of frequency and effects of infection. **Biological Reviews**, v. 84, p. 349-373, 2009.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Tifo aviário. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri, São Paulo: Manole, 2009. p. 129-136.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aves**. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em: 02 maio 2012.

BRASIL. Ministério Público Federal. **Ação civil pública 5000412-67.2010.404.7008/PR**. 2011. Disponível em <<http://s.conjur.com.br/dl/sentenca-justica-federal-parana-multa.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle**. Brasília, 2009a, versão 1.3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Legislação – Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil**. Brasília: BINAGRI, 2009b. 440p.

BUCHER, E. H.; RANVAUD, R. D. Eared dove outbreaks in South America: patterns and characteristics. **Acta Zoologica Sinica**, v. 52, p. 564-567, 2006.

BUIM, M. **Micoplasmose aviária**. Comunicado técnico, Instituto Biológico, 2012. Disponível em: <http://www.biológico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=9>. Acesso em: 04 maio 2012.

BUTCHER, G. D. *Mycoplasma Gallisepticum* - **A Continuing Problem in Commercial Poultry**. Center for Food Security and Public Health, 2012. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/avian_mycoplasmosis_mycoplasma_gallisepticum.pdf>. Acesso em: 05 abril 2012.

CARRASCO, A. O. T. **Infecção experimental de pombos com estirpes do vírus da doença de Newcastle de baixa e alta patogenicidade**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2005.

CARRASCO, A. O. T.; SEKI, M. C.; RASO, T. F.; PAULILLO, A. C.; PINTO, A. A. Experimental infection of Newcastle diseases virus in pigeons (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome sheeding. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 1-2, p. 89-96, 2008.

CAVANAGH, D. Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization. **Avian Pathology**, v. 30, n. 6, p. 581-598, 2001.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella investigation, multistate outbreak of human Salmonella Montevideo infections**. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo/index.html>>. Acesso em: 31 maio 2012.

CEAGESP. COMPANHIA DE ENTREPOSTOS E ARMAZÉNS GERAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **História**. 2012. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/acessoainformacao/institucional/historico>>. Acesso em: 02 maio 2012.

CERUTTI, M. Programa de qualidade higiênica na produção avícola. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 53-74.

CFSPH. CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. **Avian Mycoplasmosis**. Iowa: Iowa State University, 2007. Disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/avian_mycoplasmosis_mycoplasma_gallisepticum.pdf>. Acesso em: 05 maio 2012.

CHANG, B. P.; ICOCHEA, D. A. E.; ALBA, M. Detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres Passeriformes y Columbiformes en la provincia de Chancay. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 10, n. 2, p. 79-81, 1999.

CIAGRO. CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS. **Monitoramento agrometeorológico**. 2012. Disponível em <http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Listagens/MonAgro2004/LMonAgroLocal.asp>>. Acesso em: 21 abr. 2012.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 1. ed. Iowa : Iowa State University Press, 1986. p. 95-107.

CLAVIJO, A.; ROBINSON, Y.; BOOTH, T.; MUNROE, F. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 41, n. 5, p. 404-406, 2000.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2012**. Brasília: CONAB, 2012. 37 p.

CVS. CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Normas técnicas para empresas prestadoras de serviço em controle de vetores e pragas urbanas**. 2000. Disponível em: <http://www.abcvp.com.br/arquivos/www.abcvp.com.br/noticias/4.pdf>>. Acesso em: 11 maio 2012.

DICKX, V.; GEENS, T.; DESCHUYFFELEER, T.; TYBERGHIEN, L.; HARKINEZHAD, T.; BEECKMAN, D. S.; BRAECKMAN, L.; VANROMPAY, D. *Chlamydothila psittaci* zoonotic risk assessment in a chicken and turkey slaughterhouse. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3244-3250, 2010.

DIMITROV, K. M.; MANVELL, R. J.; GOUGOULOVA, G. V. Status of wild birds in Bulgarian zoos with regard to orthomyxovirus and paramyxovirus type 1 infections. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 361-364, 2010.

ESPINOSA-AGÜELLES, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, N.; INFANTE-RODRÍGUEZ, J.; FLORES-MALDONADO, J. J.; ZERTUCHE-RODRÍGUEZ, J. L.; FLORES-GUTIÉRREZ, G. H. F. Seroprevalence of antibodies against *Salmonella enterica* subsp. Enterica serovar Gallinarum-Pullorum in wild doves (*Z. asiatica* and *Z. macroura*) from the Northeast of Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 77-79, 2010.

FIORENTIN, L. *Mycoplasma iowae*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri, São Paulo: Manole, 2009. p. 112-116.

FIORENTIN, L.; JAENISH, F. R. Tentativa de infecção experimental da pomba-rola (*Columba picui*) com *Mycoplasma synoviae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 573-575, 1994.

FISHER, J. R.; STALLKNECHT, D. E.; LUTTRELL, M. P.; DHONDT, A. A.; CONVERSE, K. A. Mycoplasma conjunctivitis in wild songbirds: the spread of a new contagious disease in a mobile host population. **Emerging Infectious diseases**, v. 3, p. 69-72, 1997.

FLAMMER, K. *Chlamydia*. In: ALTMAN, R.; CLUBB, S. L.; DORRESTEIN, G. M.; QUESENBERY, K. **Avian Medicine and Surgery**. Philadelphia, PA: Saunders, 1997. p. 364-378.

FRANSON, J. C.; PEARSON, J. E. Probably epizootic chlamydiosis in wild California (*Larus californicus*) and ring-billed (*Larus delawarensis*) gulls in North Dakota. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 3, p. 424-427, 1995.

FRIEND, M.; FRANSON, J. C. **Field Manual of Wildlife Diseases: Birds**. Washington: Library of Congress, 199. 426 p. Information and Technology Report 1999-2001.

FUDGE, A. M. A review of methods to detect *Chlamydia psittaci* in avian patients. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 11, n. 3, p. 153-165, 1997.

FUNASA. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Controle de Vetores, procedimentos de segurança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 208 p.

GASPARINI, J.; ERIN, N.; BERTIN, L.; JACQUIN, L.; VORIMORE, F.; FRANTZ, A.; LENOUVEL, P.; LAROUCAU, K. Impact of urban environment and host phenotype on the epidemiology of *Chlamydiaceae* in feral pigeons (*Columba livia*). **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 3186-3193, 2011.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 567-568.

GEIGENFEIND, I.; VANROMPAY, D.; HAAG-WACKERNAGEL, D. Prevalence of *Chlamydia psittaci* in the feral pigeon population of Basel, Switzerland. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, p. 261-265, 2012.

GERLACH, H. *Mycoplasma* and Rickettsia. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine, Principles and Application**. Florida: Wingers Publishing, 1994a. p. 1053 -1063.

GERLACH, H. *Chlamydia*. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine, Principles and Application**. Florida: Wingers Publishing, 1994b. p.984-996.

GHARAIBEH, S.; HAILAT, A. *Mycoplasma gallisepticum* experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows and pigeons. **Avian Pathology**, v. 40, n. 4, p. 349-354, 2011.

GOSBELL, I. B.; ROSS, A. D.; TURNER, I. B. *Chlamydia psittaci* infection and reinfection in a veterinarian. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 8, p. 511-513, 1999.

GRIMES, J. E. Detection of chlamydial infections. In: ROSSKOPF JR. W. J.; WOERPEL, R. W. **Diseases of Cage and Aviary Birds**. 3.ed. Malvern: Williams & Williams, 1996. p. 827-835.

HAAG-WACKERNAGEL, D. Regulation of the street pigeon in Basel. **Wildlife Society Bulletin**, v. 23, n. 2, p. 256-260, 1995.

HAAG-WACKERNAGEL, D.; MOCH, H. Health hazards posed by feral pigeons. **Journal of Infection**, v. 48, n. 4, p. 307-313, 2004.

HALES, R. C.; HALES, M. A. *Salmonella: Market opportunities for the animal health industry*. Animal Pharm Reports. New York: PJB Publications. 2003. 130 p.

HARKINEZHAD, T.; GEENS, T.; VANROMPAY, D. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. **Veterinary Microbiology**, v. 135, n. 1-2, p. 68-77, 2008.

HARLIN, R.; WADE, L. Bacterial and parasitic diseases of Columbiformes. **The veterinary clinics of North America, Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 453-473, 2009.

HARTUP, B. K.; DHONDT, A. A.; SYDENSTRICKER, K. V.; HOCHACHKA, W. M.; KOLLIAS, G. V. Host range and dynamics of mycoplasmal conjunctivitis among birds in North America. **Journal of Wildlife diseases**, v. 37, n. 1, p. 72-81, 2001.

HURTADO, R. F.; GUIMARÃES, M. B.; BELLO, C. P.; FERREIRA, A. J. P. Surveillance of Paramyxovirus type 1, Avian influenza virus and *Mycoplasma gallisepticum* in free-ranging birds caught near commercial poultry farms in São Paulo State, Brazil. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WILDLIFE DISEASE ASSOCIATION, 60; 2011, Québec. **Anais...** Québec, Canada: Wildlife Disease Association, 2011. p. 113.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa n.º 141, 19 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 dez 2006. Sec. 1.

IMMERSEEL, F. V.; BUCK, J. D.; PASMANS, F.; BOHEZ, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Intermittent long-term shedding and induction of carrier birds after infection of chickens early posthatch with a low or high dose of *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, v. 83, p. 1911-1916, 2004.

IRVINE, R. M.; ALDOUS, E. W.; MANVELL, R. J.; COX, W. J.; CEERAZ, V.; FULLER, C. M.; WOOD, A. M.; MILNE, J. C.; WILSON, M.; HEPPLER, R. G.; HURST, A.; SHARPE, C. E.; ALEXANDER, D. J.; BROWN, I. H. Outbreak of Newcastle disease due to pigeon paramyxovirus type I in Scotland in October 2006. **Veterinary Record**, v. 165, p. 531-535, 2009.

JESTIN, V.; JESTIN, A. Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). **Archives of Virology**, v. 118, p. 151-161, 1991.

JOHNSTON, R. F. Synantropics birds of North America. In: MARZLUFF, J. M.; BOWMAN, R.; DONNELLY, R. **Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World**. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 49-66.

KALETA, E. F.; BALDAUF, C. Newcastle disease in free-living pet birds. In: ALEXANDER, D. J. **Newcastle Diseases**. Boston: Kluwer Academic, 1988. p. 197-246.

KALETA, E. F.; TADAY, E. M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. **Avian Pathology**, v. 32, n. 5, p. 435-462, 2003.

KEYMER, I. F.; LEACH, R. H.; CLARKE, R. A.; BARDSLEY, M. E.; McINTYRE, R. R. Isolation of *Mycoplasma* spp. from racing pigeons (*Columba livia*). **Avian Pathology**, v. 13, p. 65-74, 1984.

KHO, C. L.; MOHD-AZMI, M. L.; ARSHAD, S. S.; YUSOFF, K. Performance of an RT-nested PCR Elisa for detection of Newcastle disease virus. **Journal of virological methods**, v. 86, n. 1, p. 71-83, 2000.

KLEVEN, S. H. Control of avian mycoplasmosis infections in commercial poultry. **Avian Diseases**, v. 52, p. 367-374, 2008.

KLEVEN, S. H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 719-720.

KOMMERS, G. D.; KING, D. J.; SEAL, B. S.; BROWN, C. C. Virulence of pigeon-origin Newcastle Disease virus isolates for domestic chickens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 906-921, 2001.

KUMAR, Y.; SHARMA, A.; SEHGAL, R.; KUMAR, S. Distribution trends of *Salmonella* serovars in India (2001-2005). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 390-394, 2009.

LAPUZ, R. R. S.; UMALI, D. V.; SUZUKI, T.; SHIROTA, K.; KATOH, H. Comparison of the prevalence of *Salmonella* infection in layer hens from commercial layer farms with high and low rodent densities. **Avian Diseases**, v. 56, p. 29-34, 2012.

LAROUCAU, K.; SOURIAU, A.; RODOLAKIS, A. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using pmp genes. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 155-164, 2001.

LESLIE, J. Newcastle disease: outbreak losses and control policy costs. **Veterinary Record**, v. 146, p. 603-606, 2000.

LEY, D. H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 722-744.

LIMA, V. Y.; RASO, T. F.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. *Chlamydophila psittaci* em pombos (*Columba livia*) capturados no parque zoológico municipal de Bauru/SP. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 2003, Bauru. **Anais...** Bauru: Sociedade de Zoológicos do Brasil, 2003. p. 63.

LOCKE, L. N. Chlamydiosis. In: FRIEND, M.; LAITMAN, C. J. **Field Guide to Wildlife Diseases**. Washington: US Dept. Interior, Fish and Wildlife Service, 1987. p.107-116.

Longbottom, D.; Coulter, L. J. Animal chlamydioses and zoonotic implications. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 217-244, 2003.

LORIA, G. R.; TAMBURELLO, A.; LIGA, F.; LAWES, J.; NICHOLAS, R. A. J. Isolation of mycoplasmas from pigeons suffering eye lesions and respiratory disease. **Veterinary Record**, v. 19, p. 664-665, 2005.

LUBLIN, A.; MECHANI, S.; MALKINSON, M.; WEISMAN, Y.; BENDHEIM, U. A 4 year survey of the distribution of *Chlamydia psittaci* in 19 orders of birds in Israel with emphasis on seasonal variability . **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, n. 3/4. p. 144, 1996.

LUBLIN, A.; LEIDERMAN, E.; WEISMAN, Y. Seasonal dependence of *Chlamydia psittaci* shedding in pigeons. **Israel Journal of Veterinary Medicine**.v. 54, n.4. 1999. Disponível em: < <http://www.isrvma.org/TextPage.aspx?ID=25> >. Acesso em: 10 maio 2012.

LUTTRELL, M. P.; STALLKNECHT, D. E.; KLEVEN, S. H.; KAVANAUGH, D. M.; CORN, J. L.; FISHER, J. L. *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. **Avian Diseases**, v. 45, p. 321-329, 2001.

MAGNINO, S.; HAAG-WACKERNAGEL, D.; GEIGENFEIND, I.; HELMECKE, S.; DOVC, A.; PRUKNER-RADOVCIC, E.; RESIDBEGOVIC, E.; LLIESKI, V.; LAROCAU, K.; DONATI, M.; MARTINOV, S.; KALETA, E. F. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 54-57, 2009.

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

METTIFOGO, E.; BUIM, M. R. *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária.** Barueri, São Paulo: Manole, 2009. p. 86-100.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves.** 2. ed. Campinas, São Paulo: FACTA, 2009. p. 485-502.

NASPHV. NATIONAL ASSOCIATION OF STATE PUBLIC HEALTH VETERINARIANS. **Compendium of Measures to Control *Chlamydophila psittaci* (Avian Chlamydiosis)**, 2010. Disponível em: <<http://www.nasphv.org/Documents/Psittacosis.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2012.

NERY, L. R.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; CAMPOS, A. M. A.; SILVA, C. R. Valores de energia metabolizável de alimentos determinados com frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1354-1358, 2007.

NOORMOHAMMADI, A. H. Role of phenotic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, v. 36, n. 6, p. 439-444, 2007.

NUNES, V. F. P. Pombos urbanos: o desafio de controle. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 89-92, 2003.

OBERDORFER, A.; WERNER, O. Newcastle diseases virus: detection characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. **Avian Pathology**, v. 27, p. 237-243, 1998.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Avian Chlamydiosis. **OIE Terrestrial Manual**. 2008a. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.01_AVIAN_CHLAMYD.pdf>. Acesso em: 05 maio 2012.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Avian mycoplasmosis. **OIE Terrestrial Manual**, 2008b. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.05.%20Mycoplasmosis%20aviar.pdf>. Acesso em: 15 maio 2012.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 2011 a. Disponível em:
<<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 08 maio 2012.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Fowl typhoid, Belize**. 2011b. Disponível em:<
http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=11276 >. Acesso em: 10 maio 2012.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Terrestrial Animal Health Code**. 2010. Disponível em:
<http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.10.9.htm>. Acesso em: 30 abril 2012.

OKAWA, H.; MARTINHO, P. R. R.; RANVAUD, R.; DIAS, H. S. **Custos do afugentamento da pomba-amargosa, *Zenaida Auriculata*, na cultura da soja, no médio Paranapanema, safra 1998/99**. 2001. Disponível em:
<<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=192>>. Acesso em: 30 abril 2012.

OLIVEIRA-JÚNIOR, J. G.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B. O.; SCHIAVO, P. A.; FEDULLO, L. P. L. Vírus da doença de Newcastle em aves não-vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 381-383, 2003.

ORSI, M. A.; CAMILLO, S. C. A.; GOUVÊA, M. V.; DOMINGUES, C. S.; PEIXOTO, J. M.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S. A. M.; RAMAZZOTI, A.; ALMEIDA, F. S.; BRENTANO, L.; SPILKI, F. R.; ARNS, C.W. Caracterização biológica e/ou molecular de isolados brasileiros dos vírus da doença de Newcastle no período de 2009-2010. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2011 Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2011.

PASMANS, F.; IMMERSEEL, F. V.; HERMANS, K.; HEYNDRICKX, M.; COLLARD, J.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Assessment of virulence of pigeons isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Variant Copenhagen for Humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2000-2002, 2004.

PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2.ed. Campinas, São Paulo: FACTA, 2009. p. 587-608.

PEDERSEN, K.; CLARK, L.; ANDELT, W. F.; SALMAN, M. D. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in Rock Pigeons captured in Fort Collins, Colorado. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 1, p. 46-55, 2006.

PHALEN, D. N. The use of serologic assays in avian medicine. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 2, p. 124-128, 2001.

PIASECKI, T. Evaluation of urban pigeon (*Columba livia*) health status in relation to their threat to human's health. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 62, n. 5, p. 531-535, 2006.

POSPÍSIL, R.; CISLAKOVA, L.; BALOGHOVA, D.; CARNICKA, A. Ornithosis in restorers of St. Elisabeth Cathedral in Kosice. **Pracovní Lékarství**, v. 40, p. 246-248, 1988.
RASO, T. F. Clamidiose. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 760-767.

RASO, T. F.; BERCHIERI JÚNIOR, A. B.; PINTO, A. A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive Amazon parrots in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 2, p. 118-121, 2002.

RASO, T. F.; CARRASCO, A. O. T.; ALMEIDA, M. A. B.; BERCINI, M.; BARBOSA, M.; ABREU, M. F. T. Surto de psitacose humana no Rio Grande do Sul associado ao contato com caturritas (*Myiopsitta monachus*). In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 3. 2009, Bonito. **Anais...**Bonito: Associação Brasileira de Saúde Pública Veterinária, 2009.

RASO, T. F.; SEIXAS, G. H.; GUEDES, N. M.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 2-4, p. 235-241, 2006.

RESENDE, J. V. **Notícias**. Unidade Laboratorial de Patologia Avícola do Instituto Biológico, 2012. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/noticias.php?id=151>>. Acesso em: 04 maio 2012.

REVOLLEDO, L. Pulorose. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 124-128.

RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: COFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA., 2005, Santos. **Anais...**Campinas: FACTA, 2005. p. 223-228.

SALINAS, J.; CARO, M. R.; CUELLO, F. Antibody prevalence and isolation of *Chlamydia psittaci* from pigeons (*Columba livia*). **Avian Diseases**, v. 32, n. 2, p. 523-527, 1993.

SALLES, C. T. P.; MORAES, H. L. S. Prevenção de doenças, manejo profilático, monitoria. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 1- 38.

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M.; ABU-EL-HAJA, M. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 9, p. 263-277, 2011.

SCHULER, K. L.; GREEN, D. E.; JUSTICE-ALLEN, A. E.; JAFFE, R.; CUNNINGHAM, M.; THOMAS, N. J.; SPALDING, M. G.; HON, S. Expansion of an exotic species and concomitant disease outbreaks: pigeon paramyxovirus in free-ranging Euroasian Collared Doves. **EcoHealth**. 2012. Disponível em: <
<http://www.springerlink.com/content/36751747k4666292/fulltext.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2012.

SCHULLER, M. **Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presentes nas excretas de pombo-doméstico (*Columba livia domestica*)**. 2003. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SEAL, B. S.; KING, D. J.; LOCKE, D. P.; SENNE, D. A.; JACKWOOD, M. W. Phylogenetic relationship among highly virulent Newcastle diseases virus isolates obtained from exotics birds and poultry from 1989 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1141-1145, 1998.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizoties)**, v. 2, n. 19, p. 405-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L. Pullorum diseases and fowl typhoid. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003. p. 568-582.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 4. ed. Rio de Janeiro : Nova Fronteira. 2001, 912 p.

SILVA, J. S. A.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; DORETTO JÚNIOR, L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, L. B. G. Newcastle Disease virus infection in Sparrows (*Passer domesticus*, Linneaus, 1758) captured in poultry farms of the Agreste Region of the State of Pernambuco. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n. 2, p. 125-129, 2006.

SOUSA, E. **Pesquisa de agentes etiológicos patogênicos para galinhas de produção, em aves selvagens próximas às instalações avícolas.** 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SOUSA, E.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; PINTO, A. A.; MACHADO, R. Z.; CARRASCO, A. O. T.; MARCIANO, J. A.; WERTHER, K. Prevalence of *Salmonella* spp. antibodies to *Toxoplasma gondii*, and Newcastle disease Virus in feral pigeons (*Columba livia*) in the city of Jaboticabal, Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 41, n. 4, p. 603-607, 2010.

STALLKNECHT, D. E.; LUTTRELL, M. P.; FISCHER, J. R.; KLEVEN, S. H. Potential for transmission of the finch strain of *Mycoplasma gallisepticum* between house finches and chickens. **Avian Diseases**, v. 42, p. 352-358, 1998.

STEVENS, M. P., HUMPHREY, T. J., MASKWELL, D. J. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. **Philosophical transactions of the Royal Society Biological Sciences**, v. 364, p. 2709-20723, 2009.

STROUD, R. K.; FRIEND, M. Avian Salmonellosis. In: FRIEND, M.; LAITMAN, C. J. **Field Guide to Wildlife diseases.** Washington: National Wildlife Health Center Resource Publication, 1987, p. 101-106.

TADDEI, R.; TERREGINO, C.; BONFANTE, F.; RUGNA, G.; GELMINI, L.; GIBELLI, L.; FEDRIZZI, G.; PIRO, R.; BONILAUDI, P.; RAFFNI, E.; FRASNELLI, M. Investigation on a high mortality episode in euroasian collared-doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WILDLIFE DISEASE ASSOCIATION, 60. 2011, Québec. **Anais...** Québec, Canada: Wildlife Disease Association, 2011. p. 163.

TAKAKUWA, H.; ITO, T.; TAKADA, A.; OKAZAKI, K.; KIDA, H. Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. **Japanese Journal Veterinary Research**, v. 45, n. 4, p. 207-215, 1998.

TIMENETSKY, J. Micoplasmose, conceitos gerais. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária.** Barueri, São Paulo: Manole, 2009. p. 82-85.

TORO, H.; HOERR, F. J.; FARMER, K.; DYKSTRA, C. C.; ROBERTS, S. R.; PERDUE, M. Pigeon Paramyxovirus: association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. **Avian Diseases**, v. 49, p. 92-98, 2005.

TOYODA, T.; SAKAGUCHI, T.; HIROTA, H.; GOTOH, B.; KUMA, K.; MIYATA, T.; NAGAI, Y. Newcastle Diseases virus evolution. II. Lack of the gene recombination in generating virulent and avirulent strains. **Virology**, v. 169, n. 2, p. 273-282, 1989.

TRAVNICEK, M.; CISLAKOVA, L.; DEPTULA, W.; STOSIK, M.; Bhide, M. R. Wild pigeons and pheasants, a source of *Chlamydophila psittaci* for human and animals. **Annual Agricultural Environmental Medicine**, v. 9, p. 253-255, 2002.

TSAI, H. J.; LEE, C. Y. Serological survey of racing pigeons for selected pathogens in Taiwan. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 54, n. 2, p. 179-189, 2006.

UJVARI, D.; WEHMAN, E.; KALETA, E. F.; WERNER, O.; SAVIC, V.; NAGY, E.; CZIFRA, G.; LOMNICZI, B. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. **Virus Research**, v. 96, p. 63-73, 2003.

VANROMPAY, D. Avian chlamydial diagnosis. In: FUDGE, A. M. **Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 99-110.

VANROMPAY, D.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Chlamydia psittaci*: a review with emphasis on avian chlamydiosis. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 93-119, 1995.

VUCEMILO, M.; VLAHOVIC, K.; DOVC, A.; MUZINIC, J.; PAVLAK, M.; JERCIC, J.; ZUPANCIC, Z. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhimurium* and avian paramyxovirus type 1 (PMV-1) in pigeons. **Wildlife Research**, v. 49, p. 303-313, 2003.